



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD,
Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición**

**Caracterización por métodos fenotípicos y genéticos
de una cepa de *Rhodococcus* aislada de una red de
distribución de agua**

Autor:

José Gonzalo Acuña Bres

Directores:

Dr. José María Cayuela García

Dra. Adela Martínez-Cachá Martínez

Murcia, Enero de 2015



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. José María Cayuela García y la Dra. D^a. Adela Martínez-Cachá Martínez como Directores de la Tesis Doctoral titulada **“Caracterización por métodos fenotípicos y genéticos de una cepa de *Rhodococcus* aislada de una red de distribución de agua”** realizada por D. José Gonzalo Acuña Bres en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 7 de Enero de 2015.

Dr. D. José María Cayuela García

Dra. D^a. Adela Martínez-Cachá Martínez

Servicio de Doctorado. Vicerrectorado de Investigación
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: doctorado@ucam.edu

A mis padres y hermana

Agradecimientos

Ha llegado el momento de escribir la última página de esta historia y por tanto de agradecer a las muchas personas que han colaborado directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

Cuando se hace algo en la vida que se convierte en un reto personal más que en cualquier tipo de meta, la satisfacción que se siente es infinita. A mi edad el poder aspirar al grado de Doctor me comporta una gran satisfacción y una gran alegría de la que quiero haceros partícipes.

En primer lugar tengo que mostrar mi agradecimiento al Dr. D Juan Ángel Álvarez Gómez, D. Julio Álvarez Gómez y D^a Josefina Piqueras Rubio, a los que les debo mis primeros pasos en el mundo de la microbiología.

A mis directores de tesis, los Dres. D. José María Cayuela García y Dña. Adela Martínez-Cachá Martínez a los que les tengo agradecer su ayuda y colaboración en un tema tan apasionante como es la Biología Molecular y la Biotecnología. Ellos han guiado mis pasos, me ha dado consejos, ideas, mucho ánimo, ha aceptado mis ideas y las han mejorado. Gracias José María y Adela.

A los Dres. D. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines y Dña. Julia Weels, que me iniciaron en la disciplina de la Biología Molecular, y posteriormente en la Bioinformática, porque sus sabios consejos han hecho posible este trabajo y porque siempre han encontrado un hueco cuando los he necesitado. Gracias Marcos y Julia.

Al Dr. D. Francisco Torrella Mateu, que me orientó en las técnicas de la microbiología de las aguas y me introdujo en la microscopía electrónica, un ejemplo, son las magníficas fotografías que ilustran este trabajo.

A D. Gonzalo Albaladejo Méndez, Jefe de Sección de Calidad de las Aguas de la Mancomunidad de los Canales del Taibilla, por resolverme cuantas cuestiones de análisis físico-químicos de las aguas se han ido planteando.

A mis amigos y compañeros de la Rama Sanitaria y Sistemas Informáticos del "IES El BOHIO", que me han acompañado durante este largo proceso, que siempre me han apoyado en los momentos difíciles, a quienes siempre que regreso los encuentro con los brazos abiertos, igual que ayer, como si no pasara el tiempo y me han animado en todo momento.

A mis hijos Gonzalo José y María Luisa, con el mensaje de que la fe en ti mismo y con disciplina puede uno llegar a alcanzar las metas que se propongan.

Y por último a mi mujer María Luisa, que siempre es la primera, porque ha sido, es y será todo en mi vida y porque sin su apoyo incondicional este trabajo no habría llegado a su fin. Ella ha soportado con enorme paciencia todas las dificultades surgidas en este largo y tortuoso camino.

GRACIAS A TODOS!!!!

**“Una búsqueda comienza siempre
con la suerte del principiante
y termina con la prueba
del conquistador”**

Paulo Coelho

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	17
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	23
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	29
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. AGUA DE CONSUMO	31
1.1.1. Agua potable	35
1.1.2. Calidad del agua	35
1.1.3. Contaminación del agua	40
1.2. MICROBIOLOGÍA DE LAS AGUAS	43
1.2.1. <i>Actinomicetos</i>	45
1.2.2. Género <i>Arthrobacter</i>	48
1.2.3. Family <i>Corynebacteriaceae</i>	50
1.2.4. Actinomicetos nocardioformes	51
1.2.5. Esquema taxonómico del phylum Actinobacteria	52
1.2.6. Family <i>nocardiaceae</i>	53
1.2.7. Requisitos para el cultivo de las actinobacterias	59
1.3. IDENTIFICACIÓN MICROBIANA	60
1.3.1. Identificación microbiana y taxonomía molecular	60
1.3.2. RNA ribosómico	62
1.3.3. Análisis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	67
1.3.4. Variantes de la PCR	71
1.4. TAXONOMIA MICROBIANA	86
1.4.1. Introducción a la Bioinformática	86
1.4.2. Análisis de secuencias	89
1.4.3. Alineamientos	90
1.4.4. Alineamientos múltiples	90
1.4.5. Homología, similitud e identidad	92
1.4.6. Filogenias	93

CAPÍTULO II. OBJETIVOS	97
2.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	99
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	101
3.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA	103
3.1.1. Determinación del ph y la temperatura	104
3.1.2. Determinación de la conductividad	104
3.1.3. Determinación del cloro libre y total	104
3.1.4. Determinación de oxígeno disuelto	105
3.1.5. Determinación de la alcalinidad	105
3.1.6. Determinación de carbono orgánico total	105
3.1.7. Determinación de sodio y potasio	106
3.1.8. Determinación de calcio y magnesio	106
3.1.9. Determinación de cloruros	107
3.1.10. Determinación de nitratos y nitritos	108
3.2. MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	109
3.2.1. Metodología básica microbiológica	109
3.2.2. Técnicas de observación microbiológicas	111
3.2.3. Identificación bioquímica	115
3.3. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	122
3.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	122
3.3.3. Análisis de secuencias	135
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
4.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	135
4.1.1. Determinaciones fisicoquímicas	135
4.1.2. Niveles de cloro en agua	136
4.2. ESTUDIO FENOTÍPICO	137
4.2.1. Recuento de bacterias	137
4.2.2. Características macroscópicas	139
4.2.3. Conclusiones sobre el crecimiento bacteriano	140
4.2.4. Características microscópicas	141
4.2.5. Conclusiones sobre el estudio microscópico	145

4.2.6. Pruebas bioquímicas de identificación	146
4.2.7. Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos	154
4.2.8. Conclusión sobre el estudio bioquímico	156
4.3. RESULTADO DE LOS MÉTODOS MOLECULARES	158
4.3.1. Fragmentos y purificación del ADN	158
4.3.2. Determinación de la secuencia. Gen 16S rRNA	159
4.3.3. Alineamiento local	160
4.3.4. Alineamiento múltiple	166
4.3.5. Alineamiento múltiple de secuencias con Clustal	166
4.3.6. Construcción del árbol filogenético con JALVIEW	168
4.3.7. Alineamiento múltiple y árbol filogenético con CLC BIO	170
4.3.8. Porcentaje de similitud	173
4.3.9. Alineamiento y taxonomía con (RDP-II)	177
4.3.10. Contenido G+C	179
4.3.11. Comprobación de resultados con primers de Nocardias	181
4.3.12. Conclusiones del análisis genotípico	183
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	185
CONCLUSIONES	187
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	191
6.0 BIBLIOGRAFIA	193
CAPÍTULO VII. ANEXOS	225
7.1 SECUENCIAS DE BASES UTILIZADAS 16 S rRNA	227

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP:	Ampicilina
BME:	β -mercaptoetanol
BPB:	Azul de bromofenol
Bq/l:	Bequerelio/litro
BSA:	Albúmina de suero bovino
CAMP (<i>Staph. aureus</i>):	Prueba de Christie, Atkins, and Munch-Peterson
CIT :	Carbono inorgánico total
CIM:	Concentración mínima inhibitoria
CO:	Monóxido de carbono
CT:	Carbono total
dATP:	5'-trifosfato de deoxiadenosina
DBO:	Demanda biológica de oxígeno
dCTP:	5'- trifosfato de deoxicitidina
dGTP:	5'-trifosfato de deoxiguanosina
dH ₂ O:	Agua destilada
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	5'-trifosfatos de deoxinucleósidos
DO:	Densidad óptica
DPD:	Dietil-p-fenilendiamina
DBO ₅ :	Demanda biológica de oxígeno a los 5 días
DQO:	Demanda química de oxígeno
dUTP:	5'-trifosfato de deoxiuridina
EDTA:	Tetracetato de etilendiamina
ETPA	Estación de Tratamiento de Agua Potable
EtBr:	Bromuro de etidio
EtOH:	Etanol
FTR:	Factor de resistencia a los antibióticos
FRET	Transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia
H ₂ O _{dd} :	Agua bidestilada
HYB:	Hibridación
ISO (Normas):	(International Organization for Standardization)

Kb:	Kilobases
mA:	Miliamperes
MET:	Microscopio electrónico de transición
Mg⁺:	Magnesio
MgCl₂:	Cloruro magnésico
MSA:	Alineamiento múltiple de secuencias
Mn⁺:	Manganeso
mM:	Milimoles
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NH:	Amina
NO₃⁻:	Nitrato
NDIR:	Infrarrojos no dispersive
NMP:	Número más probable
NTU	Unidades Nefelométrica de Turbidez
OD:	Oxígeno disuelto
Primers f	Forward (sentido)
Primers r	Reverse (contra sentido)
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PM:	Peso molecular
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA:	Ácido ribonucleico ribosómico
SC:	Citrato sódico salino
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SGB:	Amortiguador para gel con muestras
SH:	Sulfidrhíco
ST:	Tris-EDTA sódico (también TEN)
TA:	Temperatura ambiente
TAE:	Tris-acetato EDTA (amortiguador)
TBE:	Tris-borato EDTA
TM:	Melting temperatura (Temperatura de fusión)
TE:	Tris-EDTA (amortiguador)
TEN	Tris-EDTA sódico (Na) (amortiguador)
TOC:	Carbono orgánico total (Total organic carbon)
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
TTE:	Tris-EDTA Tritón (amortiguador)

TTP:	5'-trifosfato de timidina
U:	Unidad (-es) de enzima
UFC:	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultravioleta
V:	Voltios
[μS/m-1]:	MicroSiemens

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.1. Clases de calidad del agua.....	41
Tabla 1.2. Clasificación jerárquica de la <i>clase Actinobacteria</i>	47
Tabla 1.3. Actinomicetos nocardioformes Manual Bergey's 1989.....	51
Tabla 1.4. Actinomicetos nocardioformes Manual Bergey's 1994.....	52
Tabla 3.1. Parámetros físico-químicos seleccionados.....	103
Tabla 4.1. Resultado de los parámetros físico-químicos.....	135
Tabla 4.2. Lecturas de cloro.....	137
Tabla 4.3. Resultados del panel Api Coryne V3.0.....	147
Tabla 4.4. Evaluación del sistema API Coryne.....	149
Tabla 4.5. Resultados del panel MicroScan-4	149
Tabla 4.6. Pruebas adicionales realizadas por el sistema API.....	151
Tabla 4.7. Resultados pruebas enzimáticas.	153
Tabla 4.8. Resultado de los discos de difusión de los antibióticos.....	155
Tabla 4.9. Resultados de la CIM.....	156
Tabla 4.10. Porcentaje de identidad para <i>Nocardias</i>	174
Tabla 4.11. Porcentaje de identidad para <i>Rhodococcus</i>	175
Tabla 4.12. Porcentaje de identidad para <i>Arthrobacter</i> y fuera del grupo.	176

FIGURAS

Figura 1.1. Árbol filogenético basado en secuencias de genes 16S rRNA.....	61
Figura 1.2. Estructura del ribosoma 70.....	63

Figura 1.3. Gen 16S rRNA de la Escherichia coli.	65
Figura 1.4. Pasos de la investigación por métodos moleculares y bioinformáticos.....	68
Figura 1.5. Interacción entre las ciencias para crear la Bioinformática....	87
Figura 1.6. El árbol de la vida, secuenciado con genomas completos.....	95
Figura 1.7. El árbol de la vida, Ernst Haeckel.....	96
Figura 3.1. Galerías API de Biomerieux.....	118
Figura 3.2. Sistema Combo equipo MicroScan Walkaway.....	121
Figura 4.1. Representación de los valores medios (\pm ET) del recuento de bacterias.....	138
Figura 4.2. Aspecto de las colonias en agar Nutritivo y R2A.....	139
Figura 4.3. Morfología celular.....	141
Figura 4.4. Microscopia electrónica I.....	143
Figura 4.5. Microscopia electrónica II.....	143
Figura 4.6. Microscopia electrónica III.....	144
Figura 4.7. Microscopia electrónica IV.....	144
Figura 4.8. Resultado negativo de la prueba CAMP.....	148
Figura 4.9. Resultado del antibiograma con discos de difusión.....	154
Figura 4.10. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa.	159
Figura 4.11. Búsqueda en sistema BLAST.....	161
Figura 4.12. Resultados de secuencias después del alineamiento.....	162
Figura 4.13. Alineamiento múltiple con Clusta W2.....	167
Figura 4.14. Alineamiento con Clustal (Jalview).....	168
Figura 4.15. Árbol filogenético de distancias con Clusta W2.....	169

Figura 4.16. Alineamiento múltiple con CLC BIO 7.02.....	171
Figura 4.17. Resultado del cladograma realizado por CLC BIO 7.0.....	172
Figura 4.18. Resultado de la Taxonomía. Ribosomal Database Prject II..	178
Figura 4.19. Ventana de lectura del programa Wobble de EMBOSS.....	179
Figura 4.20 Resultado de % moles G+C.....	180
Figura 4.21. Alineamiento múltiple con primers para nocardias.....	182
Figura 4.22. Árbol filogenético con primers para <i>Nocardias</i>	183

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. AGUA DE CONSUMO

El agua, como bien necesario e imprescindible para la vida del ser humano, debe ser garantizada por los poderes públicos. Agua potable es un agua apta para consumo humano y tratamiento de alimentos, porque cumple con una serie de requisitos relacionados con los caracteres organolépticos, físico-químicos, relativos a sustancias no deseables, a sustancias tóxicas, microbiológicas y relativas a radiactividad.

Según la OMS, la vigilancia de la calidad del agua potable consiste en «la evaluación continua y vigilante de la salud pública y el examen de la seguridad y aceptabilidad de los sistemas de abastecimiento de agua de consumo» (OMS, 2004). La protección sanitaria del agua potable se consigue cuando cada elemento del sistema de abastecimiento (fuente, tratamiento, almacenamiento y distribución) funciona correctamente y sin posibilidad de fallo.

Hay que tener en cuenta que para que la vigilancia sea eficaz, todo el sistema debe funcionar debidamente, por lo que la gestión, el diseño, la construcción, el funcionamiento y el mantenimiento correcto tienen una importancia fundamental en el suministro de agua potable segura.

Según la OMS, el establecimiento de un programa eficaz para la vigilancia de las aguas potables depende, en gran medida, de la existencia de

una legislación adecuada, basada en normas reglamentarias que especifiquen la calidad del agua suministrada a los usuarios, así como la producción, tratamiento y distribución de la misma (OMS, 2004).

Todo abastecimiento de aguas potables de consumo público deberá disponer de un servicio de control de la potabilidad del agua. El fin primordial de la vigilancia es garantizar la inocuidad del agua potable. La calidad bacteriológica del agua es una preocupación evidente por el riesgo de enfermedades que, a través de ella, pueden transmitirse. No obstante, tampoco hay que olvidar el daño que pueden causar los productos químicos que contenga el agua. De estos hechos se deduce la importancia de las pruebas de laboratorio para determinar la inocuidad tanto química como bacteriológica del agua de distribución.

La vigilancia química adquiere gran importancia a medida que aumenta la contaminación del agua a tratar. El inconveniente que presenta es que consume mucho tiempo en su realización y requiere, por lo general, una infraestructura instrumental considerable.

La vigilancia bacteriológica tiene el inconveniente de que requiere mucho tiempo para obtener resultados (horas y generalmente días después de la recogida la muestra). En determinadas circunstancias es posible alcanzar un nivel de garantía satisfactorio mediante la determinación de cloro residual en sustitución de los análisis bacteriológicos. Las políticas hidráulicas, medioambientales y sanitarias deben conseguir la calidad máxima para el agua de consumo sea saludable y segura. En su control microbiológico las muestras de aguas destinadas al consumo humano deben estar exentas de

microorganismos procedentes de contaminación fecal (*coliformes*, *enterococos* y *clostridium perfringens*).

Para ello, entre otras cosas hay que decidir el número de muestras que son precisas, la frecuencia del muestreo y distribución de los puntos de toma de muestra. Además, en función de las características del sistema, es preciso establecer la concentración mínima de cloro y la técnica analítica a utilizar. Estas últimas consideraciones pueden ser de aplicación, y de hecho lo son, en aquellos abastecimientos localizados en zonas de menores recursos.

Es ampliamente reconocido que el agua es uno de los principales medios por el que se transmiten microorganismos causantes de enfermedades y que la desinfección del agua, y más concretamente la cloración, ha sido uno de los más importantes logros en la protección de la salud pública. La coagulación, floculación, decantación, filtración y la desinfección del agua potable con cloro han sido responsables de gran parte del 50% de aumento de la expectativa de vida que han experimentado los países desarrollados durante el siglo XX. A este respecto, un artículo publicado en la revista *Water Quality & Health*, ha citado a la filtración y cloración del agua potable como “probablemente el más significativo progreso de salud pública del milenio” (Hetmer, 1999).

En este sentido, la Unión Europea ha adoptado normas que hacen referencia al control de calidad del agua en su origen, que es en definitiva un factor fundamental y determinante para conseguir un agua de abastecimiento público exenta de riesgos sanitarios. Así, en su **Directiva del Consejo 75/440/CEE de 16 de junio de 1975**, relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, establece los

requisitos mínimo exigibles a las aguas para que puedan ser aprovechadas para el abastecimiento público tras ser sometidas a determinados tratamientos. De acuerdo a esta norma, las aguas superficiales pueden clasificarse en tres grupos de valores límite A1, A2 y A3 dependiendo del grado de tratamiento que deben recibir para su potabilidad.

La **Directiva 79/869/CEE de 9 de octubre de 1979**, relativa a los métodos de medición, a la frecuencia de los muestreos y del análisis de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, se recogen los métodos de referencia que han de ser utilizados indicando su límite de detección, precisión y exactitud.

La **Directiva 80/778/CEE de 15 de julio de 1980**, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, en la que se refiere a las exigencias que debe satisfacer la calidad del agua potable, se hace una relación de los diferentes parámetros físicos, químicos y microbiológicos que han de ser controlados analíticamente en el agua de bebida, así como los valores satisfactorios y máximos admisibles que pueden alcanzar estos parámetros para que pueda ser considerada potable y por tanto susceptible de ser suministrada al consumidor con toda garantía sanitaria.

La **Directiva 98/83/CE de 3 de noviembre de 1998**, hace referencia a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.

Estas directivas se refunden en nuestro ordenamiento en el **Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero (BOE nº 45)**, por el que establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano que deberán contener a lo largo de toda la red de distribución del sistema de abastecimiento y, en todo

momento, cloro residual libre o combinado, u otros agentes desinfectantes, en las concentraciones que determine la Administración sanitaria competente.

1.1.1. Agua potable

Agua potable es un agua apta para consumo humano y tratamiento de alimentos, porque cumple los valores establecidos por la legislación para cada parámetro. Las políticas hidráulicas, medioambientales y sanitarias deben conseguir la calidad máxima para el agua de consumo. Así la directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998 se incorporó a nuestra normativa mediante el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero actualizando los criterios de calidad para las aguas de consumo humano.

1.1.2. Calidad del agua

La calidad del agua depende del uso concreto que se le vaya a dar. Si el agua contiene poco oxígeno disuelto favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios; para la agricultura es importante que no tenga cloro, sales, etc.; para la salud es importante que no tenga bacterias, nitratos, etc. El agua puede ser declarada apta para riego o actividades recreativas y no serlo para consumo humano. El agua natural no tiene más calidad que la tratada, pues estas aguas pueden contener elementos nocivos para la salud. La calidad de las aguas viene dada por unos parámetros analíticos establecidos en el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero, es decir, susceptibles de ser analizados periódicamente por los laboratorios en el contexto de un programa de calidad del agua. Entre estos parámetros encontramos los siguientes:

1.1.2.1. *Parámetros organolépticos*

Se refiere a las propiedades del agua que se pueden percibir por los sentidos, de gran importancia en la aceptación del consumidor. Entre ellas destaca el **olor**, cuando huele es síntoma de contaminación por bacterias o por la presencia de productos químicos indeseables; **sabor**, depende de las sales que tiene disueltas: cloruros, sulfatos, no debiendo sobresalir mucho; **color** puede variar según elementos en suspensión como las algas que le daría un color verde, la materia orgánica color pardo, etc., debiendo ser incolora; y **turbidez** que puede ser indicio de contaminación, o sedimentos en suspensión, debiendo ser baja entre 0 a 1 NTU a la salida de ETAP y/o depósito (R.D.140/2003).

1.1.2.2. *Parámetros físicos*

Comprende parámetros físicos tales como: la **temperatura**, la óptima para el consumo está entre 8-15°C, y al elevarse implica una aceleración de la putrefacción y la disminución del oxígeno, influyendo también en la solubilización de gases y sales; la **conductividad**, ligada a la cantidad de sales ionizadas o disueltas en el agua, calculándose a 25°C, pues varía con la temperatura; sales por debajo de 400 mS⁻¹/cm son de excelente calidad y por encima de 750 mS⁻¹/cm son de escasa calidad. Otra propiedad es la **radiactividad** con una actividad α total de 0.1 Bq/l y una actividad β total de 0.1 Bq/l. (Real Decreto 140/2003).

1.1.2.3. *Parámetros químicos inorgánicos.*

Es el apartado más complejo, y comprenden parámetros tales como el **pH**; la **dureza** corresponde a la concentración de calcio y magnesio; los **cloruros**, el aumento dan un sabor desagradable; los **sulfatos**, son responsables de la corrosión. El **sodio**, favorece la hipertensión; el **potasio y aluminio**, son perjudiciales para la salud al sobrepasar los límites establecidos. Los **nitratos**, produce metahemoglobinemia infantil (OMS, 1976); el **cloro**, destruye o inactiva microorganismos productores de enfermedades.

El **TOC** es la cantidad de carbono unido a un compuesto orgánico y mide la cantidad de dióxido de carbono que se genera al oxidar la materia orgánica en condiciones especiales, también se pueden medir otros como el flúor, metales pesados, etc. Finalmente están los componentes químicos gaseosos del aire (CO, N, O), o los procedentes de la descomposición de la materia orgánica (SH, CH, NH).

El agua que abastece a las ciudades, el agua de los manantiales y los ríos no es agua pura, si no que viene con diversas sustancias en estado de disolución. El agua de la lluvia teóricamente es pura, pues procede de la condensación del vapor de agua, pero cuando llega a la superficie terrestre arrastra algunos gases atmosféricos que se incorporan en disolución, como CO₂, convirtiéndola en un ácido débil que puede disolver sales carbonatadas. Pero una vez en el suelo, el agua incorpora nuevos componentes (Na⁺, K⁺, Mg⁺, Fe⁺, Mn⁺, Cl⁻, F⁻, NO₃⁻, CO₃⁻,etc.).

Esto no se ha de ver como algo nocivo, sino que es deseable que el agua tenga sales, ya que muchas de éstas son nutrientes esenciales para la salud de los seres vivos, incluida la especie humana. Por otro lado, recordemos que el agua pura es el agua destilada, que no es apta para el consumo, pues ocasiona trastornos y el sabor del agua se lo debemos a estos componentes en disolución. Sin embargo, algunos de estos componentes, cuando están en una concentración elevada, pueden ser perjudiciales para la salud humana.

Además el agua puede llevar otros elementos sólidos en suspensión (arcillas, materia orgánica) e incluso microorganismos (protozoos, algas, bacterias, virus, etc.) algunos de los cuales pueden ser patógenos cuando alcanzan una cantidad determinada y que a su vez producen otras sustancias que se incorpora al agua, tales como CH_4 , NH_4^+ , Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^- , etc. Por todo ello, desde un punto de vista preventivo, debe establecerse un control de su calidad del agua.

1.1.2.4. Parámetros químicos orgánicos

Estos parámetros determinan la carga orgánica del agua, existen dos parámetros que miden los componentes orgánicos del agua: la demanda biológica de oxígeno (**DBO**), mide el oxígeno que consumen los microorganismos al descomponer la materia orgánica del agua en un tiempo de 5 días, a lo que se le denomina **DBO₅** (demanda biológica de oxígeno medida a los 5 días); la demanda química de oxígeno (**DQO**), mide el oxígeno disuelto en el agua que se gasta para oxidar la materia orgánica por agentes químicos en medio ácido. Es un buen indicador de contaminación orgánica la cantidad

de oxígeno disuelto (OD) (Real Decreto 140/2003). También se mide la posible presencia de productos orgánicos tales como detergentes, aceites, pesticidas, etc.

1.1.2.5. *Parámetros microbiológicos*

En el agua pueden existir diversos tipos de microorganismos, tales como: virus, bacterias, hongos, algas y protozoos. El control de la calidad del agua se centra en los organismos patógenos para el hombre, utilizándose para ello unos bioindicadores microbiológicos de contaminación biológica que comprenden a organismos tales como: bacterias aerobias (a 37°C, temperatura del cuerpo humano), coliformes (*Escherichia coli*), estreptococos fecales (*Enterococcus*) y *clostridios sulfito-reductores*, que forman parte del llamado ciclo de contaminación fecohídrica del agua, proveniente de las aguas residuales, su valor paramétrico es de 0 UFC en 100 ml.

Es significativa la relación coliformes/estreptococos fecales, de modo que si es mayor de 4, se trata de una contaminación de origen humano y si es menor de 0.7 es de origen animal (Sorrequieta, 2004). Para su recuento se utilizan técnicas tales como el número más probable (NMP) a partir del número de tubos sembrados que acusan un cambio, y otras técnicas como (diluciones seriadas, siembra en placas, filtración en membranas, etc.). La identificación de patógenos ocasionales son necesarias técnicas muy selectivas como la de antígenos específicos o incluso el análisis del DNA (técnica PCR).

1.1.3. Contaminación del agua

El agua es el origen y base de la vida, no existe actividad humana, económica, industrial, social que pueda prescindir de este recurso vital. Su esencialidad para la vida y sus múltiples usos, generan grandes conflictos entre diversos sectores e intereses de la sociedad. Sin embargo, las inundaciones, las sequías, los desechos mal tratados y las insuficientes infraestructuras para la desinfección plantean serias amenazas para la salud pública.

La actividad humana altera el curso natural del ciclo del agua devolviéndola al medio en estado generalmente contaminado, el origen de la pérdida de calidad en el agua, tanto superficial como subterránea, se debe a los efluentes agrícolas y ganaderos que incorporan sustancias indeseables, como los pesticidas y los nitratos, los de origen industrial que introducen sustancias químicas tóxicas como los metales pesados y los de origen urbano que introducen gran cantidad de materia orgánica en descomposición.

La sobre explotación de los acuíferos cercanos a la costa puede producir aumento de la salinización, haciéndolos inservibles para su uso. La Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE) establece como “buen estado de las aguas superficiales” el estado alcanzado por una masa de agua superficial cuando su estado microbiológico como su estado químico, no superan las concentraciones de contaminantes y por lo tanto no superan las normas de calidad medioambiental establecidas en la mencionada Directiva. Lo mismo se establece para las aguas subterráneas, si bien en este caso los parámetros son enteramente químicos.

De este modo, el Libro Blanco del Agua (Ministerio de Medio Ambiente, 2000) se establecen cinco clases en la calidad de las aguas según indicadores bióticos (Tabla 1.1).

INDICES BIOTICOS	
Clase I	Aguas muy limpias.
Clase II	Aguas no contaminadas o no alteradas de modo sensible
Clase III	Aguas con evidentes efectos de contaminación
Clase IV	Aguas muy contaminadas
Clase V	Aguas fuertemente contaminadas

Tabla 1.1. Clases de calidad del agua. Libro Blanco del Agua (Ministerio de Medio Ambiente, 2000).

El crecimiento de la población y la expansión de sus actividades económicas están presionando negativamente a los ecosistemas de los ríos, los lagos, los humedales y los acuíferos. Ejemplos son las alteraciones de los sistemas fluviales a consecuencia de la navegación, que también repercute en embalses de almacenamiento de agua, el drenaje de humedales para aumentar la superficie agrícola, las múltiples fuentes de contaminación provenientes de la agricultura, la industria, el turismo y las aguas residuales de los hogares. Esta forma de actuar hace que los residuos no se traten adecuadamente y causen contaminación. La contaminación del agua afecta a las aguas superficiales, a las subterráneas y como consecuencia degrada los ecosistemas naturales (UN-WATER/WWAP/2006/3).

Un dato significativo de esta presión es que mientras la población desde 1900 se ha multiplicado por cuatro, la extracción de agua se ha multiplicado por seis. La calidad de las masas naturales de agua se está reduciendo debido

al aumento de la contaminación y a los factores mencionados (UN-WATER/WWAP/2006/3).

La contaminación del agua tiene esencialmente dos orígenes de los cuales uno es natural y otro accidental.

Contaminación natural: es la que existe siempre, originada por restos animales, vegetales, minerales y sustancias que se disuelven cuando el agua atraviesa diferentes terrenos.

Contaminación artificial: va apareciendo a medida que el hombre comienza a interactuar con el medio ambiente y surge con la inadecuada aglomeración de las poblaciones, y como consecuencia del aumento desmesurado y sin control alguno de las industrias.

La contaminación del agua tanto si es natural como artificial provoca una modificación de su calidad haciéndola impropia o peligrosa. En este sentido, distinguimos varios tipos de contaminación del agua: a) Contaminación química: debida a compuestos orgánicos e inorgánicos en cantidad indeseable; b) Contaminación física: color, turbidez, suspensión, temperatura, radiactividad no deseable; c) Contaminación organoléptica: sabor, olor, etc. indeseables; d) Contaminación biológica: bacterias, virus, protozoos, algas, etc. en cantidad no deseable.

Aunque cualquier bacteria puede llegar al agua y propagarse por este medio, en la práctica se limita a un cierto número de bacterias que al ser eliminadas por heces o por la orina de enfermos o portadores sanos, tienen mayores posibilidades de llegar a las aguas en cantidad suficiente para producir enfermedades, que pueden manifestarse en forma epidémica e

incluso producir pandemias. El agua no es un buen medio de cultivo, pero es capaz de vehicular los gérmenes un cierto tiempo al no ser muy agresiva.

Son enfermedades transmitidas por el agua el cólera, la fiebre tifoidea, la disentería, la poliomielitis, la meningitis y las hepatitis A y B, entre otras. Los lugares que carecen de instalaciones de saneamiento apropiado favorecen la rápida propagación de estas enfermedades.

Cuando los residuos no se tratan adecuadamente, causan contaminación y como consecuencia degrada los ecosistemas naturales. Cada país regula por ley la calidad del agua destinada al consumo humano. La ley europea protege *la salud de las personas de los efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación de las aguas destinadas al consumo humano garantizando su salubridad y limpieza* y por ello no puede contener ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un peligro para la salud humana.

1.2. MICROBIOLOGÍA DE LAS AGUAS

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos; crecen hasta en los lugares más extremos como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radiactivos, en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas conocidas como extremófilas. Se estima que se pueden encontrar en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón

de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (Whitman *et al.*, 1998). Las bacterias son tan importantes debido a su extrema flexibilidad, a la capacidad para el crecimiento rápido y la reproducción.

La flora bacteriana de cualquier agua, está constituida por bacterias de origen autóctono, que viven y se desarrollan en el agua y de otras bacterias procedentes de otros biotopos, especialmente de bacterias procedentes de la tierra (Marín, 2003). Las aguas superficiales se encuentran expuestas a una contaminación bacteriana de diversa procedencia en especial de las bacterias procedentes del aire.

La mayor parte de las bacterias que se encuentran en las aguas subterráneas y aguas superficiales, son bacterias de origen telúrico. La clase de bacterias presentes en las aguas superficiales son muy variadas, entre la que podemos encontrar bacterias nitrificantes del género *Azotobacter* de tipo *Nitrosomas* y *Nitrobacter*. En aguas contaminadas podemos encontrar bacterias coliformes como *E. Coli*, *Proteus* y *Salmonella*. En aguas superficiales que contiene escasas sustancias nutritivas predominan bacilos gram-negativos como las *Pseudomonas*, también se pueden encontrar *Flavobacterium* y *Achromobacter*.

De cualquier forma en las aguas superficiales suelen encontrarse bacilos gram-positivos pertenecientes a la clase *Actinobacteria*, género *Micrococcus*, *Nocardias* y *Rhodococcus*. Los *Actinomicetos* son bacterias que pueden causar algún tipo de enfermedad sin embargo son muy útiles como biorremediadoras

y son utilizadas para la producción de antibióticos como la estreptomicina y nocardicin.

1.2.1. *Actinomicetos*

Los actinomicetos se les considera patógenos oportunistas, constituyen un grupo de microorganismos formado por bacterias generalmente aerobias, Gram-positivas y con alto contenido en G+C. Muchas especies forman filamentos ramificados o hifas que producen un micelio que se divide en bacilos o formas cocoides y esporas asexuales. En su morfología general se parecen mucho a los hongos. La mayoría de ellas se encuentran en la tierra, e incluyen algunas de las más típicas formas de vida terrestre, jugando un importante rol en la descomposición de materia orgánica, tales como la celulosa y quitina. Muchas actinobacterias destacan por su capacidad para producir compuestos que tienen características útiles en farmacología. En 1940 Selman Waksman descubrió en el suelo las bacterias que producen actinomicina, un descubrimiento que le valió el premio Nobel. Se han descubierto desde entonces centenares de antibióticos naturales en estos microorganismos terrestres, especialmente en el género *Streptomyces* (González, 2013).

De hecho, hoy en día, sigue siendo el grupo más prolífico en cuanto a producción de antibióticos y compuestos bioactivos. Pueden ser patógenos de plantas, de animales, de humanos, descomponen productos del caucho; crecen en el combustible de los aviones; en las estaciones depuradoras de aguas residuales, producen espumas densas que llegan a obstruir las instalaciones.

Por la diversidad de hábitats que pueden colonizar este grupo de microorganismos tiene un enorme interés ecológico.

Desde hace algún tiempo se ha observado que las secciones del Volumen 4 del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de 1989 no son homogéneas y que no siempre coinciden con los datos de las secuencias del 16S rRNA. Recientemente se ha propuesto ubicar todas estas bacterias e la clase Actinobacteria (Stackebrandt *et al.*, 1997).

La 9ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) engloba a los actinomicetos en diferentes grupos que abarcan del 22 al 29, variando el número de géneros que se incluyen y su división en los distintos subgrupos. El número de géneros integrantes se ve ampliado a 48 a causa de la aparición de 10 nuevos géneros y a la fusión de otros 2.

Recientemente se ha propuesto ubicar todas estas bacterias en la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997) en base a la secuencia del 16S rRNA (Tabla 1.2). La clase *Actinobacteria* está compuesta por los actinomicetos y sus parientes filogenéticos con un alto contenido en G+C. Contiene cinco subclases, la más amplia de las cuales es la subclase *Actinobacteridae*. Los géneros incluidos en el Manual *Bergey's* están en el orden de *Actinomycetales*, que se divide en 10 subórdenes (Cuesta, 2004).

En la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone *et al.*, 2001) se propone la elevación de la clase *Actinobacteria* al rango de phylum. Dentro del phylum se reconoce una única clase, *Actinobacteria*, que mantiene la estructura jerárquica propuesta por Stackebrandt en 1997.

Clasificación jerárquica de la *clase Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales* basada en las secuencias de DNA y 16SrRNA.
(Stackebrandt *et al.*, 1997)

Dominio "Bacteria" (Haeckel, 1894) C.R. Woese *et al.*, 1990

☐ Phylum "Actinobacteria" Stackebrandt *et al.*, 1997

☐ Class Actinobacteria™ Stackebrandt *et al.*, 1997, *nom. inval.*

☐ Subclass Actinobacteridae™ Stackebrandt *et al.*, 1997

☐ Order Actinomycetales™ Buchanan, 1917, *nom. approb.*

☐ Suborder Micrococccineae (Prévot, 1940) Stackebrandt *et al.*, 1997

▣ Family Micrococcaceae™ Pribram, 1929, *nom. approb.*

⊕ Genus *Pelczaria* Poston, 1994, *nom. rej.*

⊕ Genus *Micrococcus*™ Cohn, 1872, *nom. approb.*

⊕ Genus *Acaricomes* Pukall *et al.*, 2006

⊕ Genus *Arthrobacter* Conn & Dimmick, 1947, *nom. approb.*

⊕ Genus *Sinomonas* Zhou *et al.*, 2009

⊕ Genus *Citricoccus* Altenburger *et al.*, 2002

⊕ Genus *Kocuria* Stackebrandt *et al.*, 1995

⊕ Genus *Nesterenkonia* Stackebrandt *et al.*, 1995

⊕ Genus *Renibacterium* Sanders & Fryer, 1980

⊕ Genus *Rothia* Georg & Brown, 1967, *nom. approb.*

⊕ Genus *Stomatococcus* Bergan & Kocur, 1982] *see*

⊕ Genus *Zhihengliuella* Zhang *et al.*, 2007

☐ Suborder Corynebacterineae (Lehmann y Neumann, 1896)

▣ Family Mycobacteriaceae

⊕ Genus *Mycobacterium*

▣ Family Corynebacteriaceae

⊕ Genus *Corynebacterium*

▣ Family Nocardiaceae (Edmond Nocard 1888)

⊕ Genus *Nocardia*

⊕ Genus *Rhodococcus*, (Zopf 1891)

Tabla 1.2. Clasificación jerárquica de la *clase Actinobacteria*, basada en las secuencias de DNA y 16S rRNA. (Stackebrandt *et al.*, 1997).

1.2.2. Género *Arthrobacter*

Los microbiólogos rara vez han estudiado los entornos del subsuelo. Fue en la década de 1980 cuando se informó de que ciertos acuíferos poco profundos contenían un número importante de bacterias cultivables y otros microorganismos (Ghiorse *et al.*, 1988). Desde entonces, los microorganismos cultivables se han descubierto en ambientes subterráneos saturados e insaturados, a profundidades que va desde la superficie a una profundidad de 2,7 km, y a temperaturas tan altas como 60°C.

El género *Arthrobacter* está encuadrado en la familia de la *Micrococcaceae*. En la 9ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) el género *Arthrobacter* está incluidos en el Grupo 22, el cual está dividido en 4 subgrupos. El género *Arthrobacter* son bacterias del suelo, han sido estudiadas por su amplia actividad metabólica y su supervivencia en ambientes extremos como en el mar Ártico, en el agua destilada e incluso en fugas de depósitos radiactivos. Incluye un grupo heterogéneo de bacterias aeróbicas, gram-positivas, catalasa positiva, no fermentativas, corineformes y no formadoras de esporas (Keddie *et al.*, 1986). Pueden ser móviles e inmóviles con alto contenido en G+C (Koch, C. *et al.*, 1995). Los miembros de este género contienen en su pared celular peptidoglicano, L-lisina alamina y ac. glutámico y ácido diamino (Funke, *et al.*, 1997). Se dividen en dos grupos, las variaciones A3 α y A4 α . Estos grupos difieren en su estructura de peptidoglicano (Schleifer *et al.*, 1972).

Los miembros del género *Arthrobacter* muestran un ciclo de vida que se caracteriza por cambios morfológicos de la célula, la conversión de la forma bacilar a formas de coco, y de vuelta a la forma bacilar. Las cepas *Arthrobacter* son metabólicamente diversas, y son capaces de catabolizar una variedad de compuestos xenobióticos, y diversos compuestos de triazina.

Debido a su diversidad metabólica, las especies de *Arthrobacter sp*, se han utilizado en aplicaciones industriales y actualmente están siendo utilizados en la biorremediación de aguas subterráneas contaminadas. La Universidad de Minnesota en su base de datos sobre bacterias que son capaces de producir Biocatálisis/Biorremediación, establece 83 géneros. Las cepas de *Arthrobacter sp*, son la tercera más abundante en las reacciones de biotransformación, solo superada por las cepas de *Pseudomonas* y *Rhodococcus sp*. (Lynda *et al.*, 2012).

El *Arthrobacter spp.* se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, especialmente en el suelo, y han sido reconocidos recientemente como patógenos oportunistas. Entre las 38 variantes descritas de *Arthrobacter* en el momento de esta redacción, 5 fueron aisladas de fuentes clínicas, como el *Arthrobacter albus* (Wauters *et al.*, 2000), *Arthrobacter creatinolyticus* (Hou *et al.*, 1998), *Arthrobacter cumminsii*, (Funke *et al.*, 1996), *Arthrobacter luteolus* (Wauters *et al.*, 2000), y *Arthrobacter woluwensis* (Funke *et al.*, 1996). Además, algunas cepas de *Arthrobacter oxydans* se aislaron a partir de sangre humana (Wauters, G. *et al.*, 2000). Sin embargo, el conocimiento como patógeno potencial y por lo tanto la importancia clínica de las cepas de *Arthrobacter* está lejos de ser

significativa. Por consiguiente, el descubrimiento de una nueva especie *Arthrobacter* de origen humano es todavía poco significativa.

1.2.3. Family *Corynebacteriaceae*

El orden de las *Corynebacteriales* abarca entre otras las siguientes familias: *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*.

El género *Corynebacterium* fue creado por Lehmann y Neumann (1896) para ubicar taxonómicamente a los bacilos de la difteria. El género fue definido basándose en características morfológicas: *Corynebacteria* proviene del griego *corönë* (bastón nudoso) y *bacterion* (bastoncillo). A partir de estudios de 16S rRNA se ha agrupado a las corinebacterias en la subdivisión de eubacterias Gram-positivas de alto contenido en G+C, en estrecha relación filogenética con *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e incluso *Streptomyces*. El *Corynebacterium* está incluido en la sección 15 del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Collins y Cummins, 1986) y en el grupo 20 del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

El género *Corynebacterium* contiene bacilos rectos o ligeramente curvados, aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positivos, a menudo de extremos afilados, se suelen observar formas en maza.

Las bacterias permanecen a menudo enlazadas después de la división crepitante, lo que tiene como consecuencia disposiciones de las células en ángulo, análogas a letras chinas, o una disposición en empalizada en la que se alinean hileras de células unidas por sus caras laterales. Las corinebacterias forman gránulos metacrómicos y poseen un quimiotipo de pared celular

tipo IV (ácido *meso*-diaminopimélico, arabinosa y galactosa). Contienen ácidos micólicos de 22-36 átomos de carbono (Collins y Cummins, 1986). Actualmente hay descritas 69 especies pertenecientes a este género (Garrity et al., 2004).

Según la similitud del género (pared celular y composición lipídica) *Corynebacterium* está muy estrechamente relacionado con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* formando el llamado grupo CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*). Esta relación filogenética la respaldan los resultados obtenidos por Stackebrandt en base a los estudios de la secuencia del 16S rRNA (Stackebrandt et al., 1997).

1.2.4. Actinomicetos nocardioformes

Los actinomicetos nocardioformes aparecen descritos por Lechevalier en la Sección 26 de la 1ª edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams et al., 1989). En esta edición se describen once géneros de nocardioformes de los cuales sólo *Nocardia* y *Rhodococcus* contienen ácidos micólicos (Tabla 1.3).

SECCIÓN 26: Actinomicetos Nocardioformes	Géneros
	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardiooidies</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Faenia</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Intrasporangium</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Saccharomonospora</i>

Tabla 1.3. Actinomicetos nocardioformes incluidos en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4. 1989.

En la 9ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) los actinomicetos nocardioformes están incluidos en el Grupo 22, el cual está dividido en 4 subgrupos. El subgrupo 1 reúne los actinomicetos que contienen ácidos micólicos. Hasta la fecha de publicación se incluyen cuatro géneros. (Tabla 1.4).

GRUPO 22: Actinomicetos Nocardioformes	Actinomicetos que contienen ácidos micólicos (mycolata) incluidos en el <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> 9ª Ed. 1994.	
	Subgrupo 1: Bacterias que contienen ácidos micólicos	Géneros <i>Gordonia</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Tsukamurella</i>

Tabla 1.4. Actinomicetos nocardioformes incluidos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9ª Ed. 1994.

1.2.5. Esquema taxonómico del phylum *Actinobacteria*

El *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, edición de 2012, en su volume 5 dedicado a las Actinobacterias incluye un esquema taxonómico revisado para las *Actinobacteria* de alto contenido en G+C, así como una descripción de más de 200 géneros en 49 familias (Whitman *et al.*, 2012).

A continuación se muestra el esquema taxonómico del phylum *Actinobacteria* familia *Nocardiaceae*. Menos el género *Nocardia* el resto de los géneros están dispuestos en orden alfabético.

Phylum XXVI. "Actinobacteria "

Class I. "Actinobacteria "

Order V. "Corynebacteriales "

Family IV. *Nocardiaceae*

Genus I. *Nocardia*

Genus II. *Gordonia*

Genus III. *Millisia*

Genus IV. *Rhodococcus*

Genus V. *Skermania*

Genus VI. *Smaragdicoccus*

Genus VII. *Williamsia*

1.2.6. Family *nocardiaceae*

Está compuesta por distintos géneros, entre ellos se encuentra el género *Nocardia* y *Rhodococcus* (Stackebrandt *et al.*, 1997, Chun *et al.*, 1997). Aparecen descritos en la sección 17 (nocardioformes) de la primera edición del Manual Bergey's y en la sección 26 (actinomicetos nocardioformes) del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, edición de 2012. El género *Skermania* fue incluido originariamente en esta familia (Chun *et al.*, 1997).

Debido a que estos géneros se parecen a los miembros del género *Nocardia*, son denominados en conjunto como nocardioformes. El término nocardioforme, introducido por Prauser en 1967, hace referencia a los

actinomicetos que forman un micelio fugaz que se fragmenta en elementos bacilares o cocoides. Ésta no es una definición satisfactoria ya que se conocen cepas individuales de nocardioformes que no presentan esta característica. Este término intentó unir de una manera informal un número de organismos con características similares, sin que esto signifique que sean organismos estrechamente relacionados (Cuesta, 2004).

1.2.6.1. Género *Nocardia*

Son aerobios, catalasa positivos, parcialmente ácido-alcohol resistentes, Gram-positivas o Gram-variables. Forman un micelio aéreo, aunque únicamente visible al microscopio, que se eleva por encima del agar, donde ocasionalmente se pueden encontrar conidios. Las hifas del micelio del sustrato adquieren unas dimensiones de 0.5-1.2 mm de diámetro y la principal característica morfológica de este género es la tendencia a fragmentarse con facilidad en bacilos y elementos cocoides (Cuesta, 2004).

Las hifas forman ramificaciones características en ángulo recto. Las colonias tienen un aspecto aterciopelado o calcáreo y pueden ser marrones, rosas, rojas, naranjas, púrpuras, grises o blancas y, además, pueden producir pigmentos solubles de color marrón o amarillo. Los componentes mayoritarios de la pared celular son el ácido *meso*-DAP (diaminopimélico), arabinosa y galactosa. Contienen ácidos micólicos de 44-60 átomos de carbono y su contenido en G+C expresado en mol% es alto entre un 50-70%. El género *Nocardia* está distribuido en el suelo de todo el planeta y se encuentra también

en hábitats acuáticos. Se ha llegado a detectar especies de *Nocardia* en aguas radiactivas (Guerrero, 2004).

Aunque en su mayoría son saprófitos de vida libre, algunas especies, en particular *N. asteroides*, son patógenos oportunistas que causan nocardiosis en seres humanos y en algunos animales. Es más frecuente la afectación pulmonar, pero también pueden llegar a invadir el sistema nervioso y otros órganos (McNeil *et al.*, 1994).

La primera *Nocardia* fue aislada en 1888 por el veterinario y bacteriólogo francés Edmond Nocard y fue caracterizada un año después por Trevisan que le dio el nombre de *Nocardia farcinica*. Por desgracia, las muestras de la cepa original de Nocard mantenida en dos colecciones de cultivo resultaron ser marcadamente diferentes. La cepa ATCC 3318 contenía ácidos micólicos típicos de *Nocardia* y la cepa NCTC 4524 contenía ácidos micólicos típicos de *Mycobacterium*. Los estudios taxonómicos llevados a cabo por Gordon y Mihn en 1962 no pudieron distinguir la cepa ATCC 3318 de *N. asteroides* por lo que en 1980 esta última especie sustituyó a *N. farcinica* como especie tipo (Wallace *et al.*, 1990).

Actualmente estas cepas se incluyen en el llamado *Nocardia asteroides* complex constituido por *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*. Con los métodos de identificación clásicos estas tres especies no se pueden distinguir y tradicionalmente se ha utilizado el patrón de resistencia a antibióticos (Wallace *et al.*, 1988). Otros métodos como el sistema Killer de levaduras (Provost *et al.*, 1995) y la opacificación del agar Middlebroock 7H10 (Flores *et al.*, 1993). Actualmente se dispone de métodos moleculares precisos para diferenciar estas tres especies (Steingrube *et al.*, 1995).

Desde la transferencia de *N. amarae* al género *Gordonia* como *G. amarae* (Goodfellow *et al.*, 1994) y de *N. pinensis* al género *Skermania* como *S. piniformis* (Chun *et al.*, 1997) el género *Nocardia* ha quedado como un taxón homogéneo. El género *Nocardia* contiene 40 especies válidamente descritas en el Bergey's Taxonomic Outline of Prokaryotes (Garrity *et al.*, 2004), muchas de ellas pueden causar enfermedades en humanos y animales como infecciones pulmonares y cutáneas (Roth *et al.*, 2003, Kageyama *et al.*, 2004). Se ha demostrado que una de estas especies, *N. farcinica*, es una de las responsables de formación de espumas en plantas de aguas residuales (Stratton *et al.*, 1996).

1.2.6.2. Género *Rhodococcus*

El género *Rhodococcus*, pertenece a la familia de las *Nocariaceae*, un distintivo linaje dentro del Phylum Actinobacteria (Gurtler *et al.*, 2004 y; Zhi *et al.*, 2009) comprende actinomicetos aerobios, Gram-positivos, catalasa positivos y parcialmente ácido-alcohol resistentes en alguno de sus estados de crecimiento. Son coco-bacilos que pueden formar micelios de sustrato que da lugar a la aparición de extensas hifas, mientras que tan sólo en algunas especies es característico un micelio aéreo visible al microscopio. Las colonias de *Rhodococcus* pueden ser aterciopeladas, rugosas o mucosas, de color rojo, naranja, amarillo o crema. En todas las especies que componen este género el ciclo de crecimiento comienza con un estado de bacilo o cocobacilo a una formación de coco y a partir de este punto los diferentes organismos pueden mostrar una mayor o menor complejidad en sus estados morfológicos (Cuesta, 2004). Los componentes mayoritarios del peptidoglucano de la pared celular

son el ácido *meso*-DAP (diaminopimélico), arabinosa y galactosa. Contiene ácidos micólicos entre 28-54 átomos de carbono en total (Alshamaony *et al.*, 1976; Klätte *et al.*, 1994; Sutcliffe, 1998; Stratton *et al.*, 1999; Nishiuchi *et al.*; 2000) y su contenido en G+C expresado en mol% se encuentra entre un 50 a un 73% (Goodfellow *et al.*, 1998).

Las envolturas celulares de los *Rhodococcus* son fuentes ricas estructuralmente en diversos lípidos, algunos de los cuales tienen propiedades tensioactivas que facilitan el crecimiento de las bacterias sobre sustratos hidrófobos y pueden ser de importancia biotecnológica lo que le confiere hidrofobicidad y resistencia a los desinfectantes (Sutcliffe, 1998).

El hábitat de *Rhodococcus* está ampliamente distribuido en la naturaleza y frecuentemente es aislado de suelos, medios acuáticos y excrementos de animales herbívoros. Existen 19 especies de *Rhodococcus* válidamente descritas (Bergey's *Taxonomic Outline*, 2004) aunque en los fondos marinos se están encontrando nuevas especies de *Rhodococcus* por lo que cabe esperar que este número aumente en los próximos años (Colquhoun *et al.*, 1998).

En los últimos decenios, el interés de estos microorganismos es la biotecnológica, especialmente en su relación con la biorremediación, existen especies que tienen un gran interés medioambiental ya que son capaces de degradar herbicidas (Parekh *et al.*, 1994). Su empleo en el tratamiento de aguas residuales industriales, se ha dirigido a las especies de *Rhodococcus* debido a su capacidad para degradar los contaminantes químicos persistentes (Teramoto *et al.*, 2009). Además, de que han incluido un número muy importante como productores de antibióticos (Teramoto *et al.*, 2009).

Generalmente se considera que tiene baja patogenicidad, que causan enfermedades en los animales, plantas y en los seres humanos (Bell *et al.*, 1998). Ha habido un creciente interés en las infecciones causadas por distintas especies de *Rhodococcus* en los seres humanos desde el primer caso clínico causado por *Rhodococcus equi* que fue descrito en 1967 (Weinstock y Brown, 2002). La gran mayoría de los pacientes infectados con *R. equi* son individuos que se encuentran inmunodeprimidos, tales como los receptores de trasplantes de órganos sólidos y aquellos con la enfermedad del SIDA, aunque también se ha informado de infección en personas aparentemente inmunocompetentes (Weinstock y Brown, 2002 ; Roy *et al.*, 2009). Las infecciones por *R. equi* se adquieren generalmente a través de la inhalación, inoculación directa y la ingestión oral (Conville y Witebsket, 2007). La bacteriemia causada por *R. equi* ha sido descrita en un 80% de los pacientes inmunodeprimidos y aproximadamente el 30% de los pacientes inmunocompetentes (Weinstock y Brown, 2002). Sin embargo, en contraste con *R. equi*, el potencial patógeno de *Rhodococcus erythropolis* como un patógeno invasivo no es bien conocida porque *R. erythropolis* rara vez se ha aislado a partir de infecciones humanas a pesar de su existencia generalizada en el medio ambiente. Hasta el momento, sólo seis casos de infección humana por *R. erythropolis* han sido descritos ((Brown y Hendler, 1989); (Osoagbaka *et al.*, 1989); (Vernazza *et al.*, 1991); (von Below *et al.*, 1991); (Roy *et al.*, 2009); (Baba *et al.*, 2009)).

1.2.7. Requisitos para el cultivo de las actinobacterias

1.2.7.1. Requisitos nutricionales

Diversos estudios taxonómicos han demostrado que los *Rhodococcus* son capaces de utilizar un amplio rango de sustratos que va desde los azúcares simples hasta componentes orgánicos muy complejos. Otros trabajos revelan que la *Nocardia* y los organismos relacionados son también capaces de metabolizar varios hidrocarburos, lípidos complejos, esteroides y fenoles (Klatte *et al.*, 1994). Los aislados de fangos activos procedente de *Nocardias* y *Rhodococcus* también muestran esta capacidad para metabolizar un amplio rango de sustratos, incluyendo sustratos inusuales como tiofenos y quinolonas (Seviour y Blackall, 1998). Especialmente los *Rhodococcus*, son extremadamente versátiles en su capacidad para degradar sustratos y, consecuentemente, mostrarían una exitosa competencia contra otros microorganismos con capacidades metabólicas más limitadas, incluso a pesar de que estos últimos crezcan más rápidamente en sustratos sencillos como la glucosa.

1.2.7.2. Requisitos de oxígeno

Las actinobacterias son aerobios estrictos, esto no significa necesariamente que algunas actinobacterias no sean capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas, como ciertas especies de *Rhodococcus* que pueden metabolizar anaeróbicamente clorofenoles (Uotila *et al.*, 1992).

1.2.7.3. *Temperatura*

Las actinobacterias aisladas crecen en un amplio rango de temperaturas. Algunas especies aisladas, particularmente el *Rhodococcus* crecen a temperaturas tan bajas como 5°C, mientras que la temperatura mínima de crecimiento para *Gordonia amarae* es de 15°C. La temperatura óptima de estos microorganismos es de 25°C, algunos no pueden crecer con temperaturas de 30°C o superiores y, sin embargo, otros lo hacen a más de 40°C. (Cuesta, 2004).

1.3 IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

1.3.1. **Identificación microbiana y taxonomía molecular**

Antes del desarrollo de los métodos de secuenciación de bases, era imposible conocer las relaciones evolutivas que conectaban todas las formas de vida, así como dibujar un árbol evolutivo. Hace poco más de cuatro décadas los organismos celulares se dividían en 5 reinos: Animalia, Plantae, Fungi, Protista y Monera (Whittaker, 1969). Adicionalmente los constituyentes de estos cinco reinos eran caracterizados en dos grupos eucariotas o procariotas.

Con Carl Woese, microbiólogo estadounidense que fue el creador de la taxonomía molecular basada en la comparación entre especies mediante las secuencia del 16S rRNA (Woese *et al.*, 1977), que comparten todos los seres vivos procariotas y apenas ha sufrido cambios desde la aparición en la tierra de las primeras formas de vida microbiológicas. Los análisis filogenéticos que realizó en 1977 le llevaron al descubrimiento de un nuevo dominio, el *Archaea*.

No fue hasta mediados de 1990 cuando la creciente cantidad de datos llevó a la comunidad científica a la aceptación de este nuevo dominio (Woese *et al.*, 1990).

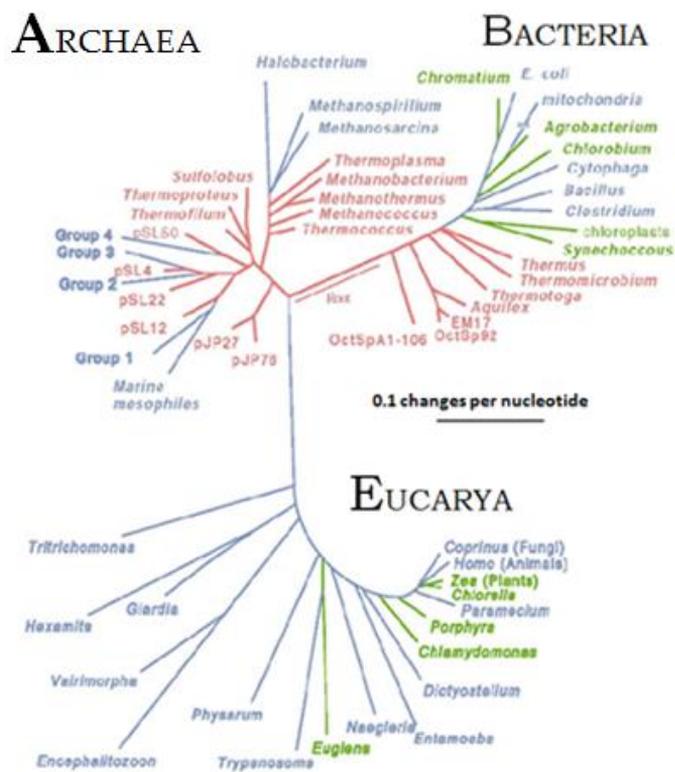


Figura 1.1. Árbol filogenético universal basado en la comparación de las secuencias de genes 16SrRNA. (Jill *et al.*, 2004).

Con los estudios basados en la comparación de secuencias de rRNA se pudo establecer un árbol filogenético que puede ser usado para relacionar todos los organismos, así como para reconstruir la historia de la vida. El rRNA nos da la información necesaria para organizar a los distintos

organismos de otro modo como podemos ver en el árbol filogenético (Figura 1.1).

Para la confección de este árbol se ha teniendo en cuenta las distancias evolutivas entre los distintos organismos, se observan tres dominios o grupos primarios: *Archeae*, *Bacteria* y *Eucarya*. En estos tres dominios podemos observar que las *Archeae* y *Bacteria* son ambas procariontas, no por ello están más emparentadas, pues de hecho lo están mucho más *Archeae* y *Eucarya* a pesar de diferencias a priori insalvables (Madigan *et al.*, 2004).

1.3.2. RNA ribosómico

Los ribosomas fueron vistos por primera vez por Albert Claude a finales de los años 30, en homogenados celulares por microscopía de campo oscuro, En 1955, Paul Zamecnik demostró que los ribosomas son el lugar donde se produce la síntesis de proteínas.

El ribosoma 70S se compone de dos subunidades desiguales en tamaño, con valores de sedimentación (Svedbergs) de 30S y 50S. La subunidad pequeña (30S) consiste en una molécula de rRNA 16S y 21 proteínas diferentes, mientras la subunidad grande (50S) contiene una rRNA 5S y otra de rRNA 23S, con 31 proteínas diferentes (Figura 1.2). El rRNA 16S de *E. coli* consiste en 1542 nucleótidos, de cuales el 46% están apareados entre sí. Esta molécula posee 4 dominios en su estructura secundaria.

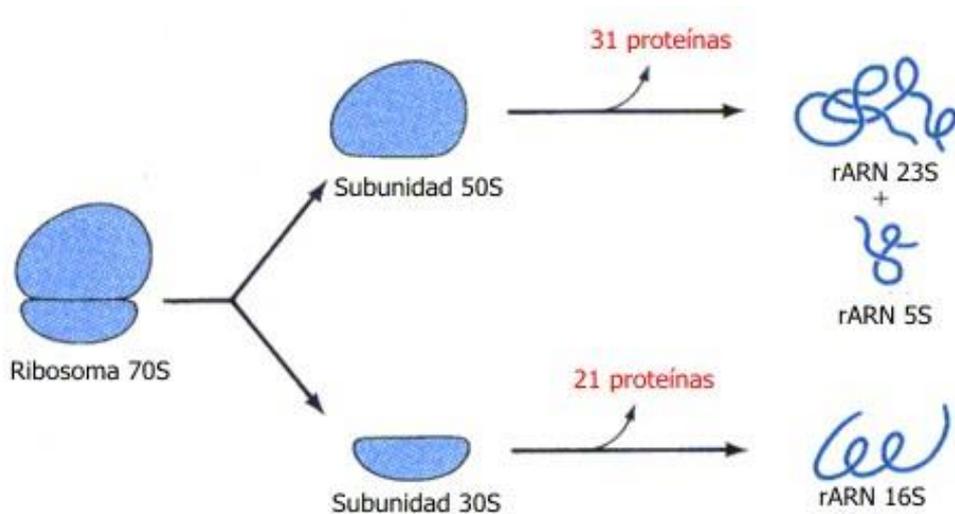


Figura 1.2. Estructura del ribosoma 70S. Copyright 2003-2013 (GuateQuímica).

Debido a que los ribosomas son críticos para la función celular e interactúan con un gran número de otras moléculas, incluyendo el RNA mensajero (mRNA) y el RNA de transferencia (tRNA), las secuencias de las moléculas de rRNA están altamente obligadas y se han conservado notablemente a través de la evolución. Además, las secuencias de los genes que codifican para el rRNA, se encuentran dentro de las más altamente conservadas ya identificadas.

Estas estructuras primarias están compuestas por regiones alternadas de alta y baja variabilidad. Las regiones con secuencias variables contienen información de bajo nivel filogenético, mientras que las regiones con secuencias conservadas contienen información de los eventos evolutivos más tempranos. Así mismo, existe una gran cantidad de copias de rRNA en una bacteria que esté en fase de crecimiento. De esta forma, el rRNA es un

excelente marcador molecular para la reconstrucción de la mayoría de las relaciones filogenéticas (Clarridge, 2004).

La comparación de las secuencias del 16S rRNA, ha facilitado en gran medida la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables. Consecuentemente, estas pueden ser utilizadas para determinar relaciones taxonómicas entre especies que presentan poca interrelación en su DNA.

Inicialmente se realizaron estudios de secuenciación del 16S rRNA, extendiéndose posteriormente, al 23S rRNA. Las secuencias nucleotídicas constantes del 16S rRNA presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los cebadores y así aplicar de forma más fácil la técnica de secuenciación (Figura 1.3).

La secuenciación completa del 5S rRNA, debido a su pequeño tamaño, es más rápida y económica que las anteriores, e incluso la secuenciación de determinados fragmentos del 5S rRNA puede proporcionar una información adecuada. Sin embargo puede darse la situación de que dos microorganismos pertenecientes al mismo género pueden poseer entre 114-116 pb comunes del total de los 118-120 pb que contiene el 5S rRNA (Stackebrandt *et al.*, 1993).

Esta situación hizo que se estableciera un debate sobre cuál es el análisis más adecuado para establecer relaciones filogenéticas. El análisis del 16S rRNA parece ser el más adecuado con seres procariontes, ya que contienen unos 1540 pb frente a los 118-120 del 5S rRNA, por lo que pequeñas diferencias en los nucleótidos del 5S rRNA afectan mucho más al resultado final que el caso del 16S rRNA (Clarridge, 2004).

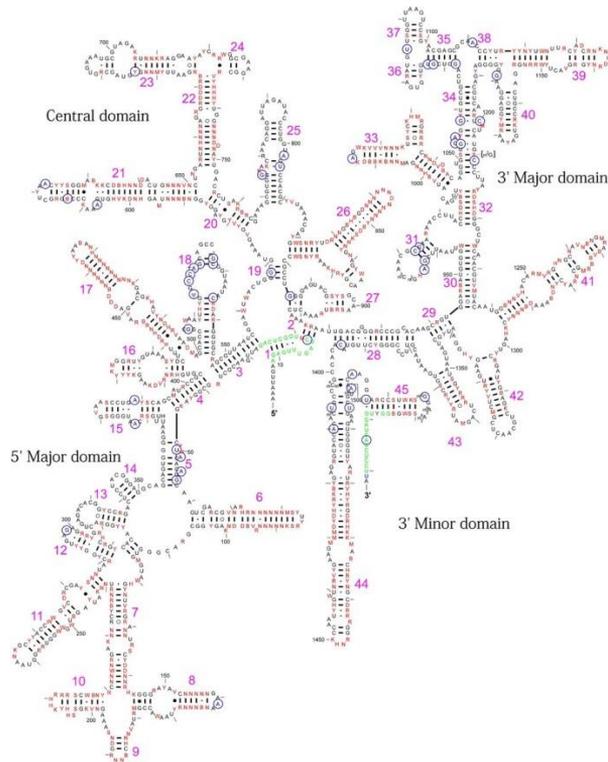


Figura 1.3. Gen 16S rRNA de la *Escherichia coli* (Kiitahara et al., PNAS 2012).

Durante muchos años, la secuenciación del gen 16S rRNA ha servido como una importante herramienta para determinar las relaciones filogenéticas entre las bacterias. Las características de este procedimiento molecular hacen que sea una herramienta útil para el estudio filogenético, pero también para la detección e identificación bacteriana en pacientes con sospecha de enfermedad bacteriana, y más recientemente esta tecnología se está aplicando en el laboratorio clínico para la identificación rutinaria de aislados bacterianos (Patel, 2001).

Varios estudios han demostrado que la identificación de secuencias es útil para aquellas bacterias de crecimiento lento, e inusuales, así como para

las bacterias que son difíciles de diferenciar por métodos convencionales. En la actualidad existen un gran número de reactivos comerciales disponibles. Del mismo modo, hay un creciente número de bases de datos públicas (Balduz, 2001).

La secuenciación del rRNA es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas, debido a que la molécula de 16S rRNA contiene regiones altamente variables, es usualmente posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias.

La caracterización filogenética de los organismos es más que un ejercicio de taxonomía, puesto que las relaciones evolutivas están establecidas en una forma creíble y cuantitativa. Se espera que los organismos cercanamente relacionados sean similares en sus propiedades bioquímicas generales; por el contrario, la diversidad en las secuencias de rRNA indica diferencias bioquímicas potenciales.

Las oportunidades para el descubrimiento de nuevos organismos y el desarrollo de los recursos basados en la diversidad microbiana son mayores que antes. Las secuencias moleculares finalmente han dado a los biólogos microbianos un camino para definir su campo de estudio, mediante la filogenia molecular. Las secuencias también son las bases de las herramientas que permitirán explorar la distribución y el papel de los organismos en el ambiente.

Finalmente, podemos decir que la utilización del análisis del 16S rRNA posee múltiples aplicaciones, desde lo molecular hasta lo ambiental, y al parecer es un método que perdurará todavía muchos años más, sobretodo en

estudios en el ámbito de la evolución. Con el uso de la secuenciación del 16S rRNA, se han descrito 215 especies bacterianas nuevas, 29 de las cuales pertenecen a nuevos géneros y se han descubierto a partir de muestras humanas en la última década. El mayor número de nuevas especies que han sido descubiertas pertenecen a los géneros *Mycobacterium* (con un total de 12) y *Nocardia* (con un total de 6) (Woo *et al.*, 2008).

1.3.3. Análisis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar más de un millón de veces un DNA obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho descubrimiento.

El término *sistemática molecular* es utilizado para referirse al uso del DNA y del RNA para inferir relaciones de parentesco entre los organismos. Los análisis moleculares de DNA implican desde la PCR al análisis bioinformático entre otros métodos (Figura 1.4).

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis *in vitro*

de DNA la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq* polimerasa. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85°C).

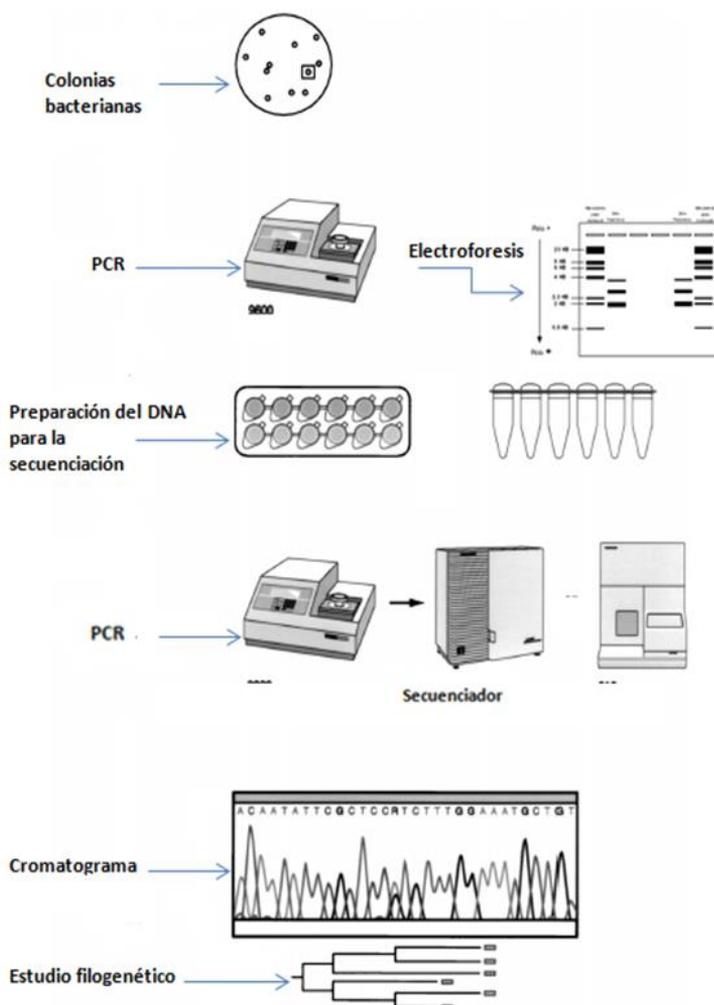


Figura 1.4. Pasos de la investigación por métodos moleculares y bioinformáticos.
(*Journal of Clinical Microbiology*, Dec.1998 Vol. 36 nº 12).

A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones

G+C. La temperatura óptima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al DNA.

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos:

1.3.3.1. Desnaturalización

Para que comience la reacción es necesario que el DNA molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra, la temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el DNA solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, impidiendo así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión.

1.3.2.2. Hibridación

Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el DNA está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40°C y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing (T_m ,

“melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. La longitud de los primers y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación. Una fórmula simple para calcular T_m es la Regla de Wallace:

$$T_m = [4(G+C) + 2(A+T)] - 5$$

No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de annealing específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa. La temperatura de anidado de los cebadores depende en parte de las sales presentes en el tampón de PCR.

1.3.3.3. Extensión

Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de DNA previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2 Kb.

Un factor importante en el transcurso de las diferentes fases es el tiempo de rampa. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del termociclador, aparato donde se realiza automáticamente este proceso. En las

nuevas generaciones de termocicladores este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo.

1.3.4. Variantes de la PCR

Existen diversas variantes de la PCR, a continuación detallamos algunas de las más empleadas:

1.3.4.1. *Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)*

La Técnica de AFLP, consiste en la combinación de los métodos de la PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la secuencia de DNA que comprende los sitios de corte de las enzimas de restricción. Este cambio se percibe como un patrón diferente, en número y tamaño, de bandas generadas.

El amplificado de polimorfismos de longitud de fragmento (AFLP) es una técnica basada en la PCR que utiliza la amplificación selectiva de un subconjunto de fragmentos de DNA digeridos para generar y comparar las huellas genéticas únicas para genomas de interés (Vos *et al.*, 1995).

El poder de este método se basa principalmente en que no requiere información previa sobre el genoma dirigido, así como en su alta reproducibilidad y sensibilidad para la detección de polimorfismo en el nivel de secuencia de DNA.

Es ampliamente utilizado para los estudios de plantas y microorganismos, la AFLP se utiliza para una variedad de aplicaciones, tales como: evaluar la diversidad genética dentro de cada especie o entre especies estrechamente relacionadas, para inferir filogenias a nivel de población y los patrones biogeográficos, para generar mapas genéticos.

Se han desarrollado variaciones de la metodología AFLP para la focalización de niveles adicionales de la diversidad, como la variación transcriptómica y polimorfismo de la metilación del DNA (Paun *et al.*, 2012).

La técnica AFLP ha sido exitosa para generar marcadores moleculares que son aplicados en estudios genéticos en una amplia gama de disciplinas, incluyendo genómica de organismos cultivables, donde ha aportado importantes avances para la domesticación de especies acuícolas. (Montaño-Perez *et al.*, 2006).

1.3.4.2. *Asymmetric PCR*

La PCR asimétrica es una variante de la PCR convencional que consiste en la amplificación preferencial de una de las cadenas del DNA diana. La PCR asimétrica se utiliza para amplificar preferentemente una cadena del DNA original más que la otra. En la PCR asimétrica el producto predominante es un DNA monocatenario, con primers de concentraciones desiguales.

A medida que avanza la PCR asimétrica, el cebador con concentración más baja se incorpora cuantitativamente en el DNA de doble cadena. El cebador de mayor concentración sigue al cebador de síntesis de su cadena.

1.3.4.3. Colony PCR

Esta PCR consiste en analizar colonias bacterianas, con el fin de rastrear aquellas colonias que contienen la secuencia nucleotídica deseada.

Es un método de alto rendimiento conveniente para determinar la presencia o ausencia de DNA de inserción en construcciones o transformación de copias de plásmido o para modificaciones genéticas específicas, como la interrupción de genes. Los fragmentos que se pueden obtener mediante la PCR pueden ser de unos 3.2 kb. Este método de Colony-PCR se llevó a cabo para la identificación de mutantes de interrupción específicas de *Aspergillus niger* y *Beauveria bassiana* (van Zeijl *et al.*, 1998).

1.3.4.4. Differential Display-PCR (DD-PCR)

Es un método que consiste en la identificación de genes expresados de manera diferencial mediante la comparación de secuencias de DNAc amplificadas por la PCR. Esto permite una detección sensible, rápida y precisa de eventuales modificaciones en el patrón expresión génica.

La PCR de transcripción inversa (DDRT - PCR) es un método basado en una PCR que permite un extenso análisis de la expresión génica entre varias poblaciones de células. Existen varias limitaciones y desventajas de este procedimiento que se han descrito, incluyendo el gran número de resultados de falsos positivos y la dificultad para confirmar la expresión diferencial. Las modificaciones que simplifican el tiempo de reacción, permiten el uso de pequeñas cantidades de ARN, o dirección han sido reportados en especies o inusuales secuencias de genes específicos. La DDRT - PCR se ha utilizado para

abordar cuestiones biológicas en sistemas de mamíferos, incluyendo la diferenciación celular, la activación celular, el estrés celular, y la identificación de dianas de medicamentos.

En la patología microbiana y la patología de las plantas, la DDRT - PCR ha permitido la identificación de factores de virulencia, genes implicados en la muerte celular, y los genes de señalización. En *Candida albicans*, los estudios de DDRT - PCR identificados TIF - 2 , que pueden desempeñar un papel en la regulación al alza de las fosfolipasas, y los genes relacionados con el estrés, CIP1 y CIP2 .

En *Histoplasma capsulatum* y *C. albicans*, los genes implicados en la interacción huésped-patógeno, incluyendo un miembro de la familia 100 - kDa en *Histoplasma capsulatum* y un gen ALS y 14-3-3 en *Candida albicans*, fueron potencialmente identificados por medio de DDRT - PCR. Aunque muy pocos informes han sido publicados en Micología médica (Sturtevant, 2000).

1.3.4.5. Degenerate PCR

Variante que se diferencia de una PCR estándar en que utiliza una mezcla de primers de secuencias degeneradas en vez de un par de iniciadores de secuencia única. Permite amplificar genes "nuevos" y/o familias mutigénicas y es una herramienta muy importante en estudios evolutivos a nivel molecular.

Numerosos brotes de gastroenteritis se han asociado con el virus de Norwalk (SRSV). Estos virus de una sola cadena de RNA, recientemente clasificado en el Caliciviridae, se han dividido en tres genogrupos. Relaciones

antigénicas también se han establecido entre las diferentes cepas. Como el virus es muy difícil cultivar *in vitro*, la detección de virus depende principalmente de la microscopía electrónica, análisis inmunológicos o la detección molecular. Se ha realizado un estudio genético de la región de RNA polimerasa de 40 cepas de SRSV. La mayoría de los cebadores descritos en la literatura amplifican secuencias de la región de la RNA polimerasa viral, la más conservada del genoma. Los cebadores más ampliamente utilizados son los descritos por Le Guyader (Le Guyader *et al.*, 1996). A pesar de numerosos esfuerzos por desarrollar cebadores universales o degenerados que pudiesen detectar todas las cepas de calicivirus humanos circulantes, este objetivo no se ha logrado.

La RT-PCR está permitiendo diagnosticar no sólo los casos clínicos de infecciones por calicivirus, sino también detectarlos en muestras ambientales, agua y alimentos.

1.3.4.6. *Hot start PCR*

El inicio de la reacción de la PCR comienza con una temperatura elevada con el fin de evitar la amplificación de productos inespecíficos. Generalmente esto se logra mediante el empleo de una enzima de DNA polimerasa que solo se activa a altas temperaturas.

La Hot Start PCR, es una técnica que cada vez se están utilizando más para mejorar el rendimiento de la PCR. Existen diferentes protocolos de activación Hot Start. Los resultados presentados demuestran que todos los protocolos mejoran significativamente la especificidad de los de ciclos térmicos tradicionales (Paul *et al.*, 2010).

1.3.4.7. *Inverse PCR (PCR Inversa)*

Variación de la PCR que permite realizar una amplificación de las regiones flanqueantes de un fragmento de DNA que solo se conoce su secuencia interna. La técnica de la PCR Inversa (IPCR) ha demostrado ser muy útil para la amplificación de los tramos no caracterizados de DNA aguas arriba (5') o aguas abajo (3') de las regiones que ya han sido clonadas y secuenciadas. Se han realizado trabajos combinando la de PCR de largo recorrido, en estos trabajos se demuestra la utilidad de la PCR (LR-IPCR) en la hibridación mediante la generación de clones que contienen largos tramos de regiones flanqueates de DNA (Benkel *et al.*,1996).

1.3.4.8. *In situ PCR.*

La PCR *in situ* consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Es realizada sobre preparaciones fijas en un portaobjetos. En la técnica de la PCR *in situ* se realiza una primera amplificación de DNA blanco y luego la detección mediante hibridación *in situ* convencional con sondas de DNA/RNA. De esta manera pueden detectarse cantidades pequeñísimas de genoma. Esta tecnología es de gran alcance en la capacidad de amplificar específicamente una población de secuencias de menor representación (Aldan *et al.*, 1998).

La presencia de virus del herpes simple (HSV- 1) en los ganglios trigéminos de ratones infectados de forma latente se detectó por medio de una reacción *in situ* de la cadena de DNA de la polimerasa (PCR), que incluye una

etapa de hibridación de ADN (indirecta PCR in situ). Los resultados sugieren que la PCR in situ es un método eficaz para localizar y detectar HSV - 1 dentro de las neuronas infectadas de forma latente (Anand *et al.*, 1995).

1.3.4.9. Long PCR.

Reacción de amplificación que permite generar un producto, de miles de pares de bases, más extenso que mediante una PCR convencional.

Esta reacción en cadena de la polimerasa se utiliza para amplificar hasta 22 kb de la agrupación de genes 3-globina a partir de DNA genómico humano y de hasta 42 kb de fago, donde se utilizó un DNA polimerasa termoestable. La reacción se realizó siguiendo el protocolo de "long PCR" que mantienen la especificidad requerida para los objetivos en genómica del DNA mediante el uso de niveles más bajos de polimerasa y de temperatura , condiciones para hibridación de cebadores específicos (Cheng *et al.*, 1994).

1.3.4.10. Mutiplex PCR

Variante de la técnica de la PCR donde se emplean dos o más pares de primers en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de DNA.

Mediante la PCR se amplifica simultáneamente más de una secuencia. Para ello, se combinan dos o más pares de cebadores en un mismo tubo, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes, para amplificar simultáneamente varios segmentos de DNA. Tiene la ventaja de que se obtiene información sobre varios locus en una sola reacción, se emplea

menor cantidad de DNA molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de bases de datos. Las desventajas, es que para llevarla a cabo adecuadamente y sin errores, se requiere de una cuidadosa optimización del proceso.

Se ha demostrado que la PCR- multiplex puede lograr una alta tasa de éxito (92%) para la amplificación de secuencias en condiciones de reacción estandarizadas, con una especificidad de la PCR comparable a la de los métodos de PCR convencionales.

Multiplex-PCR es ampliamente aplicable a la genómica de plantas y puede ser transferible a cualquier especie animal o vegetal (Hayden *et al.*, 2008).

1.3.4.11. *Nested PCR (PCR anidada)*

Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de primers en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región más extensa del DNA, que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica.

Técnica muy sensible de la PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, es decir, cuando tenemos el primer amplicón se pueden unir los

cebadores y se hace de nuevo una amplificación dentro del amplicón inicial. Este tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. La especificidad aumenta porque se produce una amplificación de un amplicón obtenido previamente, los cebadores sólo van a hibridar en un sitio dentro de la molécula y el resultado será una única banda. Así, evitamos posibles hibridaciones inespecíficas de los cebadores. La desventaja de esta técnica es que no nos permite cuantificar la muestra.

En este trabajo se estudió la sensibilidad de un método de detección de VIH proviral basado en una metodología de PCR anidada cualitativa como ayuda diagnóstica para infección por VIH neonatal. Para ello se estudiaron treinta pacientes con serología positiva VIH, con bajo recuento de linfocitos CD4 y, como control de número de copias capaces de detectar, se utilizó la línea linfoidea 8E5.

Se amplificaron por Nested PCR dos regiones específicas del gen *gag* VIH. Como control de purificación y estado de conservación de la muestra se amplificó una región del gen constitutivo de β -globina. En los treinta casos se obtuvo amplificación gen *gag* de VIH para las dos regiones y para el control de β -globina y, para la línea 8E5, se obtuvo positividad para las tres bandas aun en el caso de sólo diez copias de VIH proviral.

Se demuestra un alta sensibilidad para esta metodología *in house*, que la hace apta para su aplicación en diagnóstico pediátrico a un costo accesible para instituciones públicas (Kairiyama *et al.*, 2007).

1.3.4.12. *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment PCR-RFLP*

Técnica que consiste en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por la PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos.

Análisis de la PCR-polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) también conocido como troceados de secuencia polimórfica amplificada (CAPS), es una técnica popular para el análisis genético. Se ha aplicado para la detección de la variación entre especies (Berget *et al.*, 2012).

Existen varias técnicas que están relacionadas con la PCR-RFLP y también implican electroforesis en gel incluidas las técnicas de fingerprinting (huella genética) de DNA y perfiles de expresión.

1.3.4.13. *Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)*

Es un proceso donde los productos de la PCR son desnaturalizados en cadena simples de DNA, luego renaturalizados para favorecer los apareamientos intracatenarios y finalmente analizados en un gel de Poliacrilamida. Con esto, la estructura de cada hebra de DNA de un amplicón adoptará una conformación específica, dependiendo de la secuencia nucleotídica que afecta a su migración en el gel. Así dos productos de la PCR con diferencias puntuales en su secuencias presentaran distintos patrones electroforéticos de los fragmentos de DNA monocatenarios (Hayashi *et al.*, 1992).

1.3.4.14. *Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Amplificación aleatoria de DNA polimórfico.*

Es una técnica que permite la amplificar regiones anónimas de DNA mediante el empleo de iniciadores (primers) arbitrarios.

La amplificación aleatoria de DNA polimórfico, más conocida por el acrónimo inglés RAPDs, es un tipo de marcador molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa.

Se realizó un estudio prospectivo, de seguimiento de una población de pacientes con fibrosis quística. Se utilizó la técnica de la amplificación del DNA empleando la PCR con bajas condiciones de especificidad (*Random amplified polymorphic DNA, RAPD-PCR*) para la amplificación del DNA de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de lavados broncoalveolares de cinco pacientes con fibrosis quística, dando resultados óptimos para la identificación mediante la caracterización genotípica de las cepas de *P. aeruginosa* (Ortiz-Herrera *et al.*, 2004).

1.3.4.15. *Real Time PCR (Q-PCR)*

Descrita originalmente con el nombre de “Kinetic PCR” por Higuchi (Higuchi *et. al* 1993). Una variante de la PCR convencional que se basa en la detección y cuantificación simultanea de la fluorescencia emitida por los productos de la PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación.

La reacción de la PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de DNA o ARN presente en la muestra original, o para

identificar con una muy alta probabilidad, muestras de DNA específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m). Se puede dividir en las técnicas basadas en fluorocromos no específicos y en las técnicas basadas en sondas específicas.

En las técnicas basadas en fluorocromos el DNA, que se ve multiplicada su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización. Es mucho más económica que la que usa sondas específicas.

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*); cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen (Costa, 2004).

La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción de la PCR realizada en tiempo real (Q-PCR), que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación del DNA al final de

un número predeterminado de ciclos, con Q-PCR esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de DNA formada.

La PCR en tiempo real ha revolucionado la forma de trabajo en laboratorios de microbiología clínica para diagnosticar muchas infecciones microbianas humanas. Este método de ensayo combina la química de detección de la PCR con sonda fluorescente de producto amplificado en el mismo recipiente de reacción. En general, tanto la PCR y la detección del producto amplificado se completan en una hora o menos, que es considerablemente más rápido que los métodos convencionales de detección de la PCR. La combinación de sensibilidad y especificidad, con el bajo riesgo de contaminación, y la mayor velocidad ha hecho que la tecnología de la PCR en tiempo real sea una alternativa atractiva a los métodos de prueba basados en inmunoensayos para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas (Espy *et al.*, 2006).

1.3.4.16. RT-PCR

Variante de la PCR donde primero se realiza una Transcripción reversa a partir de RNA para sintetizar el DNA complementario que luego es amplificado mediante una PCR convencional.

La RT-PCR es sinónimo de Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción inversa. Es una técnica usada en los estudios genéticos que permite la detección y cuantificación de RNAm. Se trata de un método muy sensible que muestra un gen específico y se expresa en una muestra dada. RT-PCR es una prueba muy importante en el ámbito de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM), ya que ofrece a los investigadores un mecanismo para comprobar si cualquier gen específico está activo o inactivo.

Esto permite a los investigadores identificar los beneficios de los organismos genéticamente modificados con respecto a sus contrapartes "naturales" y la búsqueda de diferencias significativas en las que se expresan los genes en los dos tipos de organismos (Bustinet, 2002).

La PCR de Transcripción reversa consta de tres pasos:

- Retrotranscripción a partir del RNA.
- Amplificación a partir de la primera hebra de DNAc.
- PCR estándar.

1.3.4.17. *Touchdown (TD)*

Esta técnica ofrece un medio sencillo y rápido para optimizar la PCR, lo que aumenta la especificidad, sensibilidad y rendimiento, sin necesidad de largas optimizaciones y / o el rediseño de cebadores. La TD-PCR emplea una temperatura inicial de recocido por encima de la temperatura de fusión establecida (T_m) de los cebadores que se utilizan, a continuación, se realiza

una transición progresiva hasta alcanzar una temperatura de recocido más permisiva inferior a lo largo de ciclos sucesivos (se reduce en 1°C cada ciclo).

Cualquier diferencia en T_m entre el recocido correcto e incorrecto producirá una ventaja exponencial doble por ciclo. La técnica de TD-PCR ha encontrado una amplia aplicación en protocolos de PCR estándar, incluyendo la transcriptasa inversa dependiente de la PCR. TD-PCR es particularmente útil para templates que son difíciles de amplificar, pero también se puede utilizar de forma estándar para mejorar la especificidad y la formación de producto. El procedimiento tarda entre 90 y 120 min, dependiendo de la longitud del template (Korbie *et al.*, 2008).

1.3.4.18. PCR de suicidio

Se utilizan primers que son usados solamente una vez, dirigidos a un gen nunca amplificado con anterioridad en el laboratorio. No se utiliza control Positivo.

Se cree que en la época medieval, la Muerte Negra ha sido la responsable de haber matado a un tercio de la población de Europa occidental durante el siglo XIV. Para establecer si el organismo causante de la plaga era la *Yersinia pestis*, agente causal de la peste. Se obtuvieron los dientes de un niño y dos adultos en una tumba del siglo XIV en Francia, se les extrajo la pulpa, y se le aplicó el nuevo protocolo de "PCR de suicidio" en el que los cebadores se utilizan sólo una vez. No hubo controles positivos, ni se introdujo en el laboratorio ni *Yersinia* ni DNA de *Yersinia*. Un resultado negativo es seguido por una nueva prueba utilizando otros cebadores; un

resultado positivo es seguido por una secuenciación. El segundo y tercer par de cebadores utilizado, para codificar una parte del gen PLA (gen activador del plasminógeno), amplicones generados cuya secuencia confirmó que se trataba de *Y. pestis* en un diente de los dientes del niño y en 19 de los 19 de los adultos. Los intentos de detectar la supuesta alternativa de agentes etiológicos de *Bacillus anthracis* y *Rickettsia prowazekii* fracasaron. La PCR de suicidio evita cualquier riesgo de contaminación, ya que utiliza un solo disparo de imprimación, su especificidad es absoluta. Con lo que se puso fin a la controversia, demostrando que la Muerte Negra era la peste (Raoult *et al.*, 2000).

1.4. TAXONOMIA MICROBIANA

1.4.1. Introducción a la Bioinformática

Con la rápida acumulación de datos moleculares, proporcionados por los procedimientos de secuenciación, principalmente secuencias de proteínas o de DNA provenientes de diversos organismos, el estudio de la evolución a nivel molecular ha requerido el uso intensivo de los ordenadores, que permiten el manejo de grandes cantidades de información.

La Bioinformática, es una disciplina que surge de la interacción entre físicos, químicos, matemáticos y biólogos para solucionar, en principio, problemas de cálculo con información biológica, más tarde, problemas con almacenamiento y análisis de grandes cantidades de datos extraídos de

organismos y más recientemente se ha transformado en una disciplina con líneas propias de investigación (Figura 1.5).

Este campo interdisciplinario comprende la investigación y desarrollo de herramientas útiles para llegar a entender el flujo de información desde los genes a las estructuras moleculares, a su función bioquímica, a su conducta biológica y, finalmente, a su influencia en las enfermedades y en las características agronómicas.

Por lo tanto es una disciplina científica que se interesa por todos los aspectos relacionados con la adquisición, almacenamiento, procesamiento, distribución, análisis e interpretación de información biológica, mediante la aplicación de técnicas procedentes de las matemáticas, de la física, de la biología y de la informática, con el propósito de comprender el significado biológico de una gran variedad de datos.

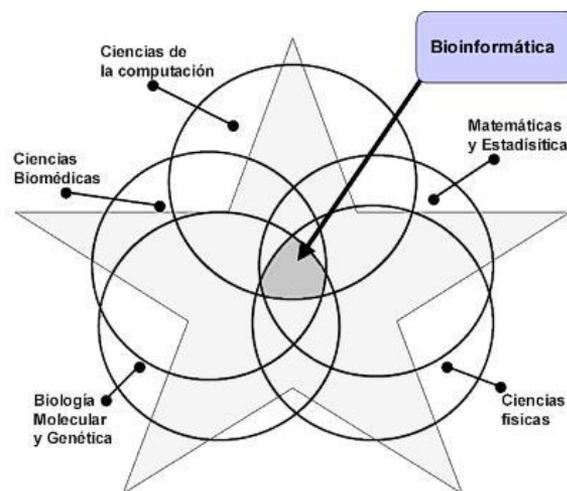


Figura 1.5. Interacción entre las ciencias para crear la Bioinformática.
Primer Congreso Internacional de Bioinformática. (ACIMED v.12 n. 4 ago. 2004).

Uno de los aspectos de la Bioinformática es asegurar que los resultados experimentales se almacenen de una manera ordenada, de modo que los científicos de todo el mundo puedan sacar el mayor provecho. Otro de los aspectos es el uso de los datos recogidos, para poder procesarlos de diversas formas con el fin de crear nuevas teorías y discernir los nuevos conocimientos sobre distintas entidades biológicas, como la búsqueda de nuevos genes o explicar los mecanismos de infección por un agente infeccioso.

Darwin, autor de los fundamentos de la teoría de la evolución actual, nos sugiere una forma de aproximarse a ciertos problemas, que Douglas Futuyma la resume así: *“Darwin propuso una hipótesis (p.ej. selección natural), dedujo predicciones de qué deberíamos ver si fuera verdadera o falsa, y juzgó su validez comparando observaciones con las predicciones. Este método hipotético-deductivo ahora es usado ampliamente en ciencia”* (Futuyma, 1998).

Es en este método hipotético-deductivo donde el análisis bioinformático se vuelve fundamental. Es una lente a través del cual podemos observar la información presente en grandes volúmenes de datos. Tomemos un ejemplo frecuente: establecer las relaciones filogenéticas de un conjunto de especies biológicas y su parentesco evolutivo. Si partimos de la hipótesis que si dos especies son cercanas filogenéticamente, entonces deben tener una secuencia de DNA similar. A partir de esta hipótesis, deberíamos observar si las especies de verdad están relacionadas. Esto lo podemos comprobar seleccionando segmentos adecuados de DNA de las dos especies y debemos observar similitud entre las secuencias.

Para observar que dos secuencias son similares, tendremos que proceder a los alineamientos que nos proporciona la identificación de correspondencia residuo a residuo. Cualquier asignación de correspondencias que preserve el orden de los residuos dentro de las secuencias es un alineamiento. (Lesk, 2002).

Si los residuos de una secuencia tienen un alto grado de correspondencia con residuos de la otra secuencia, son similares y por tanto su cercanía evolutiva es probable. Hacer estas comparaciones a mano es complicado y poco práctico. Por medio de internet podemos acceder a diversos programas informáticos de alineamiento que permiten visualizar la similitud de las dos cadenas. Dado que el DNA se puede escribir como una cadena de texto en un alfabeto de cuatro letras y las proteínas se pueden codificar usando un alfabeto de 20 letras, esto hace posible usar las mismas herramientas que han desarrollado los ingenieros de sistemas y los matemáticos, para fines biológicos.

Existen varios métodos de alineamiento disponibles, saber escoger el método es de suma importancia, pues cada uno parte de supuestos diferentes.

1.4.2. Análisis de secuencias

En Bioinformática, un alineamiento de secuencia es una manera de organizar las secuencias de DNA, RNA, o proteína para identificar regiones de similitud. En el alineamiento de secuencias se determina si una secuencia de nucleótidos o aminoácidos (un gen o una proteína) está relacionada con otra. El grado de similitud es el grado de coincidencia entre dos secuencias que ocupan una posición particular en la secuencia y que puede ser

interpretado como una medida aproximada de cómo está conservada una región en particular.

1.4.3. Alineamientos

Los alineamientos nos sirven para la identificación de correspondencias residuo-residuo. (Lesk, 2002). En términos coloquiales, alinear dos secuencias es poner una junto a la otra de forma que se resalten las diferencias y similitudes, pero sin cambiar el orden de los residuos.

1.4.4. Alineamientos múltiples

Un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) es un alineamiento de tres o más secuencias biológicas, generalmente proteínas, DNA o RNA. En general, se asume que el conjunto de secuencias de consulta que se ingresa como entrada (conjunto problema) tienen una relación evolutiva por la cual comparten un linaje y descienden de un ancestro común. Del MSA resultante, se puede inferir la homología, y puede llevarse a cabo el análisis filogenético para evaluar los orígenes evolutivos compartidos por las secuencias (Notredame *et al.*, 2000). Las representaciones visuales del alineamiento ilustran mutaciones tales como mutaciones puntuales (un solo cambio de aminoácidos o nucleótidos) que aparecen como diferentes caracteres en una sola columna del alineamiento, y la inserción o supresión de mutaciones (o indeles) que aparecen como huecos en una o varias de las secuencias en la alineación. El alineamiento múltiple de secuencias a menudo se utiliza para

evaluar la conservación de los dominios proteicos, las estructuras terciarias y secundarias, e incluso aminoácidos o nucleótidos individuales.

Los alineamientos múltiples de secuencias también se refieren al proceso de alinearlas como un conjunto de secuencias. Como puede ser difícil alinear a mano tres o más secuencias de longitud biológicamente relevante, y casi siempre consume mucho tiempo, se utilizan algoritmos computacionales para producir y analizar los alineamientos.

Los MSA requieren metodologías más sofisticadas que los alineamientos de dos secuencias porque son computacionalmente más complejos de producir. La mayor parte de los programas de alineamiento múltiple de secuencias usan métodos heurísticos en lugar de optimización global, porque identifican el alineamiento óptimo entre todas las secuencias.

El principal problema que nos plantean los alineamientos múltiples es la posición de los gaps (huecos) en el alineamiento. En el alineamiento, todas las secuencias tienen que tener la misma longitud y eso se consigue introduciendo gaps. La posición de los gaps es diferente en cada comparación de secuencias, por lo que es necesario encontrar una solución óptima del alineamiento. Existen herramientas de alineamiento, las más usadas en bioinformática son: NCBI (Blast), ClustalW2 y la más reciente es CLC BIO. La primera nos permite encontrar secuencias similares a un "query" (secuencia problema) en una base de datos y la segunda y la tercera nos permite realizar alineamientos múltiples y, en algunos casos, hacer inferencias evolutivas.

1.4.5. Homología, similitud e identidad

“Similitud es la observación o medición de parecido y diferencia, independiente del origen de ese parecido. Homología es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo, por lo que descienden de un ancestro común “(Lesk, 2002).

En sentido estricto, la homología se refiere únicamente a un origen común entre dos caracteres. Por tanto, dos secuencias son homólogas o no homólogas, por lo que no hay ninguna situación intermedia.

Similitud, es una medida del parecido entre dos secuencias que puede cuantificarse (por ejemplo, mediante el porcentaje de identidad).

Si bien no se ha adoptado consistentemente esta diferencia de términos en la literatura científica (algunos autores siguen usando la palabra homología cuando se refieren a similitud), es conveniente hacerla. Dos secuencias pueden ser muy similares y sin embargo no ser homólogas (así como las alas de un murciélago y de una mariposa parecen iguales, pero no hay un ancestro común entre las mariposas y los murciélagos que tenga alas). De la misma manera, dos secuencias homólogas pueden haber divergido mucho en la historia evolutiva, haciéndolas poco similares.

El Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española define identidad “como la cualidad de lo idéntico”.

Dos secuencias son idénticas si son iguales residuo a residuo. Sin embargo, para secuencias que no son idénticas es útil tener una medida que nos diga lo alejadas que están. Para esto se hace un alineamiento entre las dos

secuencias. El porcentaje de identidad se calcula dividiendo el número de residuos que son idénticos por la longitud del alineamiento.

1.4.6. Filogenias

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas. Un análisis filogenético nos indica las relaciones evolutivas entre las especies, cuales descienden de ancestros comunes y cuáles son las distancias entre ellas.

La comparación de secuencias de algunas macromoléculas, es la forma más precisa y confiable para inferir en las relaciones filogenéticas. Estos datos son preferibles sobre otros métodos moleculares, debido a que permiten interpretaciones cuantitativas y directas, además que van conformando una creciente base de datos para siguientes referencias.

Los métodos filogenéticos reconstruyen árboles en los que las ramas y los nodos unen a los diferentes taxones. Estos taxones pueden ser especies, individuos, genes, etc. Al recorrer las ramas desde los nodos terminales hacia nodo original recorreremos la historia evolutiva de ese gen u organismo.

1.4.6.1. Alineamientos de secuencias como base de los árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos se pueden construir a partir de alineamientos múltiples de secuencias. En este caso estamos asumiendo que cada posición en el alineamiento es homóloga. Por lo tanto, construir un buen alineamiento es esencial para la resolución del árbol. La mayoría de los programas de alineamiento nos dan una solución subóptima (la mejor posible utilizando

pocos recursos del sistema), por lo tanto resulta conveniente revisar los alineamientos antes de realizar los árboles.

En general los problemas suelen acumularse en las regiones más variables en las que hay muchas sustituciones o muchos gaps. En estos casos podríamos estar incluyendo posiciones que no son homólogas con lo que estaríamos introduciendo una información no correcta en el análisis. Esta revisión de los alineamientos se ha realizado con programas desarrollados para tal fin.

Para la construcción de árboles filogenéticos a partir de métodos taxonómicos basados en secuencias, solamente una secuencia es requerida para identificar el organismo en términos de su tipo filogenético y además, el análisis por este método de ecosistemas microbianos es más que un ejercicio taxonómico, ya que las secuencias proporcionan herramientas experimentales (por ejemplo, sondas de hibridación molecular) que pueden ser usadas para identificar, observar y estudiar los ecosistemas microbianos.

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre todos los organismos vivos es uno de los retos fundamentales de la biología. Se han realizado numerosos intentos para realizar un árbol de la vida usando varios métodos que han sido publicados y cuestionados. Por otra parte, incluso bajo el supuesto de un árbol de la vida, numerosos grupos taxonómicos siguen siendo muy debatidos. Con la llegada de la biología molecular ha aumentado considerablemente la variedad de las clasificaciones en lugar de reducir el problema (Ciccarelli *et al.*, 2006).

En tres décadas de estudios de filogenia molecular, los investigadores han recopilado un robusto mapa de la evolución de la diversidad, enseñando que la principal fuente de la diversidad de vida es la microbiana, distribuida entre los tres grupos o dominios.

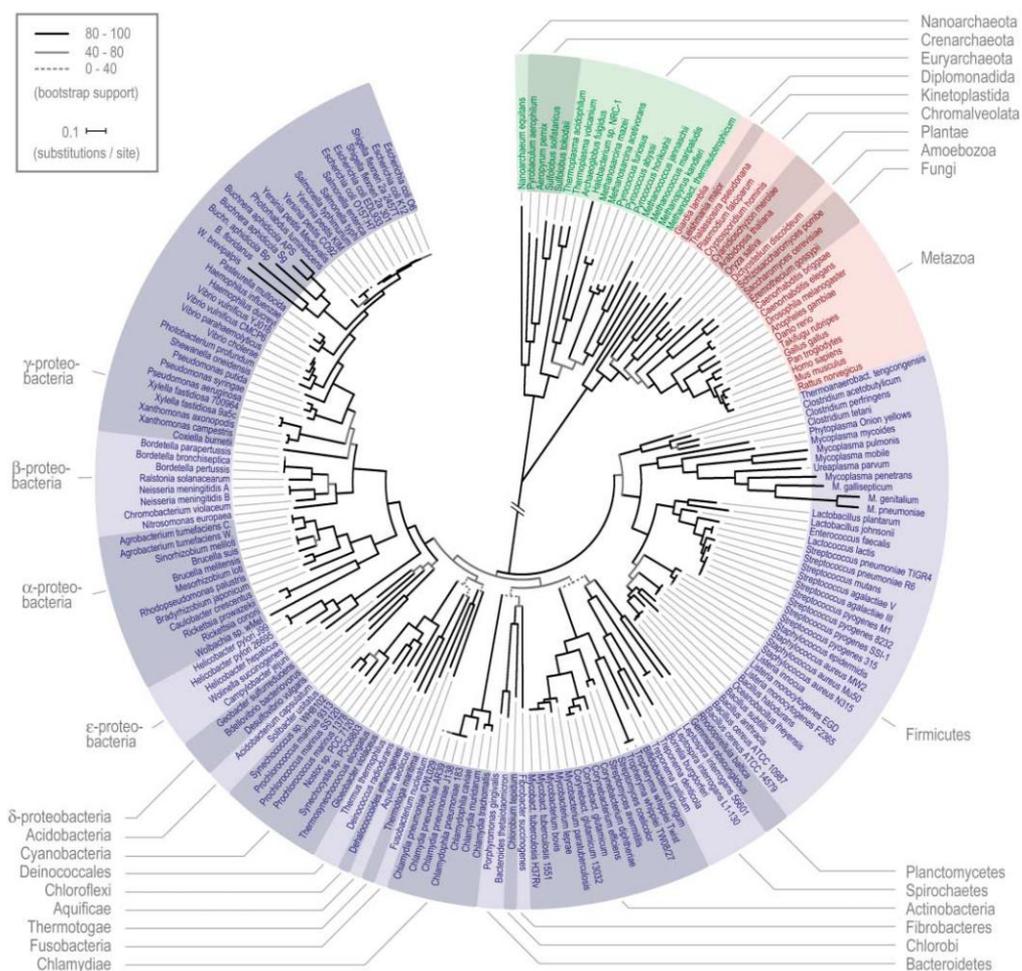


Figura1.6. Cladograma circular. El árbol de la vida, comparaciones que se deducen después de haber secuenciado genomas completos. (Science vol 311 march 2006).

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Las medidas de control de la calidad del agua se basan en el cumplimiento de los criterios sanitarios de las aguas de consumo humano, y de las instalaciones que permiten el suministro desde la captación hasta el grifo del consumidor, para garantizar, la calidad y la limpieza con objeto de proteger la salud de las personas de los posibles efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación de las aguas.

La desinfección se ha empleado con el fin de destruir o inactivar los organismos productores de enfermedades. La desinfección no implica necesariamente la destrucción completa de todos los organismos vivos, es decir, los procesos de desinfección del agua no siempre acaban en el punto de esterilización (Ramírez, 2005).

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido realizar un estudio de calidad del agua de abastecimiento en un centro público en base a la determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos.

A partir de este objetivo principal se han establecido otros objetivos necesarios para dar respuesta a las cuestiones que han ido surgiendo en el transcurso de la investigación como:

- Aislamiento e identificación de microorganismos en la red de abastecimiento de aguas.
- Estudio microscópico y bioquímico de las colonias aisladas.
- Identificación genotípica a través de métodos moleculares.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA

La importancia para la salud pública de las aguas destinadas al consumo humano hace necesaria la fijación de normas de calidad. Debe ser estéticamente aceptable y, por lo tanto, debe estar exenta de turbidez, color, olor y sabor desagradable. Puede ser ingerida o utilizada en el procesamiento de alimentos en cualquier cantidad, sin temor a efectos adversos (Gleicket, 2006). Para garantizar la calidad del agua de los puntos de muestreo se han seleccionado una serie de parámetros que nos indican alteración o presencia de materia orgánica. Las determinaciones físico-químicas de las muestras son las que a continuación se exponen (Tabla 3.1). Las muestras fueron recogidas por triplicado los lunes y viernes de la primera y cuarta semana de dos meses consecutivos.

PARÁMETRO	MÉTODO	PARAMETRO	MÉTODO
Temperatura	Termómetro 0-50°C	K ⁺	Fotometría de llama
pH	pH	Ca ⁺⁺	Complexometría
Conductividad	Conductivímetro	Mg ⁺⁺	Complexometría
Cloro libre	DPD*(HACH)	SO ₄ ⁼	Turbidimetría
Cloro combinado	DPD* (HACH)	Cloruros	Volumetría
Cloro total	DPD* (HACH)	CO ₃ H ⁻	Volumetría
Oxígeno disuelto	Electrométrico	CO ₃	Volumetría
Alcalinidad Total	Volumetría	Nitrato	Potenciómetro
TOC	Oxid. Infrarrojo	Nitrito	Potenciómetro
Na ⁺	Fonometría de llama		

Tabla 3.1. Parámetros físico-químicos seleccionados. DPD*. dietil-p-fenilendiamina.

3.1.1. Determinación del pH y la temperatura

La determinación del pH del agua se realizó mediante un método potenciométrico con el empleo de un pHmetro Crison 2000. El análisis se realizó por triplicado en cada punto de control. El equipo empleado permite la determinación simultánea de la temperatura.

3.1.2. Determinación de la conductividad

La conductividad es la magnitud inversa a la resistencia eléctrica, aumentando con la concentración de iones disueltos.

La conductividad, en $\mu\text{S cm}^{-1}$ se determinó mediante un conductivímetro Hanna, modelo EC215-02, siguiendo el procedimiento estándar dictado por la American Water Works (Rice *et al.*, 2012).

3.1.3. Determinación del cloro libre y total

Este método se basa en la determinación del cloro libre y total mediante la oxidación selectiva de dietil-p-fenilendiamina (kit comercial DPD de laboratorios HACH company) por parte de las distintas especies oxidantes que podemos encontrar en el agua, siguiendo el procedimiento estándar dictado por la American Water Works (Rice *et al.*, 2012).

Todos estos compuestos disueltos en el agua oxidan al DPD dando como resultado una coloración rosa que puede ser medida colorimétricamente a 530 nm. Para la lectura se utilizó un espectrofotómetro Hach DR 2000.

3.1.4. Determinación de oxígeno disuelto

La cantidad de oxígeno disuelto en agua se ha determinado mediante un método electrométrico que cuantifica la tasa de difusión del oxígeno molecular a través de una membrana plástica permeable al oxígeno. Para su determinación se ha empleado el equipo Crison HD 98569 siguiendo el procedimiento estándar dictado por la American Water Works (Rice *et al.*, 2012).

3.1.5. Determinación de la alcalinidad

Se define la alcalinidad total del agua como su capacidad para neutralizar ácidos y representa la suma de las bases que pueden ser tituladas. Dado que la alcalinidad de aguas superficiales está determinada generalmente por el contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, ésta se toma como un indicador de dichas especies iónicas.

La alcalinidad se determina por titulación con una solución estándar de un ácido mineral fuerte a los puntos sucesivos de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico (pH \approx 4.5-4.3). Para determinar la Alcalinidad total se emplea una mezcla de reactivos indicadores (anaranjado de metilo/verde bromocresol), siguiendo el procedimiento estándar dictado por la American Water Works (Rice *et al.* 2012).

3.1.6. Determinación de carbono orgánico total

El Carbono Orgánico Total (TOC), es la cantidad de carbono unido a un compuesto orgánico y se usa frecuentemente como un indicador no específico

de calidad del agua o del grado de limpieza de los equipos de fabricación de medicamentos. Por medio del TOC podemos ver la cantidad de dióxido de carbono que se genera al oxidar la materia orgánica en condiciones especiales. Un análisis típico del TOC mide tanto el carbono total (CT) presente como el carbono inorgánico total (CIT). Restando el Carbono inorgánico total del Carbono total obtenemos el Carbono orgánico total.

El método empleado para determinar el TOC se basa en una oxidación catalítica de la muestra sobre un catalizador de platino a 680°C en atmósfera rica en oxígeno. Como producto de la combustión se genera agua que vaporiza y se elimina mediante una posterior condensación. Otro producto es el carbono (orgánico e inorgánico) que se oxida a CO₂. Este dióxido de carbono se transporta empleando una corriente de aire y se mide mediante un detector de infrarrojos no dispersivo (NDIR) (Hendricks, 2007).

3.1.7. Determinación de sodio y potasio

La espectroscopia de emisión con llama es un método analítico basado en la medida de la energía radiante emitida por átomos (o iones o moléculas) de un elemento que se encuentra en estado de vapor.

A temperatura ambiente, todos los átomos de una muestra se encuentran esencialmente en el estado fundamental. Los átomos son elevados a un estado electrónico excitado térmicamente, es decir, a través de colisiones con los gases quemados en la llama. El tiempo de vida de un átomo en el estado excitado es breve y su vuelta al estado fundamental va acompañada de la emisión electromagnética y la longitud de onda de esa radiación está en

correspondencia con la diferencia de energía entre ambos estados (Na^+ emite a 589 nm y el K^+ a 766 nm). Mediante un sistema monocromador o de filtro se aísla la zona del espectro de interés y la intensidad de la señal emitida se mide con un sistema fotométrico adecuado. La correlación entre la intensidad de la señal y la concentración del elemento emisor en una solución permite la utilización de este fenómeno con fines cuantitativos. Si la emisión se produce por la transición desde el primer estado excitado al fundamental se obtienen las llamadas líneas de resonancia que son las más intensas y las que se utilizan generalmente en este método. El sodio y el potasio se midieron mediante fotómetro de llama ARCANO FP 640 (Díaz de Santos, 1992).

3.1.8. Determinación de calcio y magnesio

La determinación de iones metálicos mediante el método complexométrico, se fundamenta en la capacidad que tienen las complexonas de secuestrar un catión polivalente por una molécula orgánica (agente quelante) en proporciones estequiometrias, permitiendo realizar valoraciones volumétricas. Para cada catión metálico actúa un indicador específico, para el calcio el indicador es el ac. Calconcarboxílico y para el magnesio es negro de eriocromo (Díaz de Santos, 1992).

3.1.9. Determinación de cloruros

Un gran inconveniente de los cloruros es el sabor desagradable que comunican al agua, especialmente cuando se trata de cloruro sódico, este sabor puede ser menos pronunciado cuando está en presencia de calcio o magnesio.

La presencia de cloruros en el agua es de origen variado y se debe principalmente a los terrenos que atraviesa. El contenido de cloruros en aguas naturales suele ser inferior a 50 mg/l.

El método de Mohr es aplicable para la determinación de cloruros en aguas superficiales, potables y residuales de origen urbano o industrial.

Es una precipitación de aniones cloruros por adición de una solución de nitrato de plata en presencia de un indicador. En una solución neutra o ligeramente alcalina (pH 7-10) que contenga cromato, los cloruros se determinan con nitrato de plata, primero precipita el cloruro de plata y al llegar al punto de viraje se empieza a formar cromato de plata rojo (que corresponde al momento en que todos los iones cloruro están precipitados). Las muestras coloreadas o turbias deberán ser clarificadas (Díaz de Santos, 1992).

3.1.10. Determinación de nitratos y nitritos

Los nitratos aparecen en el suelo y en aguas superficiales y profundas como resultado de la descomposición natural, química o microbiana del material nitrogenado orgánico (proteínas vegetales, animales, excretas, sustancias químicas).

El método empleado es el potenciométrico mediante electrodo de nitrato o nitrito acoplado a un pHmetro Crison 2000, calibrado mediante soluciones de nitratos o nitritos. El sistema potenciométrico consiste en un electrodo selectivo de membrana de intercambio iónico líquido y un electrodo de

referencia Ag/AgCl. El electrodo de Ref. 96 62 / 96 62 S7 se acopla a un equipo de pH Crison 2000.

3.2. MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

3.2.1. Metodología básica microbiológica

El estudio microbiológico se realiza según norma UNE- EN ISO 6222 (Norma Europea 1999) y lo establecido en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero. La toma de muestras de agua se realizó de la siguiente forma: tras dejar correr el agua entre 3 y 5 minutos, se lavó el grifo con estropajo y jabón no iónico a pH neutro, flameándolo posteriormente y dejando correr el agua nuevamente durante unos 30 segundos a un minuto, recogiendo el agua en un recipiente previamente esterilizados en autoclave (121°C/15min).

Los medios empleados para el cultivo fueron:

- **Agar Nutritivo** (composición en g/l: Peptona de Gelatina 5.0; Extracto de carne 3.0 Agar Bacteriológico 15.0 Llevar a pH 6.8 ± 0.2); y medio
- **R2A**, (composición en g/l: Extracto de levadura 0.5; Caseína 0.5; Glucosa 0.5; Almidón 0.5; Fosfato dipotásico 0.3; Sulfato magnésico 0.024; Piruvato sódico 0.3; Agar 15.0).

Las muestras obtenidas se concentran 100 veces mediante un filtrador de membrana accionado por una bomba de vacío, utilizando filtros Isopore de 0.2 µm de poro que han sido previamente esterilizados. Los filtros son resuspendidos en 10 ml de agua estéril (Carteret, 1996). Se utiliza el método de siembra en profundidad en placa. Se coloca 1 ml en cada placa de Petri y se le

añade 15 ml del medio fundido y se mezcla mediante una suave rotación. Tras la siembra las placas se dejaron en reposo hasta su total solidificación.

Posteriormente las series de tres placas para Agar Nutritivo y otra serie igual de placas de R2A de las muestras obtenidas los lunes y viernes, fueron incubadas en estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. El periodo de incubación fue de 48 y 72 h (UNE-EN ISO 6222:1999). Al finalizar la incubación se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)(UNE-EN ISO 8199:2008). Además de los medios de cultivo se emplearon los siguientes materiales:

- Equipo de esterilización de calor húmedo (autoclave) Raypa. Mod. AES- 110 cod. 13310011
- Pipetas estériles desechables de 1 y 10 ml.
- Estufa de incubación Sanilabo, serie Incubat de 36L.
- Aparato contador de colonias. IUL Instruments. Contador de colonias manual de contacto.

3.2.1.1. Resiembra y conservación de cepas

Las colonias aisladas a partir de los medios Agar Nutritivo y R2A, fueron sembradas en medios selectivos: Mac-Conkey para enterobacterias, medio de agar CLED (Cysteine lactose electrolyte deficient) para enterococos y agar Cetrimida para pseudomonas.

Para su observación microscópica en fresco se utilizó caldo Nutritivo para el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales (Pluripeptona 5.0 g y extracto de cRNAe 3.0 g)

Para la conservación de la cepa se resembraron en medio TSA (Agar de Tripticasa-soja de Difco; Barcelona, España) y se incubaron durante 24 h a 30°C, (Castro *et al.*, 2009).

El TSA es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias. Este medio se caracteriza por hacer visibles reacciones hemolíticas que producen muchas especies bacterianas. Éstas cepas fueron conservadas en diferentes condiciones, con el fin de tenerlas disponibles para el trabajo diario de laboratorio, y para asegurar su supervivencia a largo plazo. Los métodos de conservación fueron elegidos siguiendo las recomendaciones del *Manual of Methods for General Bacteriology* (Gherna, *et al.*, 1981).

Para su utilización la cepa es resembrada por el procedimiento de siembra de aislamiento en medio de cultivo agar R2A. Para la conservación a largo plazo y ultra-congelación las cepas se inocularon en viales que contenían TSB (Trypticase Soy Broth de Difco) con un 15% de glicerol. Estos viales se incubaron a 30°C durante 24 h, para asegurar un mínimo de 10^8 células viables por ml, y posteriormente se congelaron a -80°C.

3.2.2. Técnicas de observación microbiológicas

Se realizaron estudios para la observación de las bacterias mediante técnicas en fresco (Gota pendiente, montaje húmedo y tinción de cápsulas) y tinción diferencial de Gram. Para este examen de microscopía óptica se ha empleado un microscopio OLIMPUS BH2 con contraste de fases. Para

microscopía electrónica de transmisión (MET) se empleó microscopio electrónico modelo ZEISS EM 10C.

3.2.2.1. Técnica de la gota pendiente

Permite determinar la movilidad de organismos vivos suspendidos en un fluido. En esta técnica se coloca una gota de la suspensión bacteriana a estudiar en un cubreobjetos y se cubre con un portaobjetos (invertido) con una excavación central (portaobjetos excavado), fijándose los bordes del cubreobjetos con vaselina.

3.2.2.2. Técnica del montaje húmedo

Las preparaciones húmedas se realizan colocando una gota de solución salina fisiológica sobre un portaobjetos, donde se disgrega una colonia de bacterias y sobre la que se coloca un cubreobjetos, para reducir la tasa de evaporación y eliminar corrientes de aire. Su observación al microscopio se realiza igual que en la gota pendiente.

3.2.2.3. Tinción de cápsulas

Algunas bacterias producen exopolímeros que se agrupan alrededor de la superficie de la envoltura celular que se denomina generalmente cápsula.

Las cápsulas por sus características químicas no se tiñen normalmente con colorantes básicos como el cristal violeta o fucsina. Sin embargo, se pueden observar directamente mediante tinción negativa con nigrosina o tinta china. Este colorante está compuesto por partículas finas de carbón

suspendidas en agua formando un auténtico coloide. Las partículas son demasiado grandes para penetrar a través de la matriz de la cápsula por lo que solo se tiñe el medio circundante. Para realizar la tinción se procede de la siguiente forma:

1. Poner sobre un portaobjetos limpio una gota de Azul de Metileno, añadir otra gota de nigrosina al 10% o tinta china y al lado unas colonias cogidas del medio de cultivo.
2. Mezclar bien ambas partes para formar una suspensión homogénea.
3. Colocar suavemente un cubreobjetos sobre la suspensión.
4. Poner papel absorbente alrededor del cubreobjetos, y presionar con los dedos el cubreobjetos. El exceso de suspensión será absorbido por el papel.
5. Tirar el papel a un medio desinfectante o destruir
6. Examinar al microscopio.

Las cápsulas se verán con un halo transparente alrededor de la célula de color grisáceo-azulado con el medio circundante de color negro.

3.2.2.4. *Tinción de Gram*

Se encuentra entre las más importantes y frecuentes en microbiología y permite distinguir entre diferentes bacterias que pueden mostrar una morfología similar en función a la estructura y composición de la pared celular.

Procedimiento:

1. Fijar la muestra por calor a un portaobjetos.

2. Cubrir la preparación con Violeta de Genciana durante 3 minutos.
3. Decantar y lavar.
4. Cubrir con solución Ioduro-Iodurada (actúa de mordiente, fijando el colorante) durante 1 minuto.
5. Decantar y decolorar con alcohol-acetona.
6. Lavar con agua y cubrir con fucsina diluida (1 gota por ml de agua) durante 30 segundos.
7. Lavar, secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión 100x con una gota de aceite. Condensador alto.

3.2.2.5. *Microscopía electrónica*

Tinción negativa:

La fijación bacteriana se llevó a cabo en el propio medio con glutaraldehído al 2% de concentración final.

La suspensión se lavó por centrifugación dos veces en tampón de cacodilato 0.1 M.

El sedimento fue resuspendido en un mililitro de tampón de cacodilato 0.1 M al que se le adicionó el mismo volumen de una solución de tetraóxido de osmio al 25% (1% final). El tetraóxido se eliminó mediante un lavado de tampón de cacodilato 0.1M y se centrifugó de nuevo.

Tras la última centrifugación se eliminó el sobrenadante dejando unas gotas del mismo para permitir la dispersión celular concentrada. Se prepara agar Oxoid nº 1 al 2% en tampón cacodilato y se dejó enfriar a 45°C. Después

se le adicionó 2 o 3 gotas de agar fundido y enfriado a 45°C al sedimento y se mezcla con una pipeta Pasteur caliente.

El material fue depositado sobre un portaobjetos y una vez solidificado se cortó en cubos aproximadamente de 1 a 3 mm de lado. Estos fueron fijados posteriormente durante 2 horas a 4°C con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2%.

Los tubos de agar fueron deshidratados gradualmente en una serie de concentraciones de etanol e incluidos en Epon, utilizando el óxido de propileno como paso intermedio.

Las muestras se prepararon en una capsula de gelatina y la resina se dejó polimerizar a 70°C durante dos días. Las secciones ultrafinas se obtuvieron con un ultramicrotomo y se recogieron en rejillas de cobre.

Las secciones se contrastaron en las mismas rejillas con acetato de uranilo y con citrato de plomo al 4% durante 3 minutos (Gonzalez *et al.*, 1991).

Para el examen de microscopia electrónica de transmisión (MET) se empleó el modelo ZEISS EM 10C, con un potencial de aceleración de 80 Kv.

3.2.3. Identificación bioquímica

Las bacterias no muestran una gran variedad de aspectos morfológicos y por tanto su identificación requiere además de la información obtenida en el estudio morfológico, realizar otras determinaciones (fisiología, comportamiento bioquímico, etc.). La identificación debe especificar el género al que pertenece el microorganismo y concluir la identificación a nivel de

especie. El empleo de ciertas pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas. Debido a la lentitud de crecimiento de la mayoría de las bacterias es de gran interés disponer de métodos que nos permitan obtener resultados en el menor tiempo posible. Los sistemas miniaturizados e informatizados ofrecen rapidez en el sentido de que realizan muchas pruebas bioquímicas en poco tiempo pero no dejan de ser sistemas dependientes de cultivo.

3.2.3.1. *Sistemas miniaturizados*

Los sistemas miniaturizados son de gran ayuda en microbiología por su rapidez, fiabilidad y la gran cantidad de pruebas bioquímicas que se pueden realizar en poco tiempo y con un bajo coste.

Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato al que se le incorpora la suspensión bacteriana de un medio de cultivo y que la bacteria incorporada metaboliza o no, dependiendo de la utilización del mencionado sustrato.

En este estudio se emplearon 4 tipos de sistemas miniaturizados:

- API CORYNE V3.0, Ref. 20900: identificación de actinobacterias.
- Paneles deshidratados Microscan, Gran Positivos CIM/Combo.
- API ID 32 E Ref. 32400: identificación de enterobacterias.
- API ID 32 STAPH, Ref. 32500: identificación del género *staphilococcus* y *micrococcus*.

API CORYNE V3.0, Ref. 20900 de Biomeriux.

Es un sistema manual capaz de identificar en 24 horas a 49 especies de bacterias corineformes encontradas habitualmente en clínica, el test consiste en galerías que contienen 21 microtubos o pocillos. Las galerías contienen los siguientes sustratos deshidratados: Reducción del nitrato; Pirazinamidasas; Pirrolidonil arilamidasas; Fosfatasa Alcalina; β -Glucuronidasas; β -Galactosidasas; α -Gucosidasas; N-acetil β -glucosaminidasas; Hidrólisis de la esculina; Ureasa; Hidrólisis de gelatina; Glucosa; Ribosa; Xilosa; Manosa; Maltosa; Lactosa; Sacarosa; Glucógeno; Catalasa.

Los pocillos se inoculan con una suspensión bacteriana, las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color (perceptibles o en presencia de reactivos que delatan el color) o presencia de turbidez. Estas galerías fueron leídas para su identificación por medio del sistema automático ATB Expression de Biomerieux, nº de serie IAF002407 el cual genera un código de 7 dígitos.

Las galerías fueron incubadas en cámara húmeda a (35-37°C) durante 24 horas. La reacción de catalasa (prueba 21 de la galería) se realizó añadiendo una gota de agua oxigenada al 3%, la aparición de burbujas se interpretó como prueba positiva. El pocillo de nitratos fue revelado por adición de los reactivos 1 (ácido sulfanílico-ácido acético) y 2 (N, Ndimetil-1-naftilamina). Los pocillos con enzimas (pirazinamidasas, pirrolidonil arilamidasas, fosfatasa alcalina, β - glucuronidasas, β -galactosidasas, α -glucosidasas, N-acetil β -glucosaminidasas) fueron revelados con 1 gota del reactivo ZYM A (Tris-hidroximetil-aminometano y lauril sulfato de sodio) y una gota de ZYM B (Fast Blue BB) y leídas después de 10 minutos.

Galerías del sistema MicroScan, Gran Positivos CIM/Combo

Es un sistema automatizado para la identificación microbiológica a nivel de especie, que incorpora a las tradicionales pruebas bioquímicas otras relacionadas con la sensibilidad frente a antibióticos a bajas concentraciones (Novobiocina y Bacitracina). Incluye las siguientes determinaciones: Cristal Violeta; Separador de Micrococos; Nitrato; Novobiocina; PNP β -Glucoronido; Indoxil Fosfatasa; Voges Proskauer; Optoquina; Fosfatasa; Bilis Esculina al 40%; L-pirrolinodil; β -Naftilamida; Arginina; PNP- β -Galactopiranoóxido; Urea; Manitol; Lactosa; Trehalosa; Manosa; Cloruro; Sorbitol; Arabinosa; Ribosa; Inulina; Rafinosa; Bacitracina; Pirubato (Figura 3.2). Las galerías fueron leídas en un equipo Microscan Walkaway 96 plus de Siemens.

Galerías API de Biomerieux, ID 32 E Ref. 32400

Son un sistema para la identificación de enterobacterias compuesto por 32 ensayos enzimáticos que permitieron aumentar el número de pruebas bioquímicas para la identificación (Figura 3.1). Las pruebas que se aportaron no contenidas en el Api Coryne V3.0, son las siguientes: Eritrosa; Rhanosa; Dulcitol; Inositol; 5-cetogluconato potásico; L-triptófano (Indol).



Figura 3.1. Galerías API (Biomerieux).

Galería ID 32 STAPH, Ref. 32500

Esta galería es un sistema para la identificación del género *staphilococcus* y *micrococcus*, con 32 ensayos enzimáticos, estos últimos ensayos se realizaron con la finalidad de recopilar pruebas enzimáticas que no se encontraban en las galerías anteriores como: Fosfatasa alcalina; Lipasa (C14); α -galactosidasa; β -galactosidasa; β -glucuronidasa; α -glucosidasa; α -glucosidasa; β -glucosidasa; N-acetil- β -glucosaminidasa; Ureasa.

Estas galerías como las ID 32 E, fueron leídas por medio del sistema automático de identificación ATB Expression de Biomerieux, nº de serie IAF002407.

3.2.3.2. Pruebas adicionales

Al ser muy similares las reacciones con los sustratos establecidos de las pruebas bioquímicas anteriormente descritas, más del 40% de las identificaciones requieren de pruebas adicionales (Freney *et al.*, 1991). Se realizaron las siguientes pruebas adicionales; Prueba CAMP (Christie, Atkins, and Munch-Peterson); Azul Algodón de Lactofenol (Micelios); Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos.

Prueba CAMP (Christie, Atkins, and Munch-Peterson)

La prueba CAMP (*Stap. aureus*) es una prueba sencilla de gran utilidad que ha sido descrita como positiva en todas las cepas aisladas de *Rhodococcus equi*. Es conocida como factor equi, cuyo fundamento es la interacción de este factor con la toxina de *Staphylococcus aureus*, aumentando la hemólisis de esta

cepa. La prueba se realiza en una placa de agar sangre donde se siembra verticalmente una estría de la cepa de *R. equi* y perpendicular a ésta, otra de *Staphylococcus aureus*. Después de incubar 16 a 18 horas a 35°C se observa el aumento de la hemólisis.

Azul Algodón de Lactofenol (Micelios)

Se empleó esta técnica para descartar la presencia de micelios en las colonias aisladas. Se realizan las preparaciones a partir de cultivos. El fenol destruye la flora acompañante; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas.

Añadimos una gota de la suspensión bacteriana en un portaobjetos. Sobre ella se dispensó una gota de azul algodón y ponemos el cubreobjetos. Posteriormente se observó al microscopio la posible presencia de estructuras filamentosas asociadas a la presencia de micelio.

Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos

La sensibilidad a los agentes antimicrobianos, se realizó con los antimicrobianos empleados en tratamientos de infecciones causadas por bacterias coryniformes. La prueba de sensibilidad a los antibióticos fue realizada por la difusión del disco de antibiótico en un medio de Agar Mueller-Hinton con sangre al 5%. Se realizó una siembra por agotamiento y se depositaron los discos de antibioticos en las placas, las cuales fueron incubadas a 35°C, entre 24 y 48 horas, se utilizó el criterio establecido para

estafilococo por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Ying, H. et al 2004).

También se realizaron pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) empleando las galerías del sistema MicroScan, Gran Positivos CIM/Combo que se realiza al mismo tiempo que la identificación bioquímica. Los sistemas **Walkaway 96 plus** son líderes en pruebas de identificación microbiana y sensibilidad a los antimicrobianos, proporcionando productos de alta calidad que generan una gran confianza y seguridad (Figura 3.2). Este sistema permite establecer la sensibilidad de las muestras frente a distintos antimicrobianos en diferentes concentraciones. Los antimicrobianos que se emplearon son los siguientes: Amoxicilina; Penicilina; Amoxicilina/ac Clavulánico; Cefotaxina; Ciprofloxacino; Norfloxacino; Erythromycina; Gentamicina; Imipenem; Rifampicina; Tetraciclina; Vancomicina.



Figura 3.2. Sistema Combo equipo MicroScan Walkaway.

3.3. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

3.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos (Fernández *et al.*, 2010).

De los métodos moleculares disponibles los mejores son aquellos que no dependen de cultivo previo. Entre éstos se puede destacar la técnica de la PCR que se puede realizar directamente de la muestra si los cebadores diseñados son suficientemente específicos.

Las bases para el método de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos fueron descritas por Kleppe (Kleppe *et al.* 1971), quienes describieron una síntesis extensiva de DNA catalizada por DNA polimerasas en la reparación de la replicación. Pero fue K. Mullis, científico de la compañía Cetus, quien en 1983 desarrolló un proceso de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos, apoyándose en la teoría de la síntesis automatizada de oligonucleótidos, patentándose la técnica en 1987 como "Proceso de amplificación de ácidos nucleicos" (Patente CA 1340807 C).

La PCR es un proceso de amplificación enzimática *in vitro* del DNA o RNA, iniciada por unos fragmentos cortos de DNA llamados iniciadores o cebadores (primers). Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. Cada ciclo está

dividido temporalmente en tres fases térmicas: desnaturalización de la doble cadena de DNA, acoplamiento o unión de los iniciadores y polimerización mediante la adición de dNTPs por la enzima *Taq* polimerasa.

Los productos de la PCR, llamados amplicones, se detectan normalmente por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan bajo luz ultravioleta. Debido a su sencillez, sensibilidad y rapidez, su uso en laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección de patógenos. Muchos problemas derivados de la detección mediante las técnicas tradicionales pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa muy eficaz en microbiología.

Recientemente el proceso de PCR se ha automatizado, permitiendo además la cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real. Esta nueva técnica conocida como "Real-Time PCR" no requiere el análisis posterior de la muestra, evitando contaminaciones y minimizando el tiempo de análisis de las muestras. Esta técnica se ha usado para cuantificar poblaciones microbianas en fangos activos (Hall, 2002, Dionisi *et al.*, 2003).

El protocolo comprende cuatro puntos principales:

- 1.-Lisis de células.
- 2.-Extracción del DNA.
- 3.-Extracción con alcohol isoamilico.
- 4.-Precipitación en alcohol.

3.3.1.1. *Protocolo extracción DNA*

- a) Partimos de un cultivo en caldo L.B (Luria-Bertani) de células leídas a $A_{600} = 1.5$ y dividir el cultivo en alícuotas de 1.5 ml.
- b) Obtención del pellet de las células por centrifugación.
- c) Añadir Buffer Lisis de extracción 400 μ l: (2% Triton X-100; 100mM NaCl; 10mM Tris pH 8; 1mM EDTA pH 8.5).
- d) Añadir 5 μ l de lizozima (10 mg/ml) Añadir 5 μ l de solución de proteinasa K (10 mg/ml). Incubar 30 minutos a 37°C.
- e) Añadir 10 μ l de SDS al 25% (poner en volter).
- f) Incubar a 55°C durante 30 minutos.
- g) Añadir 400 μ l de fenol, poner en voltex y centrifugar durante 5-10 min a 13000 rpm.
- h) Recoger 400 μ l el sobrenadante (tampón + DNA) y precipitar el DNA añadiendo 400 μ l de isopropanol y 40 μ l NaOAc.
- i) Centrifugar 20 min a 13000 rpm, retirar sobrenadante y lavar, sin agitar, el pellet con 200 μ l etanol al 70%.
- j) Centrifugar durante 10 min y retirar el sobrenadante, dejando secar el precipitado. Resuspender en 50 μ l de TE 1X.

Para este proceso se empleó el siguiente material:

- Cabina de seguridad biológica Clenecab HERBOLAB nº de serie 08 0030 000 100.
- Baño seco Digital Accu Block nº de serie S81414055, con pantalla digital y microprocesador.

- Microcentrifuga para tubos Eppendorf ROS 1481 Bunsen n° de serie 10055031.

3.3.2.2. *Proceso de preparación de la PCR y electroforesis*

Material:

Se requieren los siguientes reactivos además del DNA total de muestra:

- Polimerasa “hot Star”: La polimerasa “**Hot Star**” se trata de una mezcla de reacción 2x lista para su uso, de manera que solo se le debe añadir agua, primers y DNA. Los principales ingredientes de esta polimerasa son, dNTPs, MgCl y una polimerasa que es inactiva a temperatura ambiente, requiriendo un paso previo de activación de 10 minutos a 95°C, que le proporciona una mejor especificidad.
- Primers: En el caso de los primers, las casas comerciales suelen suministrarlos de forma liofilizada, facilitándose la cantidad en masa (en ng o nmol, etc). Para diluirlo a 100 μM (que es una concentración adecuada para su almacenamiento), es preciso añadir la cantidad correspondiente de agua pura al stock suministrado. El desarrollo del protocolo requiere ahora preparar una alícuota a 10 μM para lo que se realiza una dilución 1/10, añadiendo 5 μl de primer en 45 μl de H_2O . Ponemos en un tubo eppendorf 5 μl de cada primers y añadimos 90 μl de agua exenta de nucleasas, cogemos 2.5 μl para la PCR. Se calculan las cantidades correspondientes al volumen de reacción. Normalmente

este volumen es de 25, 50 ó 100 μl . Para 25 μl , la cantidad a utilizar de DNA será de 2.5 μl , para 50 y 100 μl las cantidades serán 5 y 10, respectivamente.

- H₂O ultrapura para biología molecular.
- Termociclador Mastercycler personal Eppendorf n^o de serie 533255305.

3.3.2.3. Protocolo PCR con polimerasa "Hot Star".

En un tubo eppendorff de 0.5 ml de capacidad, ponemos lo siguiente para un volumen total de 25 μl .

REACTIVOS	VOLUMEN
Polimerasa "HOT STAR"	15 μl
Mezcla de Primers r Primers f	2.5 μl
DNA molde	2.5 μl
Agua libre de nucleasas	5 μl

Se han utilizado los primers Universales para amplificar la secuencia completa del 16S rRNA y contienen las siguientes secuencias de bases: GM3f (5'AGAGTTTGATCMTGGC3') y GM4r (5'TACCTTGTTACGACTT3')

(Muyzer *et al.*, 1995). Estos primers se utilizan para amplificar cualquier tipo de bacterias. También fueron empleados primers para *Nocardias* con las siguientes secuencias, 27f (5'GAGTTTGATCCTGGCTCAG3'), y 1525r (5'AGAAAGGAGGTGATCCAGCC3'); (Rainey *et al.*, 1996).

Las condiciones de la PCR se establecieron igual para todas las muestras, se comenzó con un paso inicial de desnaturalización de 10 min a 95°C, continuando con 35 ciclos a 95°C durante 1min bajando posteriormente a 45°C durante 1 min y a 72°C durante 2 min. Terminando con una última elongación a 72°C durante 10 min. Tras la elongación se programa el termociclador para que enfríe a 4°C durante un tiempo indefinido (Muyzer *et al.*, 1995).

El producto de la PCR se almacenó posteriormente a -20°C hasta su posterior procesamiento para la secuenciación.

3.3.2.4. Preparación del gel de agarosa para la electroforesis

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta, que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*, sirve para formar una matriz inerte que nos permita separar moléculas de DNA mediante electroforesis. Para la preparación de un gel de agarosa se precisa realizar los siguientes pasos:

1. Se vierten en un matraz 100 ml del tampón de electroforesis TAE 1X y disolvemos en el 1.5 g de agarosa (1.5 %).

2. Se funde la solución de agarosa en un microondas durante 1 minuto o en placa calefactora.
3. Se deja enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50°C aproximadamente.
4. Se sella con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel.
5. Una vez que la solución de agarosa ha alcanzado los 50°C, se le añaden 7 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcla bien.
6. Se vierte la solución de agarosa con bromuro de etidio en el soporte, previamente sellado. Se deja polimerizar durante unos 30 minutos.

3.3.2 .5. *Electroforesis*

Para realizar la electroforesis seguimos los siguientes pasos:

1. Se retira la cinta adhesiva con la que se ha sellado el soporte del gel y se coloca en la cubeta de electroforesis SCIE-PLAS nº de serie 6423. Los pocillos deben de estar cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
2. Se añade tampón de electroforesis TBE 1X, de forma que cubra bien el gel de agarosa.
3. Se aplican 10 µl de la muestra preparada en el apartado anterior en dos de los pocillos.
4. Se aplican 10 µl de marcadores de peso molecular en otro de los pocillos.
5. Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Se comprueba que está bien conectada.

6. Se programa la fuente a 100 voltios durante 60 minutos a temperatura ambiente. Debido a su carga negativa, los ácidos nucleicos migran hacia el ánodo separándose en función de su tamaño.

3.3.2.6. *Visualización de los fragmentos de DNA*

Una vez acabada la electroforesis se visualizan los fragmentos de DNA mediante un Transiluminador Alfa Digidoc Pro Alfainnotech nº de serie 8422212A0062, con luz UV a 360 nm y se realiza una fotografía de la imagen utilizando una cámara digital provista de un filtro naranja.

El tamaño de las bandas se calcula a partir de la distancia recorrida en relación con la de los estándares de tamaño conocido. Se puede hacer sobre una copia en papel o analizando la imagen digital con el software adecuado.

3.3.2.7. *Purificación del DNA para la secuenciación*

Utilizamos para la purificación del DNA un Kit de SIGMA Aldrich Gen Eluet PCR nº de catálogo NA 1020. Este kit está diseñado para la purificación y concentración rápida de fragmentos de DNA (50 pb a 10 kb) procedentes de reacciones de PCR o de geles de agarosa. Para ello se parte de volúmenes de hasta 100 µl del producto de PCR o de hasta 900 mg de gel de agarosa. El gel combina un tampón con un agente caotrópico con una columna tipo spin para purificación del DNA. Para medir la calidad de la DNA extraído se utilizó un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000.

3.3.3. Análisis de secuencias

3.3.3.1. Secuenciación del Gen 16S rRNA

El producto purificado de la PCR fue secuenciado mediante un equipo Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer de acuerdo con el protocolo del fabricante y editado por medio del programa BioEdit. Es un editor de alineación de secuencias biológicas escrito para Windows.

Las secuencias de Pares de bases (pb) obtenidas mediante la secuenciación del 16S rRNA son introducidas en **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local que pertenece a la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El programa compara la secuencia problema (también denominada en la literatura como secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en su base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor similitud a la secuencia problema.

Para un posterior alineamiento y estudio filogenético de los resultados obtenido mediante la consulta al NCBI se utilizaron las bases de datos de CLUSTALW2 y el CLC BIO.

3.3.3.2. Contenido de G+C

El contenido de G+C es variable en diferentes organismos, se cree que en este proceso intervienen entre otras, la variación en la selección y el sesgo mutacional (Birdsell, 2002). El problema de las especies en taxonomía

procariota ha llevado a diversas sugerencias en la clasificación de las bacterias, y el comité *Ad hoc* sobre la conciliación de los enfoques de la sistemática bacteriana ha recomendado el uso de relaciones de G+C en la clasificación jerárquica de organismos de nivel superior (Wayne et *al.*, 1987).

Para comprobar que el contenido de G+C de la bacteria que estamos investigando es alto, introducimos la secuencia de pb en un marco de lectura del programa EMBOSS Wobble.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

4.1.1. Determinaciones fisicoquímicas

En la Tabla 4.1 se presentan la media de los resultados obtenidos de las tres muestras recogidas los lunes y viernes. Estas muestras están marcadas como L1, L2, L3, L4 y V1, V2, V3 y V4.

RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS									
Parámetros	Muestras obtenidas los lunes				Muestras obtenidas los viernes				Valor paramétrico
	L 1	L 2	L 3	L 4	V 1	V 2	V 3	V 4	
Temperatura	18°C	18°C	18°C	18°C	18°C	18°C	18°C	18°C	12-18
Ph	8.18	8.31	8.28	8.28	8.15	8.31	8.34	8.34	6.5 – 9.5
Conductividad	832	840	798	798	826	843	798	798	2500
Cloro libre	0.06	0.02	0.08	0.05	0.37	0.30	0.36	0.37	1.0
Cloro combinado	0.17	0.06	0.15	0.17	0.14	0.21	0.06	0.12	2.0
Cloro total	0.23	0.08	0.23	0.22	0.51	0.51	0.42	0.49	(*)
Oxígeno disuelto	98/91	96 / 8.9	96 / 8.9	96 / 8.9	98/9.1	96 / 8.9	96 / 8.9	96 / 8.9	> 75%
Alcalinidad Total	81.3	86.3	66.3	66.3	81.3	86.3	62.5	62.5	(*)
TOC	3.75	3.02	3.09	3.09	2.79	2.91	2.84	2.84	(*)
Na ⁺	62.5	64.9	61.5	61.5	64.9	65.8	60.2	60.2	200
K ⁺	2.49	2.65	2.47	2.47	2.57	2.73	2.45	2.45	10
Ca ⁺⁺	46.1	42.4	38.4	38.4	45.7	44.1	36.1	36.1	100
Mg ⁺⁺	12.2	6.8	11.3	11.3	11.9	11.9	10.6	10.6	30
SO ₄ ⁼	24	53.8	66.3	66.3	54.3	51.6	65.4	65.4	250
Cloruros	135	108	127	127	137	107	122	122	250
CO ₃ H ⁻	99.1	86.4	80.8	80.8	99.1	86.3	71.37	71.37	(*)
CO ₃	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.24	0.24	< 0,2
Nitrato	63	56	56	56	55	48	55	55	50
Nitrito	0.31	0.33	0.40	0.24	0.22	0.32	0.23	0.21	0.1

Tabla 4.1. Resultados de parámetros físico-químicos. (*) La legislación no establece valor paramétrico.

Los parámetros que se detallan a continuación permanecen dentro de la normalidad establecida en los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

La temperatura del agua, se mantiene constante a 18°C en el límite del valor paramétrico, un valor apreciado en el agua es que se mantenga siempre frescas.

El pH se mantiene prácticamente constante y dentro del valor paramétrico, oscilando entre los 8.18 y 8.34, lo que generalmente sucede en aguas tratadas con cloro oscilando el pH entre 5 y 10.

La conductividad, nos da una idea de la cantidad de sales disueltas, la concentración de sales en las muestras se encuentra en un valor estable y con un contenido medio en sales.

El resto de parámetros que constituyen las sales como son el Na^+ ; K^+ ; Ca^{++} ; Mg^{++} ; SO_4^- ; Cloruros; CO_3H^- , se encuentran por debajo de lo que sería el valor medio del valor paramétrico.

4.1.2. Niveles de cloro en agua

Al observar niveles de cloro libre por debajo de lo establecido como valor paramétrico, se realizó un estudio semanal de la presencia de cloro durante los mismos meses. Se obtiene el valor medio de las muestras obtenidas durante tres semanas consecutivas (Tabla 4.2). Como datos importantes está la disminución de cloro libre y total en las muestras obtenidas los lunes, aumentando ambos parámetros de forma gradual hasta alcanzar un máximo el jueves entre 0.43 mg/L de cloro libre y 0.48 mg/L de

cloro total respectivamente. También se puede observar la disminución de cloro combinado durante todos los días de la semana.

TABLA 4.2. LECTURAS DE CLORO EN LOS DISTINTOS DÍAS DE LA SEMANA

<i>Día</i>	<i>Hora</i>	Cl libre	Cl combinado	Cl total
<i>Lunes</i>	8:30	0.10	0.4	0.14
	12:30	0.14	0.02	0.16
<i>Martes</i>	8:30	0.29	0.02	0.31
	12:30	0.26	0.06	0.32
<i>Miércoles</i>	8:30	0.38	0.08	0.46
	12:30	0.29	0.04	0.33
<i>Jueves</i>	8:30	0.43	0.05	0.48
	12:30	0.42	0.08	0.50
<i>Viernes</i>	8:30	0.36	0.05	0.41
	12:30	0.37	0.11	0.48

A pesar de que el cloro esta disminuido, se tiene una mezcla de ácido hipocloroso y de iones hipoclorito en proporción suficiente para actuar como desinfectante para los microorganismos.

4.2. ESTUDIO FENOTIPICO

4.2.1. Recuento de bacterias

Siguiendo la metodología analítica descrita en Materiales y Métodos, se realizaron ensayos de los cultivos bacterianos en distintas condiciones (medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación) para determinar su influencia sobre el recuento de las UFC y seleccionar las mejores condiciones para el recuento bacteriano.

No se establecieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los dos medios de cultivo ensayados. En relación con el tiempo de incubación se observaron diferencias significativas concluyendo que las mejores condiciones para el recuento fueron a las 72 h. También se encontró una diferencia significativa en función a la temperatura de incubación, observándose mayores recuento a 22°C .

Como se observa en la Figura 4.1 el recuento obtenido en las muestras recogidas los lunes es significativamente mayor que los obtenidos en las muestras recogidas los viernes.

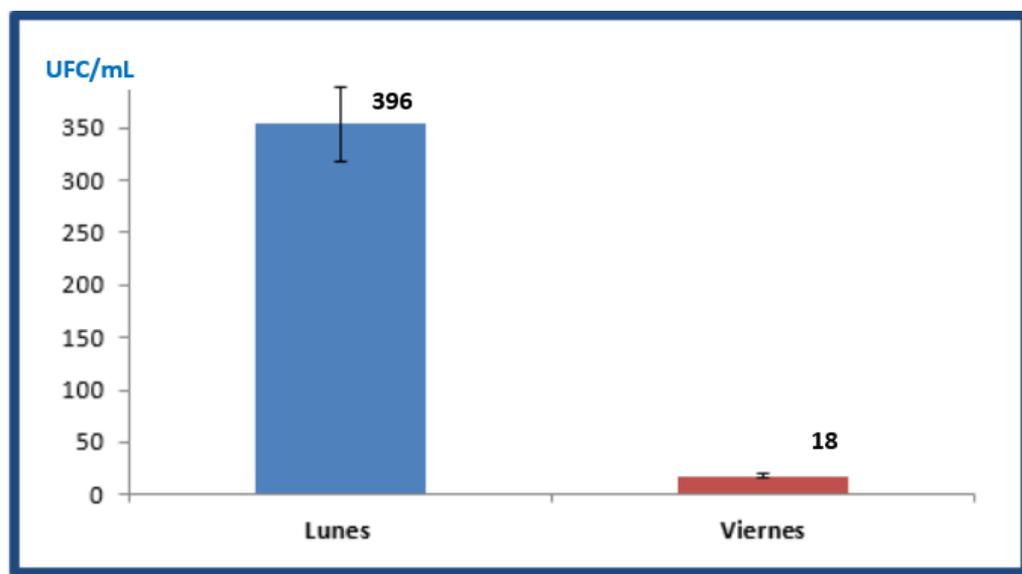


Figura 4.1. Representación de los valores medios ($\pm\text{ET}$) del recuento de bacterias en las muestras obtenidas en los distintos días de muestreo (Medio R2A; 22°C ; 72 h).

En la resiembra para búsqueda de otras bacterias de contaminación fecal en los medios selectivos de agar Mac-Conkey, agar CLED y agar Cetrimida, no se observó crecimiento por lo que se consideró como negativo para Coliformes, Enterococos y Pseudomonas.

4.2.2. Características macroscópicas

4.2.2.1. Tipificación de las colonias aisladas

En la placa de recuento (Fig. 4.2), se observan colonias de un microorganismo aeróbico de tamaño entre 2 - 5 mm de diámetro y son generalmente de color blanco grisáceo con aspecto mucoso, convexo y brillando ligeramente después de 48 horas de incubación.

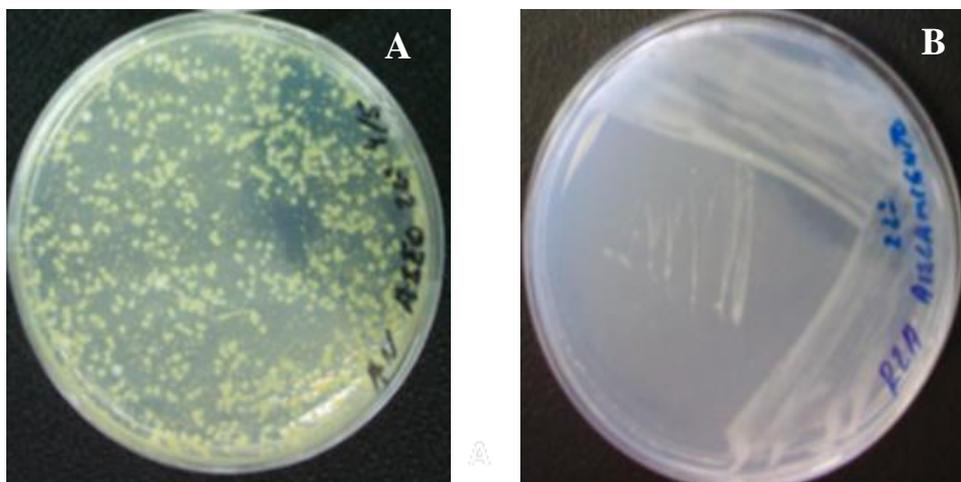


Figura 4.2. Aspecto de las colonias en agar Nutritivo y R2A.

En la fotografía (Figura 4.2), marcada como A corresponde al aspecto de las colonias aparecidas en agar Nutritivo a 22°C después de sembrar una alícuota de 1 ml del concentrado 100 x de agua de red al cabo de 72 horas de incubación. La fotografía marcada con B corresponde a la resiembra de una

colonia para su aislamiento en medio R2A a 22°C para su posterior identificación.

4.2.3. Conclusiones sobre el crecimiento bacteriano

El control de la calidad del agua se centra en aquellos organismos patógenos para el hombre, utilizándose para ello unos bioindicadores microbiológicos de contaminación biológica que comprende la búsqueda de organismos tales como: bacterias aerobias a 37°C como coliformes (*Escherichia coli*), enterococos (*estreptococos D*) y pseudomonas, que forman parte de la contaminación del agua.

En los análisis que se realizaron al agua problema no se han encontrado microorganismos tales como coliformes (*Escherichia coli*), enterococos (*estreptococos del grupo D*) y pseudomonas.

En el recuento de las UFC a las 72 horas, se llega a la conclusión de una importante disminución de las UFC en las muestras obtenidas los viernes, posiblemente es debido al aumento de cloro en relación al detectado los lunes.

También podemos observar que no existe una diferencia significativa en el crecimiento de los microorganismos tanto en el medio de agar nutritivo como en el medio de agar R2A.

Sin embargo si se observa una diferencia significativa que corresponde a un mayor crecimiento a la temperatura de 22°C que a la de 37°C ($P < 0.05$). Estos datos indican que el crecimiento de la microbiota no depende del medio de cultivo ($P > 0.05$).

4.2.4. Características microscópicas

4.2.4.1 Microscopia óptica

En la tinción de cápsulas no se observa una delimitación clara para afirmar la presencia de cápsulas. En el examen en fresco (montaje húmedo) mediante contraste de fases se observan distintas formas de división, algunas de ellas son formas bacilares en "V" en cultivos líquidos recientes (caldo nutritivo) y formas cocóides en cultivos estacionarios, con una morfología de división celular en un mismo plano semejante a los estreptococos.

Mediante la tinción de Gram observamos bacilos de diferentes longitudes (1 a 4 mm) después de 24 horas de incubación y las células cocoides principalmente después de 48 horas de incubación.

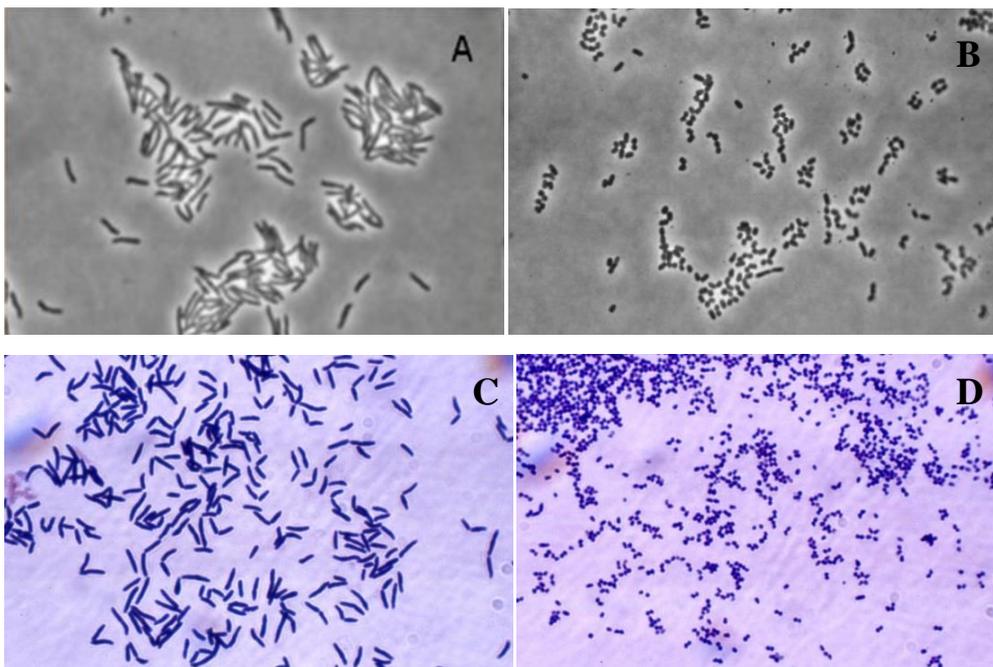


Figura 4.3. Morfología celular. A y B examen en fresco. C y D tinción de Gram.

El conjunto de las estructuras de las células bacilares dispuestas en formaciones en "L" o "V" como las formas cocoides son gram-positivas.

En la micrografía **A** (Figura 4.3) se observan formas bacilares en fase vegetativa en un cultivo joven. En la micrografía **B** se observan formas cocoides en un cultivo depauperado. Ambas preparaciones se han observado en fresco mediante contraste de fases.

Mediante la tinción diferencial de Gram, en la micrografía **C** se pueden apreciar las formas de división en "L" y "V". En **D**, se observan las formas cocoides.

4.2.4.2. *Microscopia electrónica*

Para el examen de microscopia electrónica de transmisión (MET) se empleó el modelo ZEISS EM10C, con un potencial de aceleración de 80 Kv. (Figuras 4.4 a 4.7) se observaron con detalle la pared celular, nucleoides, ribosomas y septos de división.

Las formas cocoides estudiadas se disponen en cadenas similares a las de los estreptococos y muestran una gruesa pared celular. En las formas bacilares se observan tanto los septos de división como la disposición de las células en "V" después de la división.

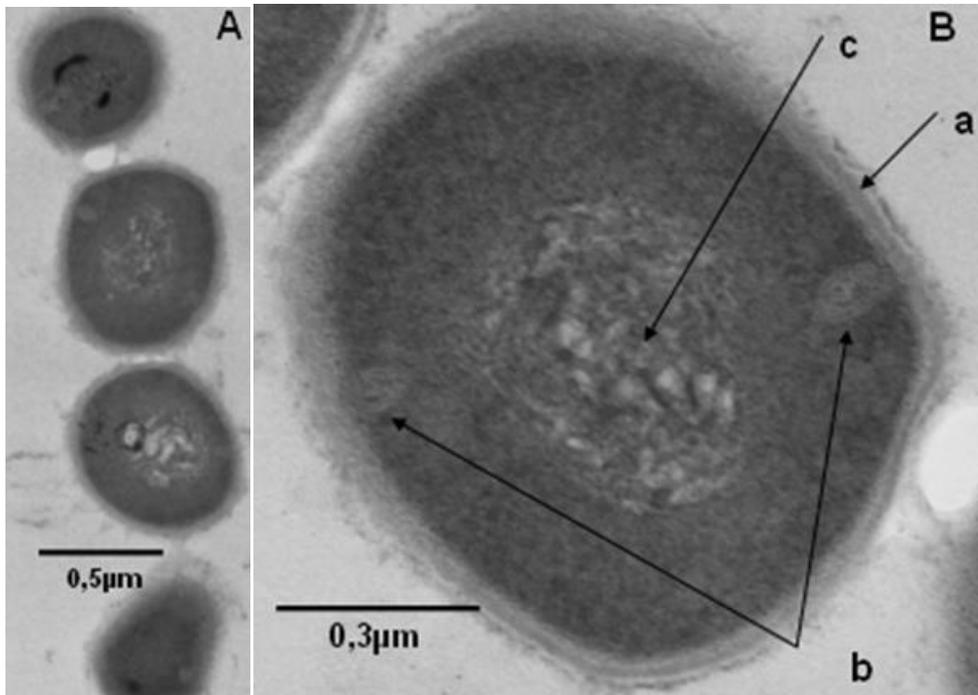


Figura 4.4. Microscopía electrónica I. A. Formas cocoides en cadena. B. Detalle de la anterior: (a) Pared celular gruesa, (b) Mesosomas, (c) Nucleoide central.

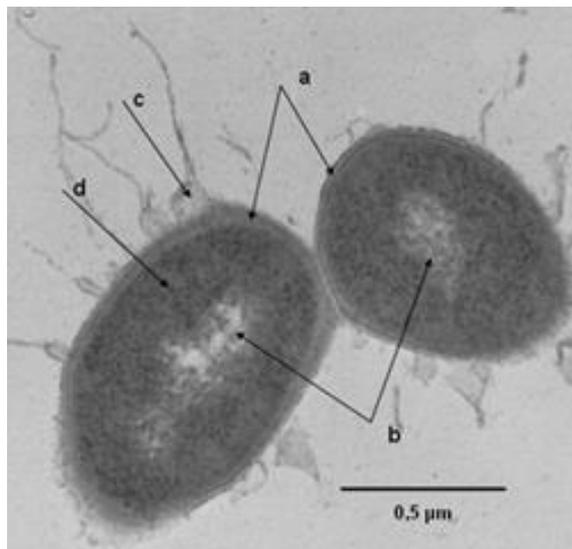


Figura 4.5. Microscopía electrónica II. Forma en V típica del final del proceso de división; ambas células comparten una zona de la pared celular. (a) Pared celular, (b) Nucleoides (c) Restos de la capa mucilaginosa unidos a la pared celular, (d) Ribosomas en el citoplasma.

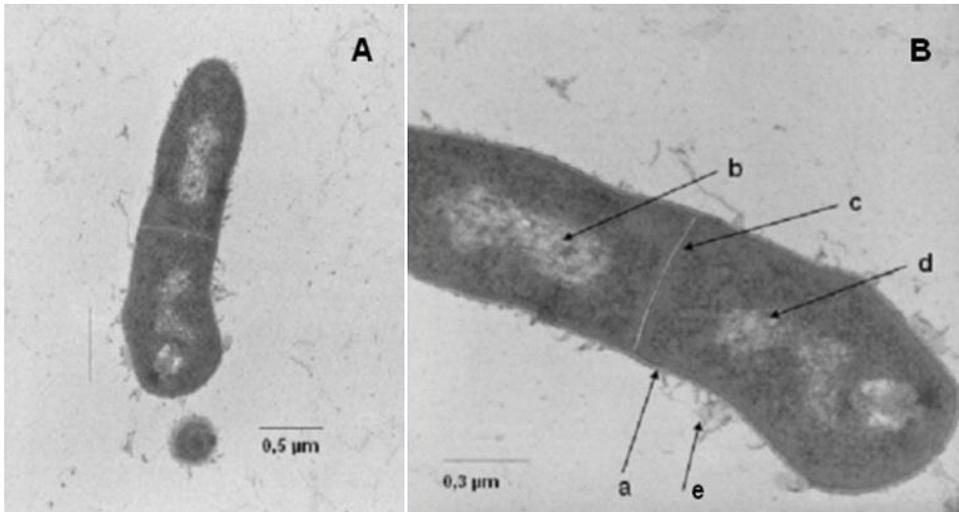


Figura 4.6. Microscopía electrónica III. **A.** Forma bacilar en fase de división. **B.** Ampliación de la anterior: (a) Pared celular, (b) nucleoides en ambas células. (c) Septo de división celular, (d) Restos de capa mucilaginosa.

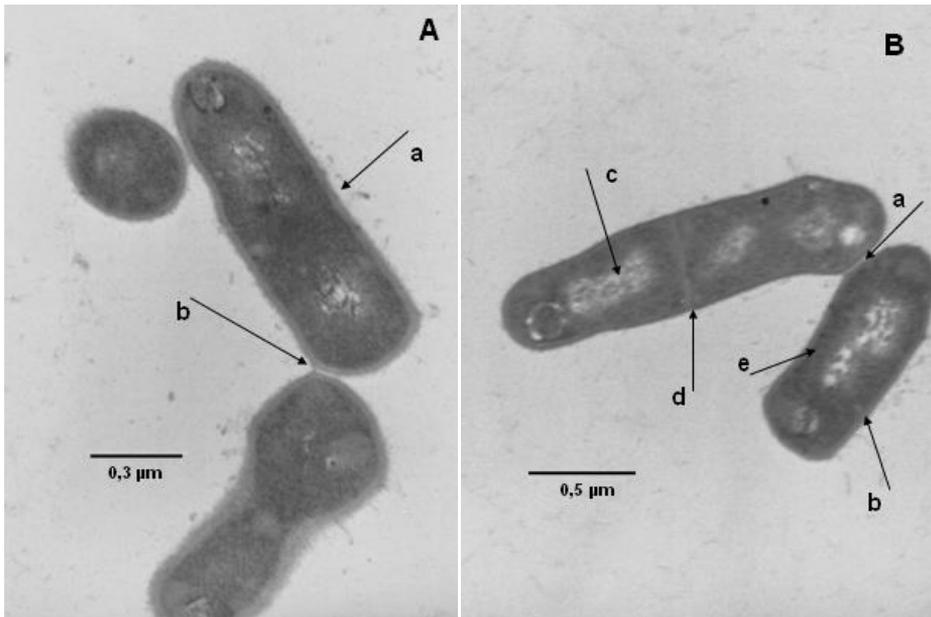


Figura 4.7. Microscopía electrónica IV. Formas en V propias del final del proceso de división previo a la separación completa de las dos células. En A se puede observar: (a) Pared celular gruesa bien delimitada, (b) unión celular por una pequeña porción de pared. B: (a) Zona en que las células están ya separadas, (b) Pared celular bien delimitada., (c) Nucleoide, (d) Septo de división, (e) Ribosomas.

4.2.5 Conclusiones sobre el estudio microscópico

En el examen por medio de la microscopía óptica, se observó lo siguiente:

En la tinción de cápsulas, al no existir una delimitación clara alrededor de la bacteria no se pudo afirmar la presencia de esta.

En el examen en fresco (montaje húmedo) al contraste de fases se observan distintas formas de división algunas de ellas son formas bacilares en "V" en cultivos líquidos recientes (caldo nutritivo) y formas cocóides en cultivos estacionarios, con una morfología semejante a los estreptococos.

Con la tinción de Gram observamos formas bacilares de diferentes longitudes (1 a 4 mm) con estructuras dispuestas en formaciones en "L" o "V" después de 24 horas de incubación y las células cocoides aparecen después de 48 horas de incubación. Tanto las formas bacilares como las cocoides son gram-positivas.

Mediante la microscopia electrónica se observan restos de la capa posiblemente mucilaginoso, una pared celular gruesa así como las distintas fases de división.

La envoltura celular que comparten las actinobacterias, está dominada por la presencia de un polisacárido arabinogalactano con una unión covalente a un pectidoglicano formando una matriz a la que se une los ácidos micólicos (Gurtler et al. 2004; Zhi et al. 2009), constituyendo una barrera de permeabilidad lipídica externa. Esta permeabilidad puede variar según condiciones del crecimiento del microorganismo (Sutcliffe, 1998; Sokolovka et al. 2003; Stratton et al. 2003).

4.2.6. Pruebas bioquímicas de identificación

4.2.6.1. Pruebas bioquímicas de identificación

Para la identificación procedemos con una resiembra de una colonia bacteriana en placas de Agar Nutritivo y R2A, para asegurarnos que las bacterias que se emplean son bacterias aisladas y pertenecientes a un solo clon.

Las determinaciones bioquímicas que se relacionan a continuación, se utilizan para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un determinado sustrato (Wauters *et al.*, 2000). La identificación automática permite la identificación de cepas bacterianas y levaduras mediante test bioquímicos miniaturizados que permiten la realización de numerosas pruebas en poco tiempo. El sistema comercial API CORYNE V 3.0 para bacterias coryneformes incluye diversas especies de *Corynebacterium* y la especie *Rhodococcus equi*. Este sistema no incluye ninguna otra especie de *Rhodococcus*, tampoco incluye especies de *Nocardia* y *Gordonia*. El sistema Combo MicroScan-4 y los sistemas API ID 32E y ID 32 STHA, que permite ampliar el número de pruebas.

4.2.6.2 API Coryne V3.0

Las galerías API Coryne V3.0 (Biomérieux) fueron inoculadas e incubadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y la lectura de las reacciones se llevó a cabo mediante sistema automático ATB. La lectura establece un biocódigo con los siguientes dígitos 2013004, identificando dos microorganismos un *Artrhobacter spp* con 54,6%, un *Rhodococcus spp* con 40,9%

RESULTADOS API CORYNE V 3.0							
Ensayos		1	2	3	4	5	6
<i>NIT</i>	Reducción del nitrato	-	V	V	V	V	-
<i>PYZ</i>	Pirazinamidasas	+	+	+	+	+	+
<i>PYRA</i>	Pirrolidonilarilamidasa	V	-	-	-	-	-
<i>PAL</i>	Fosfatasa Alcalina	V	+	+	+	-	-
<i>BGUR</i>	β -Glucoronidasa	V	-	-	-	-	-
<i>BGAL</i>	β -Galactosidasa	V	V	-	-	-	-
<i>AGLU</i>	α -Gucosidasa	+	+	+	+	+	+
<i>BNAG</i>	N-acetil β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-	-
<i>ESC</i>	Hidrólisis de la esculina	V	V	+	+	-	-
<i>URE</i>	Ureasa	-	-	-	-	-	+
<i>GEL</i>	Hidrólisis de gelatina	V	-	-	-	-	-
<i>0</i>	Control	-	-	-	-	-	-
<i>GLU</i>	Glucosa	-	-	+	+	-	-
<i>RIB</i>	Ribosa	-	-	-	-	+	-
<i>XYL</i>	Xilosa	-	-	-	-	-	-
<i>MAN</i>	Manosa	-	-	-	-	+	-
<i>MAL</i>	Maltosa	-	-	+	-	-	-
<i>LAC</i>	Lactosa	-	-	-	-	-	-
<i>SAC</i>	Sacarosa	-	-	+	-	-	-
<i>GLYG</i>	Glucógeno	-	-	-	-	-	-
<i>CAT</i>	Catalasa	+	+	+	+	+	+
PRUEBAS COMPLEMENTARIAS							
<i>LIP</i>	Lipasa	-	+	+	+	+	+
<i>TRE</i>	Trehalosa	-	+	-	-	-	-
<i>FRU</i>	Fructosa	+	-	-	-	+	-
<i>MICELIO</i>	Micelios	-	-	-	+	-	-
<i>CAMP</i>	CAMP (<i>Staph. aureus</i>)	-	-/*	-	-	-	-

Tabla 4.3. Resultados del panel Api CoryneV3.0. (*) Solo positivo para *Rhodococcus equi*. Se compara la bacteria problema con otros cinco géneros: (1) *Arthrobacter*; (2) *Rhodococcus*; (3) *Gordonia*; (4) *Nocardia*; (5) *Dietzia*; (6) *Bacteria problema*. (+) Reacción positiva. (-) Reacción negativa. (V) Variable.

y un *Corynebacterium* en un 3.4% de posibilidades respectivamente (Tabla 4.3).

También nos indica el test la posibilidad de *Gordonia*, *Dietzia* y *Nocardia*. Indicándonos que se requieren las siguientes pruebas complementarias, lipasa, trehalosa, fructosa y presencia de micelios.

Realizadas las pruebas complementarias (Tabla 4.3), obtenemos para la bacteria problema un resultado positivo a la lipasa y resultados negativos a la trehalosa; fructosa y micelios.

El resultado de la prueba CAMP (*Staph. aureus*) fue negativa para el *Rhodococcus equi*, (Figura 4.8).



Figura 4.8. Resultado negativo de la prueba CAMP

La capacidad del sistema Api Coryne para evaluar cepas de bacilos gram-positivos es limitada para *Arthobacter* y para bacilos gram-positivos ácido resistentes como *Rhodococcus*, *Gordonia*, y *Nocardia*, (Tabla 4.4) siendo un sistema útil para la identificación de la mayoría de las especies de *Corynebacterium* de importancia clínica. (Almuzara, et al, 2006).

Microorganismo	Total	Identificación		
		correcta	correcta con pruebas adicionales	Identificación incorrecta
<i>Arthrobacter spp</i>	11	2	2	7
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	21	11	10	0
<i>Corynebacterium CDC grupo F</i>	2	2	0	0
<i>Corynebacterium macginlenyi</i>	3	2	0	1
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	16	16	0	0
<i>Rhodococcus equi</i>	9	2	7	0
<i>Rhodococcus spp.</i>	6	1	3	2
<i>Rothia dentocariosa</i>	1	1	0	0

Tabla 4.4. Evaluación del sistema API Coryne, para distintas actinobacteria. (Almuzara, et al 2006).

4.2.6.3. MicroScan CIM/Combo

Se realizaron pruebas con paneles deshidratados del sistema MicroScan CIM/Combo, estos paneles están diseñados para determinar la sensibilidad a distintos sustratos y para la identificación de agentes

Resultados del panel MicroScan Combo					
Abrev.	Sustratos Prueba	Resultado	Abrev. Prueba	Sustratos	Resultado
CV	Crista Violeta	-	NAN	Manitol	-
MS	Separador de Micrococos	+	LAC	Lactosa	-
NIT	Nitrato	-	TRE	Trehalosa	-
NOV	Novobiocina	-	MNS	Manosa	-
PGR	PNP β -Glucoronido	-	NACI	Cloruro Sódico	-
IDX	Indoxil Fosfatasa	-	SOR	Sorbitol	-
VP	Voges Proskauger	-	ARA	Arabinosa	-
OPT	Optoquina	+	RIB	Ribosa	-
PHO	Fosfatasa	-	INU	Inulina	-
BE	Esculina Bilis al 40%	-	RAF	Rafinosa	-
PYR	L-pirrolinodil β -Naftilamid	-	BAC	Bacitracina	+
ARG	Arginina	-	PRV	Pirubato	-
PGT	PNP- β -Galactopiranóxido	-		Pocillo para crecimiento	
URE	Urea	+	TFG	libre de Timidina	-

Tabla 4.5. Resultados del panel MicroScan-4. (-) Reacción Negativa. (+) Reacción Positiva.

antimicrobianos a nivel de especies de aerobios facultativos, tanto bacilos como cocos gram-positivos (Tabla 4.5). Leído el panel en equipo MicroScan-4 nos indica que el biotipo 202020004 corresponde a un *Rhodococcus equi*.

4.2.6.4. Pruebas adicionales

La mayoría de las cepas del género *Rhodococcus* fueron identificadas con el recurso de pruebas adicionales, en coincidencia con lo publicado por otros autores que consideran que API Coryne, presenta sólo un valor limitado para la identificación de las especies bacterianas ácidoresistentes: *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Dietzia* y *Nocardia*. (Funke *et al.*, 1997).

Al ser muy similares las reacciones con los sustratos establecidos, más del 40% de la identificaciones requieren de pruebas adicionales (Freney *et al.*, 1991), se procede a buscar pruebas adicionales de azúcares y enzimas que nos puedan servir para la diferenciación entre el género *Rhodococcus* y *Arthrobacter* (García *et al.*, 2004.). Las pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo, fueron realizadas por medio de los sistemas API ID 32E para enterobacterias y API ID 32STAPH para estafilococos. Las galerías empleadas fueron inoculadas con una suspensión bacteriana en NaCl 0.85% y llevado a 0.5 U. de la escala Mc Farland y se llenaron los pocillos con la suspensión (Tabla 4.6).

La cepa objeto de la investigación es catalasa positiva realizada por medio del Peróxido de Hidrógeno, mostrando un metabolismo oxidativo, no hidroliza la gelatina, teniendo una motilidad negativa, esta prueba se realizó mediante la técnica en fresco de la gota pendiente.

Resultados de las pruebas adicionales. Sistema Api ID 32E y Api ID 32 Staph.					
Ensayos	Componentes Activos	Reacciones enzimáticas	Bacteria problema	Arthro-bacter	Rhodo-coccus
CRECIMIENTO a 20°C	Medio de Agar		+	+	+
MOTILIDAD	Gota pendiente		-	-	-
OXIDASA	N,n,n,n-Tetrametil-p-fenilendiamina	Reducción	-	-	-
GLU	D-Glucosa	Fermentación (GLUcosa)	-	-	-
ERT	Eritrosa	Fermentación (ERTrosa)	-	-	-
RHA	L-rahamnosa	RHAMnosa (acidificación)	-	-	-
DUL	Dulcitol	DULcitol (acidificación)	-	-	-
INO	Inositol	INOSitol (acidificación)	-	-	-
5KG	5-Cetogluconato Potásico	5-CetoGluconata (acidificación)	-	-	-
IND	L-triptófano	Producción de INDol	-	-	+
SH ₂	Kliger Iron	Producción de SH ₂	-	-	V
PAL	2-Naftil fosfato	Fosfatasa Alcalina	-	-	-
LIP	5-Bromuro-3-Indoxil-nonanoata	LIPasa	+	-	+

Tabla 4.6. Resultados de las pruebas adicionales realizadas por el sistema Api ID 32E y Api ID 32 Staph. (+) Positivo, (-) Negativo, (V) Variable.

Los resultados de las reacciones para la reducción del nitrato, esculina, y la urea (Tabla 4.3. y Tabla 4.5), así como para la utilización de los distintos hidratos de carbono, estos resultados se encuentran en línea con los resultados establecidos para la mayoría de las cepas de las *Actinobacterias* (Keddie *et al.*, 1986).

Se procede a comparar la actividad enzimática de la cepa de bacteria problema con las distintas cepas que podrían resultar mediante la investigación del Api Coryne V3.0. En esta comparación la cepa de la bacteria problema nos da la mayor similitud con el género *Arthrobacter* y el género de *Rhodococcus rhodochrous* (Tabla 4.7).

Después de haber analizado y comparado los datos por medio de pruebas bioquímicas e enzimáticas estos datos indican, que no se puede llegar a una conclusión definitiva para poder identificar con una aproximación alta a que género de la actinobacteria pertenece la bacteria problema.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	<i>Bacteria Problema</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Nocardia Asteroides</i>	<i>Nocardia Brasilensis</i>	<i>Rhodococcus Erythropolis</i>	<i>Rhodococcus Equi</i>	<i>Rhodococcus Rhodnii</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
Fosfatasa alcalina	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Rd
Lipasa (C14)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	+	-	Rd	+	+	Rd	+	-	-	+
β -glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -glucosidasa	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ureasa	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+

Tabla 4.7. Resultados de las pruebas enzimáticas. (+) Reacción positiva. (-) Reacción negativa. (V) variable. (Rd) Reacción positiva débil.

4.2.7. Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos

Se realizaron dos pruebas para la sensibilidad a los antibióticos, una por medio de difusión del disco de antibiótico y la otra se realizó mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), en microbiología, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación.

4.2.7.1. Resultados de la prueba de difusión por medio de discos

La prueba de sensibilidad a los antibióticos fue realizada por medio de difusión del disco de antibiótico en un medio de Agar Mueller-Hinton con sangre al 5% (Figura 4.9). Esta prueba pone de manifiesto la resistencia de la bacteria a los discos de Eritromicina y Penicilina G.

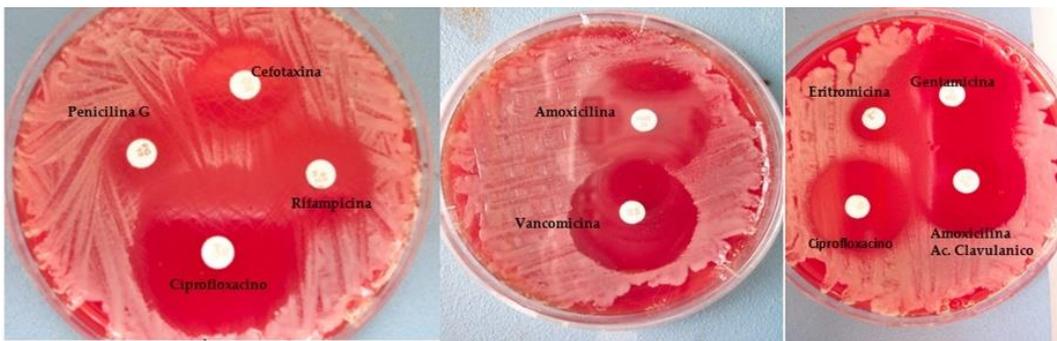


Figura 4.9. Resultado de la sensibilidad a los antimicrobianos en medio de Mueller-Hinton con sangre al 5%. Podemos observar la sensibilidad a los antimicrobianos seleccionados.

Ensayo	Componente	Resultados Prueba
AMX	Amoxicilina	S
AMC	Amoxicilina ac Clavulánico	S
CFT	Cefotaxina	S
VA	Vancomicina	S
GEN	Gentamicina	S
CP	Ciprofloxacino	S
P	Penicilina G	R
NOR	Norfloxacino	S
RIF	Rifampicina	S
E	Eritromicina	R

Tabla 4.8. Lectura de los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos. S: Sensible; R: Resistente.

4.2.7.2. Resultados concentración mínima inhibitoria (CIM)

Se evaluaron la sensibilidad a los antibióticos, por medio de CIMs, realizando las pruebas de sensibilidad a los antibióticos mediante el sistema **Combo**. Fueron leídas en equipo MicroScan Walkaway 96 plus de Siemens (Tabla 4.9). La Interpretación de los resultados de la CIM fue el siguiente:

De los antibióticos beta-lactámicos mostraron una buena actividad las cefalosporinas y el imipenen, siendo resistente a la penicilina.

CIM a la tetraciclina y eritromicina fueron inferiores al punto de corte por lo que resultó ser resistente. El ciprofloxacino, gentamicina y vancomicina presentaron buena actividad contra la cepa examinada.

Antimicrobiano	Componente	Dilución Pocillo	CIM	Resultado de la Prueba
AM	Amoxicilina	>8	4	S
P	Penicilina	>8	>8	R
AMC	Amoxicilina ac Clavulánico	<=4/2	1	S
CFT	Cefotaxina	<=0.5	<=0.5	S
CP	Ciprofloxacino	>2	>1	S
Nxn	Norfloxacino	<=1	<=1	S
LZD	Linezolid	4	4	I
E	Erythromycina	>4	>4	R
GM	Gentamicina	>8	>4	S
IMP	Imipenem	>8	>4	S
RIF	Rifampicina	>2	>1	S
TEI	Teichoplanin	<=4	<=4	S
TE	Tetraciclina	>8	>8	R
VA	Vancomicina	<=1	<=1	S
S =Sensible; R = Resistente; I= Intermédio.				

Tabla 4.9. Resultados de la CIM.

4.2.8. Conclusión sobre el estudio bioquímico

La identificación de la mayoría de los microorganismos pertenecientes al *phylum actinobacteria* y en especial género nocardia es difícil de establecer, debido a la falta de métodos de identificación basados en pruebas fenotípicas. Para caracterizar estas especies por métodos tradicionales se debe realizar un gran número de pruebas bioquímicas y fisiológicas. (Williams et al., 1989).

La capacidad de los sistemas Api Coryne y Combo del sistema MicroScan, para evaluar cepas de bacilos grampositivos es limitada para *Arthobacter* y para bacilos grampositivos ácido resistentes (*Rhodococcus*, *Gordonia*, y *Nocardia*) siendo un sistema útil para la identificación de la mayoría de las especies de *Corynebacterium* de importancia clínica. (Almuzara, et al, 2006).

Las colonias aisladas son catalasa-positivos y sensibles a la lisozima. Presentan un tipo de metabolismo oxidativo de los carbohidratos. Las reacciones para la reducción del nitrato, esculina y urea, como las reacciones para la utilización de los distintos hidratos de carbono, se encuentran en línea con los resultados establecidos para la mayoría de las cepas de las *Actinobacterias* (Keddie et al., 1986).

Como método analítico más preciso, se han propuesto otras técnicas para la identificación de las especies de *Rhodococcus*, tales como las pruebas enzimáticas rápidas (Goodfellow et al., 1987).

Se procede a comparar la actividad enzimática de la cepa de bacteria problema con las distintas cepas que podrían resultar mediante la investigación del Api Coryne, descartando la lectura del sistema MicroSCAN-4 ya que las prueba adicional CAMP (*Staph. aureus*), da resultado negativo para el *Rhodococcus equi*. En esta comparación la cepa de la bacteria problema nos da la mayor similitud con el género *Arthrobacter* y el género de *Rhodococcus rhodochrous*.

Tanto las pruebas bioquímicas como enzimáticas no han sido determinantes para realizar una identificación presuntiva de estos

microorganismos, no siendo completamente adecuadas (Conti-Díaz *et al.*, 1974) (Goodfellow, 1989) para poder identificar a que género de actinobacteria pertenece.

La determinación de la sensibilidad a determinados antimicrobianos coincide con alguno de los patrones de las cepas de *Arthrobacter*. *A. Oxidans*, *A. Luteolus* y *A. Albus*. (Wauters *et al.*, 2000) y en general con la mayoría de las cepas de *Arthrobacter* (Funke *et al.*, 1996).

También coinciden con la sensibilidad a los antimicrobianos de la cepas de *Rhodococcus equi* (García, 2005) y *Rhodococcus erythropolis* (Deok *et al.*, 2011).

4.3. RESULTADO DE LOS MÉTODOS MOLECULARES

4.3.1. Fragmentos y purificación del DNA

Una vez acabada la electroforesis con los primers descritos (Muyzer *et al.*, 1995) se ha conseguido amplificar una banda de unos 1500 pb que abarca casi todo el gen 16S rRNA (Figura 4.11). Tras la purificación se obtiene 65 ng/microlitro $A_{260}/280 = 1.88$.

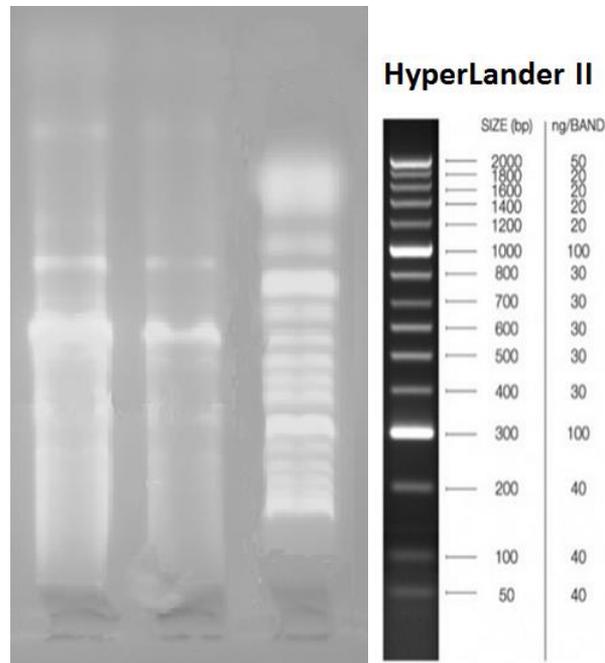


Figura 4.10. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa.
Patrón de 15 bandas pb/ng.

4.3.2. Determinación de la secuencia. Gen 16S rRNA

El producto purificado de la PCR fue secuenciado mediante un equipo Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer de acuerdo con el protocolo del fabricante, obteniendo un fragmento de unas 1500 pb. La secuencia problema fue identificada como (S1).

>S1 Secuencia problema

```
GGGGTTAAGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCATGACGTGNCNGNNGTGTACAAG
GCCCCGGGAACGTATTCACCGCANC GTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCACGG
GGTCGAGTTGCAGACCCCCGATCCGA ACTGAGACCAGCTTTAAGGGATTTCGCTCCACCTCACGG
TCTCGCAGCCCTCTGTACTGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGAT
GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCTTACGAGTCCCCACCA
TAACGTGCTGGNNNNNTAAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
```

```

ACACGANNGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGCCACATCTCTGC
ANCTTCCGGTATATGTCAAACCCANGTAAGGTTCTTCNCGTTGNATCGAATTAATCCACATG
CTCCGCCGNNGNNGNNGNCCCCNTCNATTCCGCNGTCGAGCGGTNAGGCCTTTCGGGGTACA
CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGA
AACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCENNNTNGCATGNNNNNGNGGTGGAAAGATTTATCGGT
GCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGG
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA
TGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCG
GAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCGTTTGTGAAAACCAGCAGCTC
AACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGG
TGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAG
TAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCCTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATT
AAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCNGGGTTTTGACAT
ATACCGGAAAGCTGCAGANATGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGT
CGNCAGCNCNNGNCGTG

```

4.3.3. Alineamiento local

Hacer un alineamiento significa colocar las secuencias unas sobre otras intentado que las bases que estén en la misma columna sean iguales o lo más parecidos posibles.

Las secuencias de bases son introducidas en **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)** para comparar a la secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en su base de datos (Figura 4.11). El algoritmo encuentra las secuencias en la base de datos que tienen mayor similitud con la secuencia problema.

NCBI/ BLAST/ blastn suite Standard Nucleotide BLAST

blastn blasto blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange [Query subrange](#)

```

k ggggttaagc caccggcttc ggggtttacc gactttcatg acgtgnccgg
nngngtgta
61 aaggcccggg aacgtattca cccgacnctt gctgatctgc
gattactaga gactccgact
121 tccggggtc gagttgcsa ccccgatccg aactgagacc
agctttaaag gattegettc

```

From

To

Or, upload file No se ha seleccionado ningún archivo. [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):

16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) [?](#)

Organism

Optional Exclude [+](#)

Enter organism name or id—completions will be suggested

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown. [?](#)

Exclude Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Optional

Entrez Query

Optional Enter an Entrez query to limit search [?](#)

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm [?](#)

BLAST | Search database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Figura 4.11. Búsqueda en sistema BLAST de la NCBI.

El resultado de la búsqueda de comparar la secuencia problema con secuencias semejantes de la base de datos, da como resultado un listado de los microorganismos encontrados (Figura 4.12).

Son seleccionadas las secuencias de las 11 primeras especies de *Rodococcus* y secuencias de aquellas *actinobacterias* que en las pruebas bioquímicas nos indicaban como posibles. Entre ellas seleccionamos, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Gordonia* y *Dietzia* (Figura 4.12).

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus erythropolis PR4 DNA, complete genome	1762	13223	97%	0.0	99%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus jostii RHA1, complete genome	1655	9973	97%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus triatomae BKS 15-14 Contig0044, whole genome shotgun sequence	1626	2389	97%	0.0	96%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus baikonurensis strain A1-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1602	2445	97%	0.0	96%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus erythropolis strain N11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1602	2445	97%	0.0	96%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus globerulus strain DSM 43954 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1585	2371	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus fascians NBRC 12155 = LMG 3623 contig13, whole genome shotgun sequence	1585	2401	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Nocardia farcinica IFM 10152 DNA, complete genome	1580	7068	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Nocardia higoensis NBRC 100133 DNA, contig: NH1_con39, whole genome shotgun sequence	1574	2373	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus rhodnii LMG 5362 LMG 5362 contig097, whole genome shotgun sequence	1567	2321	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Nocardia higoensis NBRC 100133 DNA, contig: NH1_con39, whole genome shotgun sequence	1567	2338	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus equi ATCC 33707 chromosome, whole genome shotgun sequence	1559	11728	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Nocardia brasiliensis ATCC 700358, complete genome	1552	2279	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Nocardia asteroides NBRC 15531 DNA, contig: NCAST04, whole genome shotgun sequence	1541	2303	97%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus opacus strain DSM 43205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1541	1541	64%	0.0	95%
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus triatomae strain DSM 44892 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	2327	97%	0.0	94%

Figura. 4.12. Resultado de microorganismos encontrados después del alineamiento con el NCBI.

También le añadimos secuencias que no tienen nada que ver con nuestra secuencia problema (outgroup), como enterobacterias (*E. Coli*, *Vibrio cholerae*) y levaduras (*Cryptococcus neoformans* y *Debaryomyces hansenii*). Con este grupo externo podemos tener información acerca de las relaciones filogenéticas entre secuencias o grupos reduciendo el espacio de búsqueda y enraizar los árboles.

A continuación se detallan las secuencias bacterianas empleadas que serán comparadas con la secuencia problema (S1). Las secuencias de bases completas se encuentran en el apartado de Tablas.

Género *Rhodococcus*

>*Rhodococcus.erythropolis* gi|444304198|ref|NR_074622.1| *Rhodococcus erythropolis* PR4 strain PR4 (= NBRC 100887) 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Rhodococcus.qingshengii* gi|343203016|ref|NR_043535.1| *Rhodococcus qingshengii* strain djl-6 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Rhodococcus.erythropolis.N11* gi|310975160|ref|NR_037024.1| *Rhodococcus erythropolis* strain N11 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Rhodococcus.baikonurensis* gi|219857156|ref|NR_024784.1| *Rhodococcus baikonurensis* strain A1-22 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Rhodococcus.globerulus* gi|219846592|ref|NR_026184.1| *Rhodococcus globerulus* strain DSM 4954 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Rhodococcus.marinonascens* gi|219846591|ref|NR_026183.1| *Rhodococcus marinonascens* strain DSM 43752 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Rhodococcus.jostii* gi|444304186|ref|NR_074610.1| *Rhodococcus jostii* RHA1 strain RHA1 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Rhodococcus.triatomae* gi|343201626|ref|NR_042352.1| *Rhodococcus triatomae* strain: IMMIB RIV-085 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Rhodococcus.opacus* gi|444304207|ref|NR_074632.1| *Rhodococcus opacus* B4 strain B4 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Rhodococcus.equi* gi|343201166|ref|NR_041910.1| *Rhodococcus equi* strain DSM 20307 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Rhodococcus.rhodochrous* gi|310975159|ref|NR_037023.1| *Rhodococcus rhodochrous* strain 372 16S ribosomal RNA, partial sequence.

Género *Nocardias*

>*Nocardia.araoensis* gi|265678350|ref|NR_028652.1| *Nocardia araoensis* strain IFM 0575 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Nocardia.higoensis* gi|265678349|ref|NR_028651.1| *Nocardia higoensis* strain IFM 10084 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Nocardia.puris* gi|265678689|ref|NR_028994.1| *Nocardia puris* strain IMMIB R-145 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Nocardia.asiatica* gi|265678342|ref|NR_028644.1| *Nocardia asiatica* strain IFM 0245 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Nocardia.africana* gi|343201157|ref|NR_041872.1| *Nocardia africana* strain DSM 44491 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Nocardia.brasiliensis* gi|343201145|ref|NR_041860.1| *Nocardia brasiliensis* strain DSM 43758 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Nocardia.asteroides* gi|44816|emb|X53205.1| *Nocardia asteroides* partial 16S rRNA, complete sequence.

Género *Gordonia*

>*Gordonia.soli* gi|343202840|ref|NR_043331.1| *Gordonia soli* strain CC-AB07 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Gordonia terrae* gi|526445249|gb|KF177346.1| *Gordonia terrae* strain D1 nitrilase gene, complete cds.

Género *Dietzia*

>*Dietzia.maris* gi|310975161|ref|NR_037025.1| *Dietzia maris* strain AUCM A-593 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Dietzia.cinnamea* gi|343201664|ref|NR_042390.1| *Dietzia cinnamea* strain: IMMIB RIV-399 16S ribosomal RNA, partial sequence.

>*Streptomyces.gardneri* gi|343200517|ref|NR_041204.1| *Streptomyces gardneri* strain NBRC 3385 16S ribosomal RNA, partial sequence.

Género *Arthrobacter*

>*Arthrobacter.aurescens*.TC1 gi|444303850|ref|NR_074272.1| *Arthrobacter aurescens* TC1 strain TC1; ATCC BAA-1386 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Arthrobacter.phenanthrenivorans* gi|444439455|ref|NR_074770.1| *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 strain Sphe3 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Arthrobacter.chlorophenolicus* gi|444304094|ref|NR_074518.1| *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 strain A6 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Arthrobacter.sp.*FB24 gi|444304166|ref|NR_074590.1| *Arthrobacter sp.* FB24 strains FB24 16S ribosomal RNA, complete sequence.

>*Arthrobacter.oxidans* gi|5531224|emb|AJ243423.1| *Arthrobacter oxidans* partial 16S rRNA gene.

>*Arthrobacter.sp* gi|2143224|emb|Y13326.1| *Arthrobacter sp.* 16S rRNA gene, partial, 825 bp.

Género *Enterobacteria*

>*E.coli* gi|1240025|emb|X80721.1| *E.coli* rrmA gene.

Género *Vibrio*

>*Vibrio.cholerae* gi|444439495|ref|NR_074810.1| *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor str. N16961 strain N16961 16S ribosomal RNA, complete sequence.

Dominio *Fungi*

>*Cryptococcus.neoformans* gi|37706307|gb|AY340662.1| *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* cyclin (Cyclin3) mRNA, complete cds.

>*Debaryomyces.hansenii* gi|294658668|ref|XM_002770779.1| *Debaryomyces hansenii* CBS767 mitochondrial 54S ribosomal protein YmL40, partial mRNA.

4.3.4. Alineamiento múltiple

El alineamiento múltiple de secuencias (ASM) es con frecuencia el punto de partida, intermedio o final de los análisis bioinformáticos. Se usan para predecir estructura secundaria y 3D, son también el inicio de varios métodos filogenéticos, o para estimar matrices de peso (coste de mutaciones y gaps), afinar parámetros de análisis de secuencias, o para identificar las zonas más conservadas y asociarlas a la función.

4.3.5. Alineamiento múltiple de secuencias (ASM) con Clustal

El programa de mayor aceptación para el ASM de secuencias es **ClustalW2** que forma parte del paquete Phylips y está disponible en varios servidores.

En ASM se puede observar pequeños fragmentos, trozos o zonas conservadas presentes en un grupo de secuencias. En los rectángulos marcados en rojo podemos observar un alineamiento de una región altamente conservada de las procariotas (Figura 4.13).

realiza el alineamiento (Figura 4.14). Como se puede observar existe una gran coincidencia de bases entre el microorganismo problema (S1) con las distintos géneros de las actinobacterias empleados para su comparación. Podemos observar que existe una baja coincidencia con otros microorganismos (*E. Coli* y *Vibrio*) que no pertenecen a la familia de las *actinobacteriaceae*.

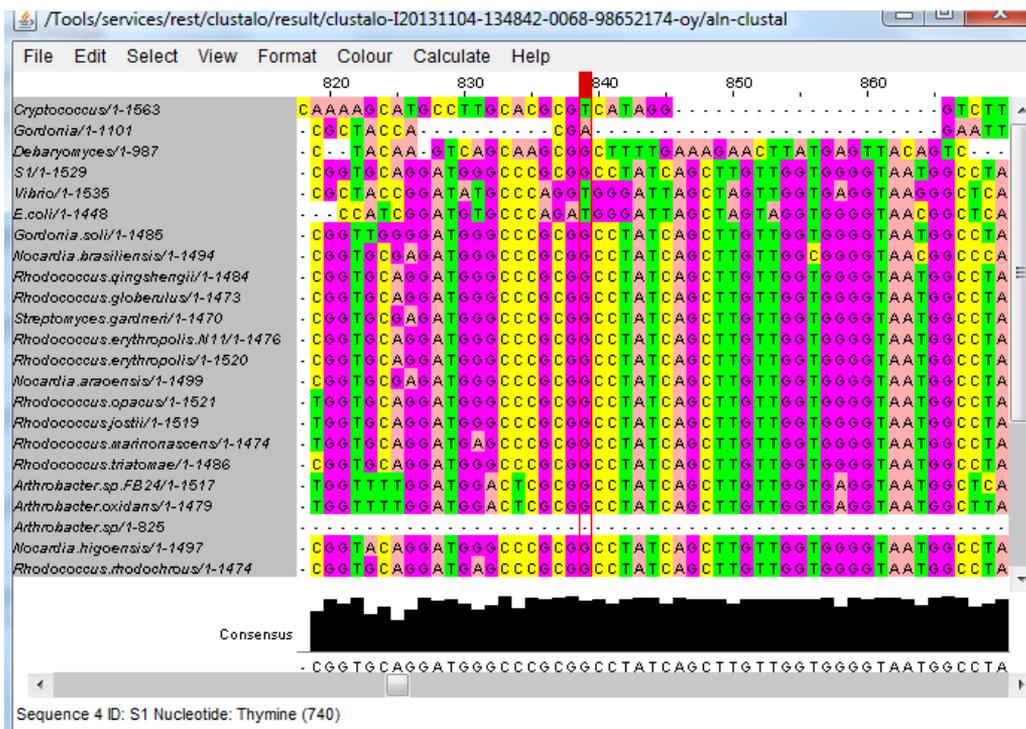


Figura 4.14. Resultado del alineamiento con ClustalW2 (Jalview).

4.3.6. Construcción del árbol filogenético con JALVIEW

Dado un conjunto de secuencias alineadas se necesita calcular las distancias entre cada una de ellas. Cuando se trabaja con secuencias de DNA es frecuente anotar el número de residuos diferentes, pero también es posible usar matrices de peso para estos cálculos. Las distancias se pueden expresar

en términos absolutos, pero es más conveniente “normalizarlos” llevándolos a relativos con respecto al total de residuos de las secuencias alineadas.

A partir de la matriz de distancias se obtienen las longitudes de las ramas que definen el árbol filogenético, por los métodos de distancias.

En el árbol filogenético observamos que el microorganismo investigado (S1) es agrupado con la familia *norcadiaceae* género *rhodococcus* (Figura 4.15).

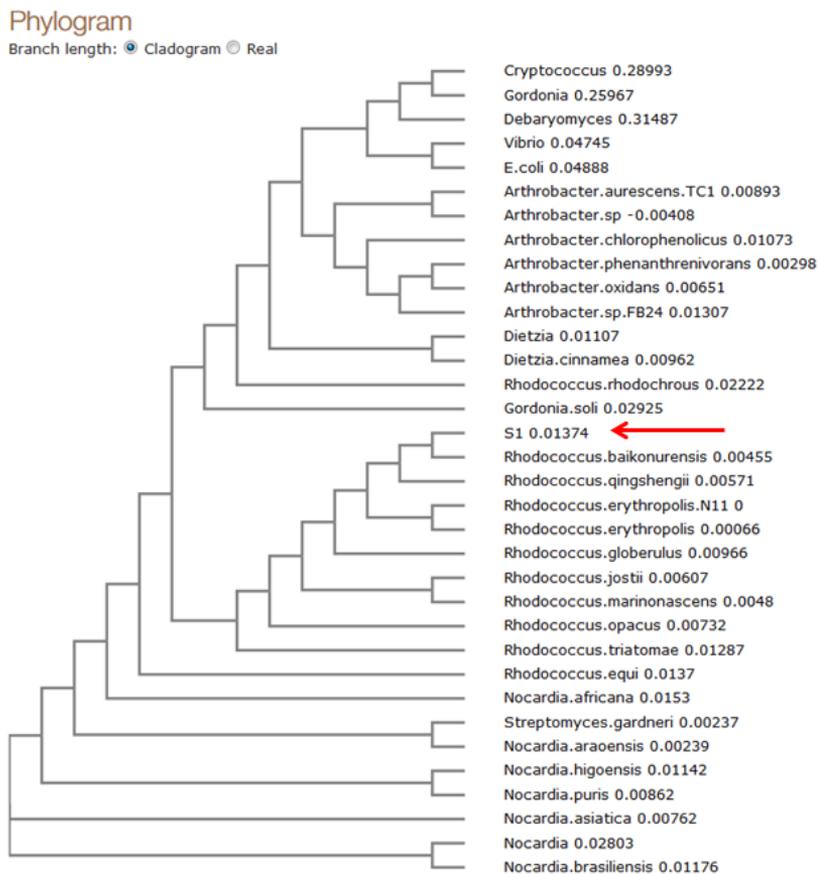


Figura 4.15. Resultado del árbol filogenético de distancias con ClustalW2.

Para asegurarnos que el árbol filogenético es el correcto empleamos un nuevo programa CLC BIO que nos dibuja un cladograma y mide las distancias con mayor exactitud.

4.3.7. Alineamiento múltiple y árbol filogenético con CLC BIO

CLC Bio, crea un software que permite hacer un gran número de análisis bioinformáticos con excelentes opciones de visualización y salida de gráficos.

En el alineamiento con CLC Bio podemos observar la coincidencia de bases con los demás microorganismos comparados y las zonas conservadas marcadas con barras. Existiendo unas grandes coincidencias de bases con los microorganismos de la familia de las *actinobacteriaceae* (Figura 4.16).

En el cladograma observamos un diagrama que esquematiza la filogenia más probable de un grupo de taxones. Podemos observar las distancias entre las distintas especies, la secuencia problema (S1) es agrupada con el género *Rhodococcus* (Figura 4.17).

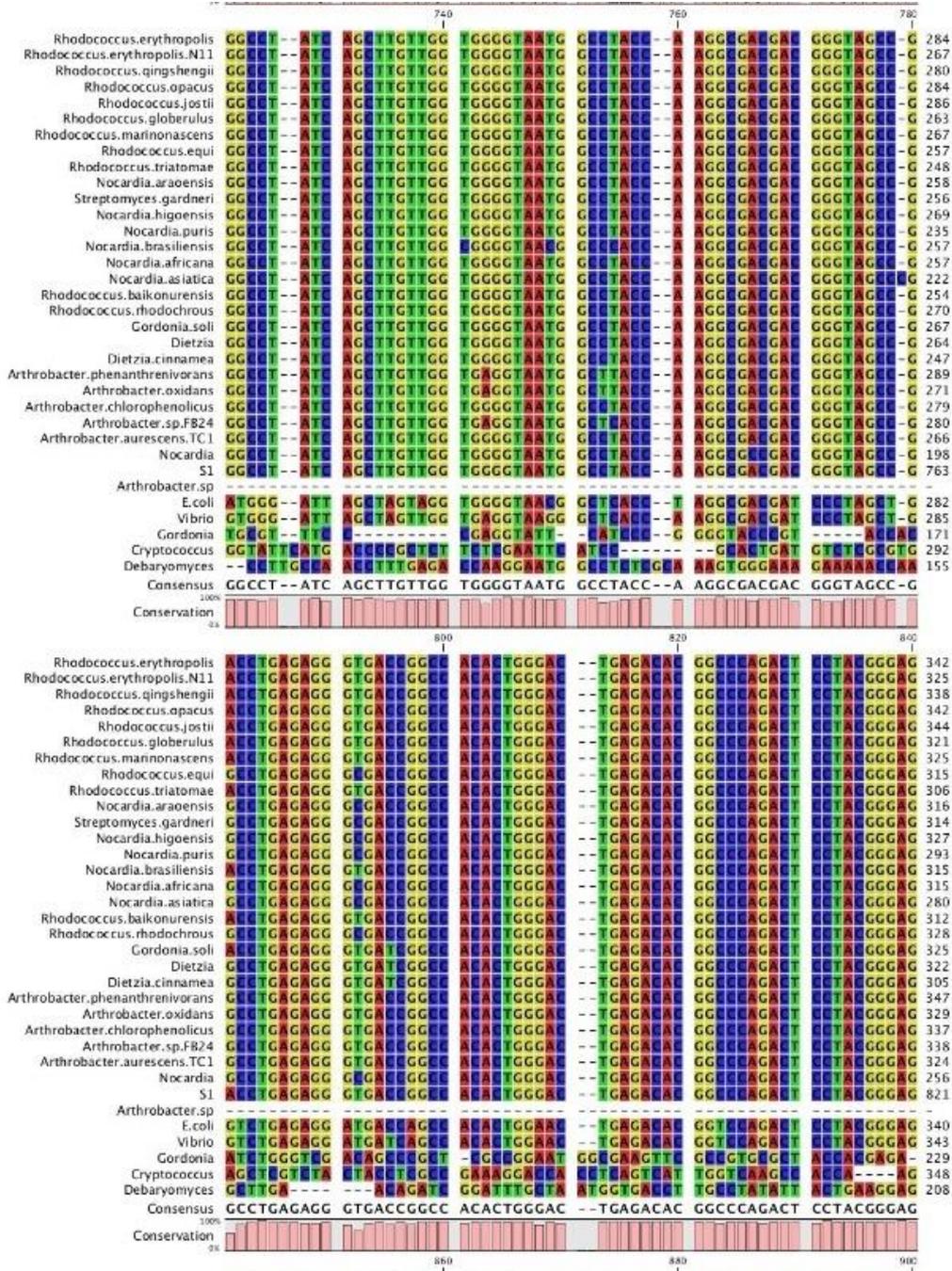


Figura 4.16. Resultado del alineamiento múltiple con CLC BIO 7.02.

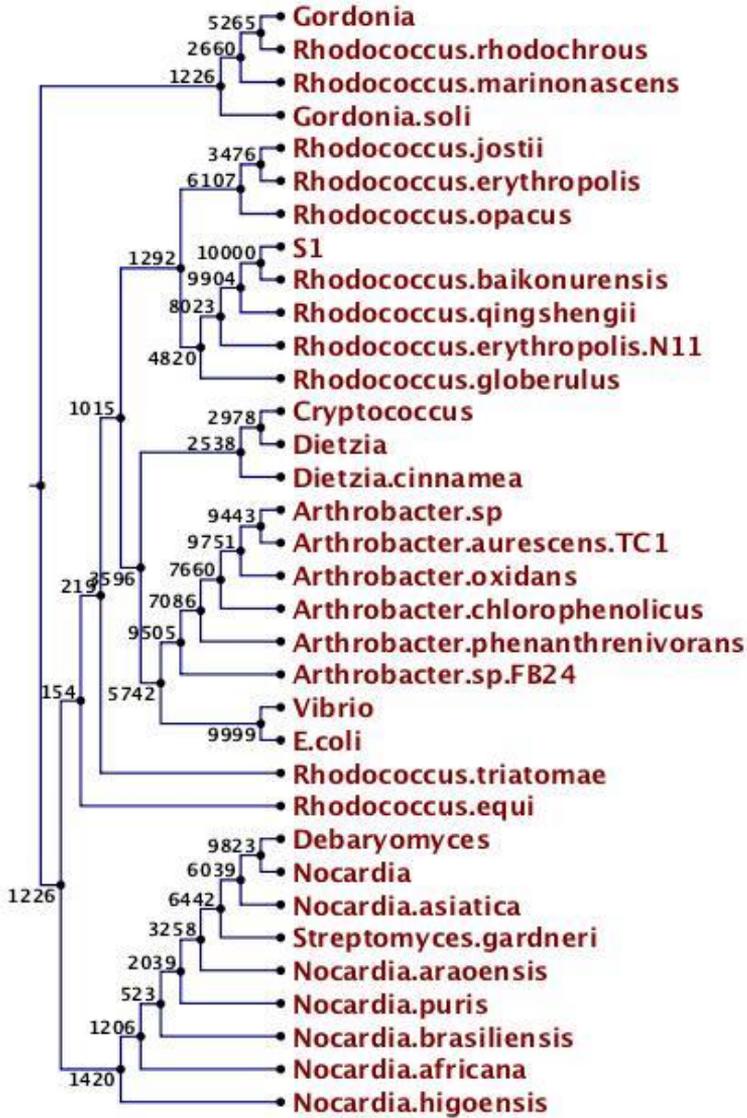


Figura 4.17. Resultado del cladograma realizado por CLC BIO 7.02.

4.3.8. Porcentaje de similitud

Similitud es una cantidad observable que puede ser expresada como, por ejemplo, un porcentaje de identidad.

En las tablas (4.10; 4.11 y 4.12) podemos observar los resultados de comparar (S1) con los distintos grupos de bacterias. El mayor porcentaje de identidad de *Nocardias* corresponde a la *Nocardia asiática* con 93.9% (Tabla 4.10). El mayor porcentaje de identidad con los *Rhodococcus* corresponde con el *Rhodococcus baikonurensis* con un 96.0%, seguido del *Rhodococcus Erytropolis N11* (Tabla 4.11). Y la puntuación de identidad más alta corresponde a *Arthrobacter aurescens TC1* con un 90.4% (Tabla 4.12-A). Correspondiendo la puntuación más baja de identidad a los que se encuentran fuera del grupo (outgroup) de las *actinobacterias* (Tabla 4.12-B), en este caso corresponde a las levaduras, *Cryptococcus neoformans* y *Debaryomyces hansenii* con un porcentaje del 32.6 y 35.2% respectivamente.

El estudio de estas tablas, nos indica que la mayor similitud corresponde al género *Rhodococcus* seguida del género *Nocardia*. El grupo con menor similitud corresponde al grupo de las levaduras (*Cryptococcus neoformans* y *Debaryomyces hansenii*)

Tablas de Porcentaje de Identidad - Creadas por ClustalW2.1

GRUPO NOCARDIAS		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Nocardia brasiliensis gi 343201145 ref NR_041860.1								
2	Nocardia asteroides gi 44816 emb X53205.1	93.6							
3	Nocardia higoensis gi 265678349 ref NR_028651.1	97.2	93.2						
4	Nocardia asiatica gi 265678342 ref NR_028644.1	98.3	93.8	98.6					
5	Nocardia puris gi 265678689 ref NR_028994.1	96.8	93.5	98.1	97.9				
6	Nocardia araoensis gi 265678350 ref NR_028652.1	97.2	93.2	97.2	98.5	97.3			
4	Streptomyces gardneri gi 343200517 ref NR_041204.1	97.6	92.9	97.2	98.7	97.4	99.5		
5	Nocardia africana gi 343201157 ref NR_041872.1	96.6	92.8	96.0	97.0	96.6	97.4	97.3	
9	S1	91.9	90.0	91.6	93.9	93.3	93.2	93.2	92.2

Tabla 4.10. Resultado del porcentaje de identidad con *Nocardias*.

GRUPO RHODOCOCCUS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Rhodococcus triatoma gi 343201626 ref NR_042352.1												
2	Rhodococcus equi gi 343201166 ref NR_041910.1	96.2											
3	Rhodococcus erythropolis gi 444304198 ref NR_074622.1	97.5	96.2										
4	Rhodococcus erythropolis.N11 gi 310975160 ref NR_037024.1	96.5	96.1	99.9									
5	Rhodococcus qingshengii gi 343203016 ref NR_043535.1	97.4	96.2	99.1	99.2								
6	Rhodococcus baikonurensis gi 219857156 ref NR_024784.1	97.1	96.1	99.1	99.1	99.7							
7	Rhodococcus globerulus gi 219846592 ref NR_026184.1	95.4	97.1	96.1	99.0	99.0	99.7						
8	Rhodococcus marinonascens gi 219846591 ref NR_026183.1	96.9	96.7	98.0	98.0	97.6	97.4	97.6					
9	Rhodococcus jostii 444304186 gi ref NR_074610.1	97.2	96.9	98.1	98.0	97.5	97.4	98.4	98.8				
10	Rhodococcus opacus gi 444304207 ref NR_074632.1	97.5	97.5	97.8	97.6	97.4	97.3	97.3	98.5	98.4			
11	Gordonia soli gi 343202840 ref NR_043331.1	95.7	95.1	94.5	94.5	94.3	94.0	93.9	94.5	94.3	94.8		
12	Rhodococcus rhodochrous gi 310975159 ref NR_037023.1	96.5	96.1	95.2	95.8	96.0	95.4	95.2	95.9	95.6	96.3	94.6	
13	S1	94.7	93.0	95.0	95.8	95.2	96.0	94.6	94.4	92.9	93.1	90.1	91.8

Tabla 4.11. Resultado del porcentaje de identidad con *Rhodococcus*.

(A) GRUPO	1	2	3	4	5	6
ARTHROBACTER						
1 Arthrobacter aurescens.TC1						
2 Arthrobacter spp	99.6					
3 Arthrobacter chlorophenolicus	97.5	98.4				
4 Arthrobacter phenanthrenivoran	97.6	97.8	98.6			
5 Arthrobacter xidans	97.4	97.7	98.2	99.2		
6 Arthrobacterspp.FB24	96.6	96.5	97.4	97.9	98.1	
7 S1	86.8	90.4	86.6	85.8	86.6	85.6

(B) OUTGROUP	1	2	3	4
1 E.coli				
2 Vibrio	90.3			
3 Cryptococcus	30.2	31.0		
4 Debaryomyces	35.3	37.1	52.5	
5 S1	73.4	73.2	32.6	35.2

Tabla 4.12. Resultado del porcentaje de identidad para *Arthrobacter* (A) y fuera del grupo de *Actinobacterias* (B).

4.3.9. Alineamiento y taxonomía con (RDP-II)

Ribosomal Database Project-II (RDP-II) proporciona datos, herramientas y servicios relacionados con las secuencias de RNA ribosomal (Figura 4.18). A través de su sitio web, RDP-II ofrece alineamientos de secuencias y, servicios de análisis e inferencias filogenéticas (árboles) derivados de estos datos. La versión actual 9.0 estrena una nueva alineación actualizada con más de 50.000 secuencias bacterianas (Cole *et al.*, 2003). Estos nuevos servicios de análisis incluyen secuencia de búsqueda y herramienta de selección, incluyendo un árbol filogenético y herramienta de visualización (Phylip Interface).

Ribosomal Database Project-II, nos aporta la siguiente clasificación taxonómica del microorganismo problema (S1) (Figura 4.18).

Phylum.....	<i>Actinobacteria</i>
Class.....	<i>Actinobacteria</i>
Subclass.....	<i>Actinobacteridae</i>
Order.....	<i>Actinomycetales</i>
Suborder.....	<i>Corynebacterineae</i>
Family.....	<i>Nocardiaceae</i>
Genus.....	<i>Rhodococcus</i> (sin especificar especie)

Lineage (click node to return it to hierarchy view):

Hierarchy View:

rootrank Root (34) (query sequences) [show printer friendly results](#) [download as text file](#)

- E.coli [view selectable matches]
- domain Bacteria (30)
 - phylum "Actinobacteria" (29)
 - class Actinobacteria (29)
 - subclass Actinobacteridae (29)
 - order Actinomycetales (29)
 - suborder Corynebacterineae (23)
 - family Dietziaceae (2)
 - genus Dietzia (2)
 - Dietzia [view selectable matches]
 - Dietzia.cinnamea [view selectable matches]
 - family Nocardiaceae (21)
 - Rhodococcus.triatomae [view selectable matches]
 - genus Gordonia (1)
 - Gordonia.soli [view selectable matches]
 - genus Nocardia (8)
 - Nocardia.araoensis [view selectable matches]
 - Nocardia.higoensis [view selectable matches]
 - Nocardia.africana [view selectable matches]
 - Nocardia.puris [view selectable matches]
 - Nocardia.asiatica [view selectable matches]
 - Nocardia [view selectable matches]
 - Nocardia.brasiliensis [view selectable matches]
 - Streptomyces.gardneri [view selectable matches]
 - genus Rhodococcus (11)
 - Rhodococcus.erythropolis.N11 [view selectable matches]
 - Rhodococcus.marionascens [view selectable matches]
 - Rhodococcus.equi [view selectable matches]
 - Rhodococcus.erythropolis [view selectable matches]
 - Rhodococcus.qingshengii [view selectable matches]
 - Rhodococcus.rhodochrous [view selectable matches]
 - S1 [view selectable matches]
 - Rhodococcus.jostii [view selectable matches]
 - Rhodococcus.globerulus [view selectable matches]
 - Rhodococcus.opacus [view selectable matches]
 - Rhodococcus.baikonurensis [view selectable matches]
 - suborder Micrococcineae (6)
 - family Micrococcaceae (6)
 - genus Arthrobacter (6)
 - Arthrobacter.chlorophenolicus [view selectable matches]
 - Arthrobacter.phenanthrenivorans [view selectable matches]
 - Arthrobacter.oxidans [view selectable matches]
 - Arthrobacter.sp.FB24 [view selectable matches]
 - Arthrobacter.aurescens.TC1 [view selectable matches]
 - Arthrobacter.sp [view selectable matches]
 - phylum "Proteobacteria" (1)
 - class Gammaproteobacteria (1)
 - order "Vibrionales" (1)
 - family Vibrionaceae (1)
 - genus Vibrio (1)
 - Vibrio [view selectable matches]
 - domain Fungi (3)
 - Debaryomyces [view selectable matches]
 - Cryptococcus [view selectable matches]
 - Gordonia [view selectable matches]

Figura 4.18. Resultado de la taxonomía con Ribosomal Database Project II.

4.3.10. Contenido G+C

El contenido G+C se utiliza para clasificación taxonómica de organismos. Por ejemplo, las Actinobacteria que se caracterizan por ser “bacterias de G+C alto”. Para comprobar que el contenido de G+C es alto de la bacteria (S1) que estamos investigando, introducimos en un marco de lectura del programa Wobble de EMBOSS la secuencia problema (Figura 4.19).

El porcentaje de moles se representa mediante un gráfico dividido en 6 parcelas (Figura 4.20). Sobre cada parcela del gráfico, hay una línea horizontal que muestra el porcentaje de G+C. El resultado de C+G para nuestra muestra problema (S1) es 57.91% moles.

EMBOSS explorer

wobble

Plot third base position variability in a nucleotide sequence ([read the manual](#))

Unshaded fields are optional and can safely be ignored. ([hide optional fields](#))

Input section

Select an input sequence. Use one of the following three fields:

1. To access a sequence from a database, enter the USA here:
2. To upload a sequence from your local computer, select it here: No se ha seleccionado ningún archivo.

```

1321 attaagcgcc cgcctgggg agtacggcg
caaggctaaa actcaaagga atgacgggg
1381 gccgcacaa gggcggggc atgtggatta
attcgatgca acggaagaa ccttacongg
1441 gttgacata tacggaaag ctgcaganat
gtggccccc ttgtggtcgg tatacaggtg
1501 gtgcattgct gtcgncagcn cmngncgtg
//

```

3. To enter the sequence data manually, type here:

Additional section

Window size in codons

Advanced section

Bases used

Figura 4.19. Ventana de lectura del programa Wobble de EMBOSS.

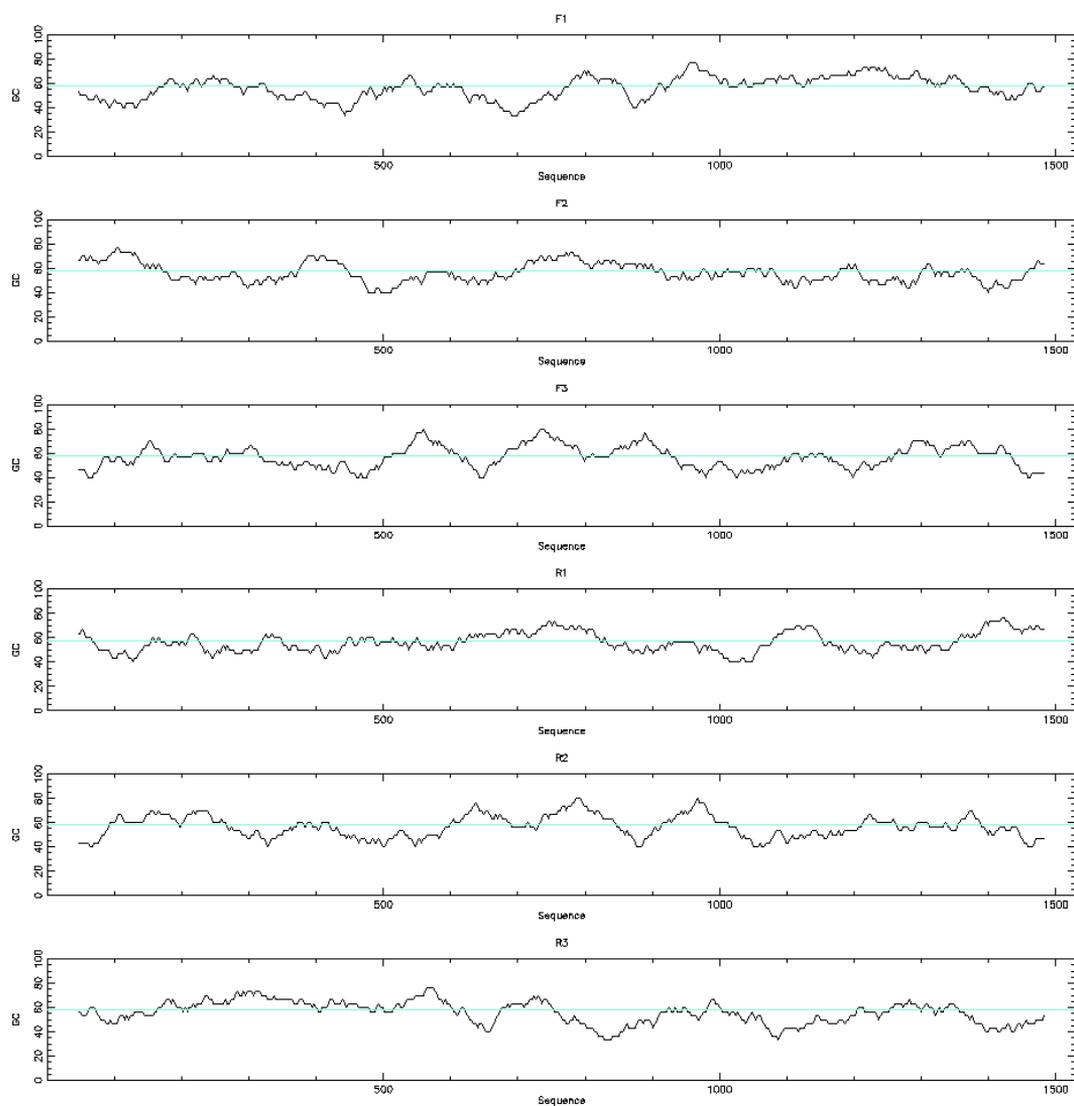


Figura 4.20. Resultado de % moles G+C en programa Wobble de EMBOSS.

4.3.11. Comprobación de resultados con primers de Nocardias

Para confirmar los resultados obtenidos se realizó un estudio posterior de PCR y secuenciación con primers pertenecientes a la familia de las Nocardias marcados como 27f y 1525r (Rainey *et al.*, 1996). La secuencia problema fue identificada como (S1_Nocar).

Secuencias (S1_Nocar)

```
NNNNNNNNNNNNNNNTGCnGTCGAGCGGTAAGGCCTTTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGG
TGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATAC
CGGATATGACCTCNNTNGCATGNNNNNGNGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCCG
GGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT
TGTA AACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTA
AAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCGTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCA
GGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
CGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAC TGACGCTGAGG
ACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGC
GCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGAATCCGTGCCGNANCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGG
GGAGTACNGCCGCAAGGCTNAAACTCNAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGANCA
TGTGGATTAATTCNATGCAACGCGAANAANCTTACCNGGGTTTGACNNATNCCNGAAAGCTGC
ANNNATGTGGCCCCNCCTTGNGGTTCGNANNNCAGGNGGTGCNTGGCNGTCGNANCNTCNTGT
CNTGGANN TGTTGGGNNANGTCCNNCANCNANNNNNNNCCCNNTCNTATGTTNNC NNNNNNN
NNNNGGNGGGGNANNNNNNNNNNNNNNGNCNGNGNTC NNNNNNNNNANGNAANNNG
```

Con las secuencias obtenidas se realiza un alineamiento múltiple empleando para su comparación las mismas secuencias de especies de *Rodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Gordonia* y *Dietzia*. También le añadimos las secuencias de *E. Coli*, y *Vibrio cholerae* y de levaduras pertenecientes a las especies *Cryptococcus neoformans* y *Debaryomyces hansenii*.

En el resultado del alineamiento múltiple, podemos observar que las menores coincidencias corresponden a las enterobacterias y levaduras (Figuras 4.21). En el árbol filogenético, podemos observar que la secuencia (S1_Nocar) se encuentra encuadrada y alineada en el grupo de los Rhodococcu (Figura 4.22).

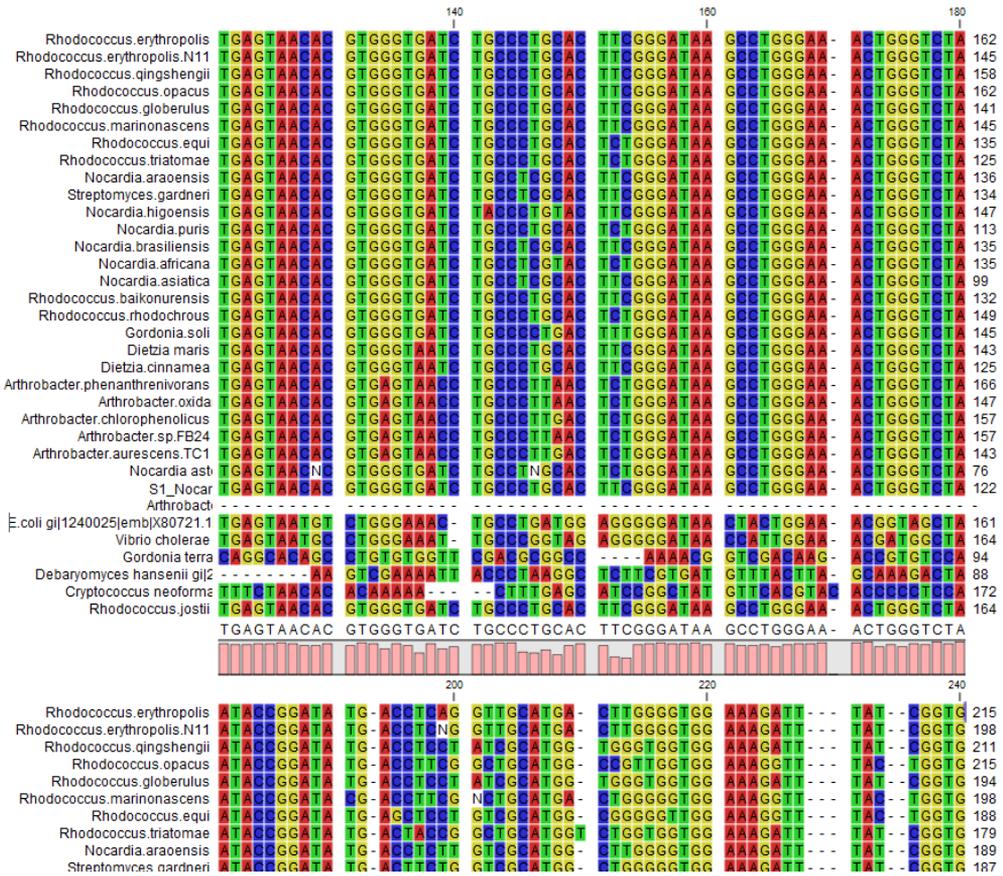


Figura 4.21. Alineamiento de secuencias con preimer de nocardias.

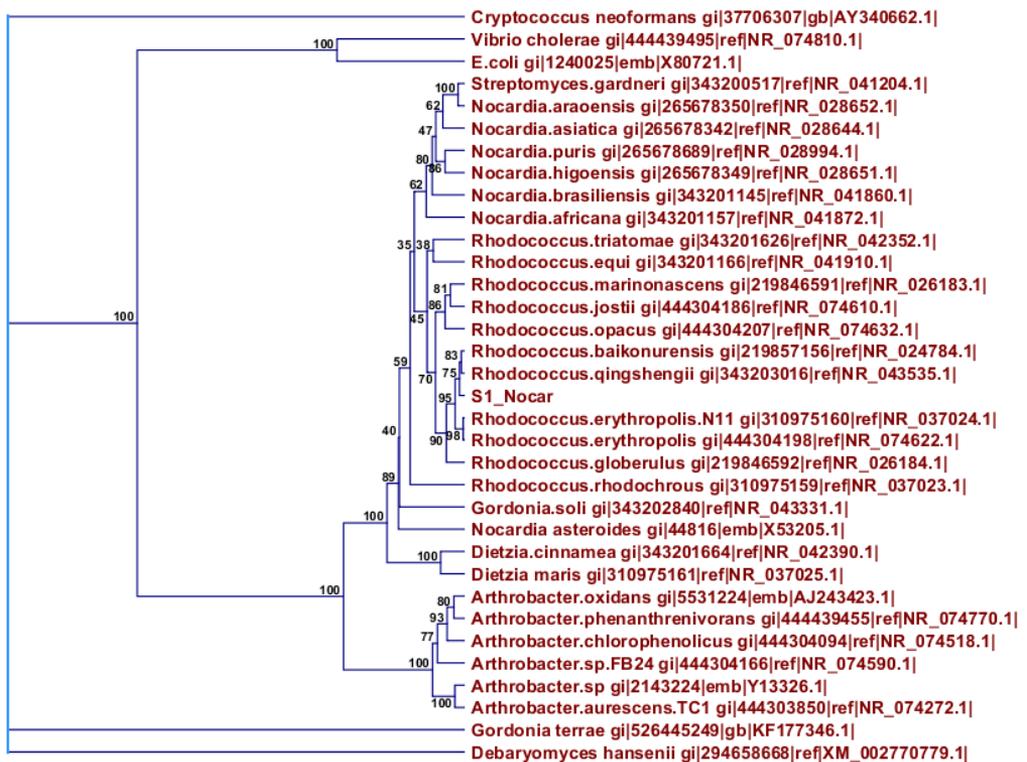


Figura 4.22. Resultados del árbol filogenético realizado con primers para *Nocardias*.

Los resultados obtenidos tanto en el alineamiento múltiple como en el árbol filogenético, confirman los estudios anteriores realizados con primers universales de bacterias.

4.3.12. Conclusiones del análisis genotípico

Los estudios basados en datos de la secuencia de 16S rRNA han podido confirmar la existencia de una relación muy próxima entre los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, y han demostrado que

este taxón forma un grupo supragenérico dentro del proceso evolutivo de los Actinomycetos.

Con la realización de la PCR con primers universales GM3F y GM4R (Muyzer *et al.*, 1995), y con la posterior purificación se obtuvo una buena calidad de DNA, la cual se empleó para secuenciación.

Tanto en los alineamientos múltiples como en los arboles filogenéticos se observó que la secuencia query (S1) pertenece al género *Rhodococcus*.

Esta misma secuencia problema (S1) se introdujo en la base de datos de Ribosomal Database Project-II (RDP-II), para la obtener su filogenia, dando como resultado que esta secuencia pertenece al Phylum: *Actinobacteria*; Subclass: *Actinobacteridae*; Order: *Actinomycetales*; Suborder: *Corynebacterineae*; Family: *Nocardiaceae*; Genus: *Rhodococcus*; especie sin identificar, lo cual confirma los resultados anteriores.

Como las actinobacterias son microorganismos con alto contenido en C+G, este dato fue confirmado mediante análisis de las secuencias en el programa bioinformático wobble de EMBOSS. Dando como resultado un alto porcentaje en G+C. (57.91% moles).

En las tablas de Porcentaje de Identidad Creadas por ClustalW, se muestra que el mayor porcentaje de identidad corresponde al grupo de *Rhodococcus* con 95.8% seguido del grupo de *Nocardias* con 93.9%.

Para comprobar los datos obtenidos, se realizó nueva PCR y secuenciación con primers para familias de las *Nocardiaceae*, marcados como 27f y 1525r (Rainey *et al.*, 1996), la identificación de la secuencia problema (S1_Nocar) nos confirma los mismos resultados obtenidos con los primers universales.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral han llevado a las siguientes conclusiones:

- i. Tanto los parámetros físico-químicos, como los parámetros químicos orgánicos analizados permanecen dentro del valor paramétrico establecido por el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero del mismo año, exceptuando la determinación de cloro detectándose una cantidad inferior a lo establecido en el R.D. los lunes y aumentado la actividad de cloro los viernes.
- ii. Los bioindicadores microbiológicos relativos a la contaminación biológica del agua que comprende bacterias aeróbicas como: *coliformes*, *estreptococos fecales* y *pseudomonas* que forman parte del llamado ciclo de contaminación fecohídrica del agua, ha resultado ser negativos a las distintas pruebas bacteriológicas.
- iii. Las mejores condiciones de cultivo para el recuento de los microorganismos aislados fueron 22°C durante 72

horas, siendo independiente del medio de cultivo empleado Agar Nutritivo o R2A.

- iv. El microorganismo aislado es una bacteria pleomorfica, encontrándose en forma bacilar en los cultivos recientes, pasando posteriormente a forma cocoide en cultivos estacionarios. En la tinción de Gram y en las preparaciones de microscopia electrónica se observan formas en "V" y "L", compatible con la clase *Actinobacteriaceae*.
- v. Los resultados de los sistemas miniaturizados (Api Coryne y MicroScan) y de las pruebas bioquímicas complementarias ensayadas no fueron lo determinantes en la diferenciación entre los géneros *Arthrobacter* y *Rhodococcus*.
- vi. Las pruebas genóticas mediante la investigación 16S rRNA, los alineamientos múltiples por distintos programas bioinformáticos y la realización de árboles filogenéticos, nos da como resultado que la bacteria aislada pertenece con mayor probabilidad de identidad al género *Rhodococcus*, seguido del género *Nocardia* y del género *Arthrobacter*.

- vii. El estudio del contenido de moles en % de G+C, nos confirma que es compatible con clase *Actinobacteriaceae*. Mediante el estudio de la taxonomía por medio del programa Ribosomal Database Project II, se confirma que pertenece a la clase *Actinobacteriaceae*, familia *Nocardiaceae*, género *Rhodococcus*.
- viii. Al no existir una identificación al 100% con ninguna de las especies descritas en los alineamientos y teniendo en cuenta la distancia filogenética, se puede decir que nos encontramos ante una nueva especie de Actinobacteria del género *Rhodococcus*.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

6.0 BIBLIOGRAFIA

- Amann, R. I., Zarda, B., Stahl, D. A., and Schleifer, K. H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ. Microbiol.* 1992; 58: 3007-3011.
- Almuzara, M., Demier, C.; Rodríguez, C. R., Famiglietti, A.M., Vay, C. A. Evaluación del sistema API Coryne, versión 2.0, para la identificación de bacilos grampositivos difteroides de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología.* 2006; 38: 197-201.
- Anand Mehta, John Maggioncalda, Omar Bagasra, Seshamma Thikkavarapu, Pamujula Saikumari, Tibor Valyi-Nagy, Nigel W. Fraser, Timothy M. Block. *In situ* DNA PCR and RNA hybridization detection of herpes simplex virus sequences in trigeminal ganglia of latently infected mice. *Virology.* 1995; 206:633-40.
- Aldan, A. Long, Paul, Komminoth. *In Situ* PCR. *Methods in Molecular Biolog.* 1997; 71:141-61.
- Alshamaony, L., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Mordarska, H. Free mycolic acids as criteria in the classification of Gordona and the 'rhodochrous' complex. *J Gen Microbiol.* 1976; 92:183-187.

Baba, H., Nada, T., Ohkusu, K., Ezaki, T., Hasegawa, Y. & Paterson, D. L. First case of blood stream infection caused by *Rhodococcus erythropolis*. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:667–69.

Baldus Patel Jean, PhD. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis.* 2001; 6(4):313-321.

Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. & Christofi, N. The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol.* 1998; 85:195–10.

Benkel B. F., Y. Fong. Long range-inverse PCR (LR-IPCR): extending the useful range of inverse PCR. *Genet Anal.* 1996; 13(5):123-127.

Berg Rasmussen Henrik (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0458-2, InTech, DOI: 10.5772/37724. Available.

[http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te.](http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te)

- Birdsell John A. Integrating Genomics, Bioinformatics, and Classical Genetics to Study the Effects of Recombination on Genome Evolution. *Mol Biol Evol.* 2002; 19 (7): 1181-1197.
- Boone, D.R., Whitman, W. B. & Koga, Y. Order III. *Methanosarcinales* ord. nov.. In D.R. Boone & R.W. Castenholz (eds.), Vol. 1: The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. In G.M. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York. 2001. p. 268-294.
- Brown, E. & Hendler, E. *Rhodococcus peritonitis* in a patient treated with peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis.* 1989; 14: 417-18?
- Bustin, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002; 29:23-39.
- Carter, Jeff. Evaluation of Recovery Filters for Use in Bacterial Retention Testing of Sterilizing-Grade Filters. *PDA J Pharm Sci Technol.* 1996; 50(3):147-153.
- Castro, Nuria, Alicia E. Toranzo y Beatriz Magariños. Avances en el Conocimiento del Patógeno Emergente de Rodaballo *Edwardsiella tarda*. Academia Galega de Ciencias. 2009; 28: 215-281.

- Cheng Suzanne, Carita Fockler, Wayne M., and Russell Higuchi. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Nati. Acad. Sci. USA. Genetics*. 1994; (91): 5695-99.
- Chun J. M. Goodfellow. Un análisis filogenético del género *Nocardia* con 16S rRNA secuencias de genes. *Int. J Syst Bacteriol*. 1995; 45: 240-45
- Chun, J., Blackall, L., Kang, S., Chil Hah, Y., and Goodfellow, M. Proposal to reclassify *Nocardia pinensis* as *Skermania piniformis* gen. *Int. J Syst Bacteriol*. 1997; 47: 127-32.
- Ciccarelli Francesca D., Tobias Doerks, Christian von Mering, Christopher J. Creevey, Berend Snel, Peer Bork. Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. *Science*. 2006;311(5765):1283-1287.
- Clarridge Jill E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4): 840-862.
- Conti-Díaz IA, Calegari L, Civila E. Revisión de los casos nacionales de infecciones por actinomicetos del género *Nocardia*. *Rev Urug Patol Clin Microbiol*. 1974; 12: 25-33

Cole JR , B. Chai , TL Marsh , RJ Farris , Q. Wang , SA Kulam , S. Chandra , DM McGarrell, GM Garrity y JM Tiedje. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Oxford Journals, Nucleic Acids Research. 2003, 31(1): 442-43.

Collins, M. D. and Cummins, C. S. Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 350 AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986; 2:1266–1276.

Colquhoun, J. A., Mexon, J., Goodfellow, M, Ward, A. C., Horikoshi, K. and Bull, A. T. Novel rhodococci and other mycolata actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998; 74: 27-40.

Conville, P. S. & Witebsky, F. G. *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edn. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2007. pp. 515–542.

Costa, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España.

Formación Médica Continuada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(5):299-305.

Cuesta Amat, G. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. (Tesis Doctoral). Valencia: Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia; 2004.

De Bruijn F.J, J. Rademaker, M. Schneider, U. Rossbach and F.J. Louws. Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogentic Analyses. *Biology of plant-microbe interaction*. 1996: 497-502.

Deok Park Soon, Young Uh, In Ho Jang, Kap Jun Yoon, Hwang Min Kim, Yon Jung Bae. *Rhodococcus erythropolis* septicaemia in a patient with acute lymphocytic leukaemia. *J Med Microbiol*. 2011; 60: 252-255.

Díaz de Santos. (Editorial). *Métodos Normalizados para Análisis de Aguas Potables y Residuales*. Editorial Díaz de Santos. Tubidez. 1992:2-12.

Díaz de Santos. (Editorial). *Métodos Normalizados para Análisis de Aguas Potables y Residuales*. Método fotométrico de emisión de llama. 1992: 3-167.

Díaz de Santos. (Editorial). Métodos Normalizados para Análisis de Aguas Potables y Residuales. Método titulométrico de EDTA. 1992:3-97.

Díaz de Santos. (Editorial). Métodos Normalizados para Análisis de Aguas Potables y Residuales. Método argentrométrico. 1992:4:77.

Directiva del Consejo 75/440/CEE de 16 de junio de 1975. Relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros (75/440/CEE) (DO L 194 de 25. 7. 1975, p. 26.).

Directiva 79/869/CEE del Consejo, de 9 de octubre de 1979. Relativa a los métodos de medición y a la frecuencia de los muestreos y del análisis de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros (79/869/CEE) (DO L 271 de 29.10.1979, p. 44).

Directiva 80/778/CEE de 15 de julio de 1980. Relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. 1980. Diario Oficial n° L 229: 0011 – 0029. DOCE 229/L, Diario Oficial de las Comunidades Europeas (30-08-80)

Directiva 98/83/CE de 3 de noviembre de 1998. Relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. L 330/32. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (5-12-1998).

Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. L 327/1. Diario Oficial de (22-12-2000).

Dionisi, Hebe M., Gerda Harms, Alice C. Layton, Igrid R. Gregory, Jack Parker, Shawn A. Hawkins, Kevin G. Robinson, Gary S. Saylor. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(11): 6597-604.

Eisen Jonathan, A., Esteven W. Smith and Colleen, M. Cavanaugh. Phylogenetic Relationships of Chemoautotrophic Bacterial Symbionts of *Solemya velum* Say (Mollusca: Bivalvia) Determined by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Jornal of Bacteriology.* 1992; 174(10) 3416-21.

Ehrmann, M., Wolfgang, L. and Schleifer, K.H. (1992) Species specific oligonucleotide probe for the identification of *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 1992; 15:453-455.

Espy M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D.C. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. Cockerill III, and T. F. Smith. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for

- Routine Laboratory Testing *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19(1): pp. 165–66.
- Felsenstein, J. Evolutivos árboles forman secuencias de DNA: un enfoque de máxima verosimilitud. *Journal of Molecular*. 1981; 17: 368-376.
- Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*. 1985; 39(4):783-791.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: phylogenetic inference package, version 3.5c. Departamento de Genética de la Universidad de Washington, Seattle, Washington.
- Fernández Olmos, Ana; García de la Fuente, Celia; Sáez Nieto; Juan Antonio Valdezate Ramos, Sylvia. *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2010. ISBN-978-84-614-7932-0.
- Fitch, WM, y E. Margoliash. Construcción de árboles filogenéticos: un método basado en distancias de mutación como se estima a partir de secuencias de citocromo C es de aplicabilidad general *Ciencia*. 1967; 155: 279-84.

- Flores, M. and Desmond, E. Opacification of Middlebrook agar as an aid in identification of *Nocardia farcinica*. J Clin Microbiol. 1993; 3: 3040-3041.
- Freney J., Duperron MT., Courtier C., Hansen W., Allard F., Boeufgras JM. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods of identifying coryneform bacteria. J Clin Microbiol. 1991; 29: 38-41.
- Fulton, A; Isaacs W. «Titin, a huge, elastic sarcomeric protein with a probable role in morphogenesis». BioEssays. 1991; 13 (4):157–61.
- Funke G., Hutson Roger A., Katryn A. Bernard, Pfyffer Gaby E. Wauters, G and Collins Matthew D. Isolation of *Arthrobacter* spp. from Clinical Specimens and Description of *Arthrobacter cumminsii* sp. and *Arthrobacter woluwensis* sp. Int. J Syst Microbio. 1996; 34 (10):2356–63.
- Funke, G., R. A. Hutson, K. A. Bernard, G. E. Pfyffer, G. Wauters, and M. D. Collins. Isolation of *Arthrobacter* spp. from clinical specimens and description of *Arthrobacter cumminsii* sp. and *Arthrobacter woluwensis* sp. J Clin Microbiol. 1996; 34:2356-2363.
- Funke, G., A. von Graevenitz, J. E. Clarridge III, and K. A. Bernard. Clinical microbiology of coryneform bacteria. J Clin Microbiol. 1997; 10:125-59.

Funke G, Renaud FNR., Freney J., Riegel P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (Rapid) Coryne Database 2.0. J Clin Microbiol. 1997; 35: 3122-6.

Futuyma, Douglas J. (1998). Evolutionary Biology (3rd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-189-7.1998: p.30

García Bermejo, I. *Rhodococcus*, aspectos microbiológicos y clínicos. (Revista en internet). Control Calidad. SEIMC.2004
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriología.2004>.

García Bermejo, I. *Rhodococcus equi*: Aspectos microbiológicos y clínicos. (revista en Internet) Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Getafe. Madrid. 2005.
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/Bacteriología/Requi.pdf>.

Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2004.

Ghera, R.L. Preservation. In: Gehrardt P, Costilow RN. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. 1981: 208-217

Ghiose, W.C. and Wilson J. T. 1988. Microbial ecology of terrestrial subsurface.

Adv. Appl. Microbiol. 1998; 33: 107-72.

González Iglesias, Verónica.) Producción de antibióticos en *Streptomyces* asociados a organismos marinos. (Tesis Doctoral). Universidad de Oviedo). 2013.

González, R. Pareja, R. Ballesteros, C. Microscopía electrónica. Editorial: Eudema Universidad. Textos de Apoyo. Madrid. (1991). ISBN 10: 8477540756 ISBN 13: 9788477540755

Gleick, Peter H. The World's Water: The Biennial Report on Freshwater Resources. Washington: Island Press. (10 de noviembre de 2006). ISBN 978-1-59726-105-0.

Guerrero Chicote, E. 2004. "Análisis microbiológico de aguas radiactivas oligotróficas bioensuciamiento en piscinas nucleares". (Tesis doctoral). Madrid. UPM, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Madrid.

Guías para la calidad del agua potable. OMS. 2004. ISBN 92 4 154696 4.

Guido Funke, Roger A. Hutson, Kathryn A. Bernapd, Gaby E. Pfyffer, Georges Wauterrrs, and Matthew D. Collins. Isolation of *Arthrobacter* spp. from Clinical Specimens and Description of *Arthrobacter cumminsii* sp. nov. and *Arthrobacter woluwensis* sp. Nov. Journal of Clinical Microbiology, 1996; 34 (10). 2356–2363.

Goodfellow, M., Thomas, E.G., James, A.L. Characterization of rhodococci using peptide hydrolase substrates based on 7-amino-4-methylcoumarin. FEMS Microbiology Letters .1987; 44:349-55.

Goodfellow, M. Genus Rhodococcus Zopf 1891, 28 AL. In: Williams ST, Sharpe ME & Holt JG (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1989; 4. pp. 2362-2371.

Goodfellow, Michael. Alderson, Grace & Jongsik Chun. Rhodococcal systematics: problems and developments. Antonie van Leeuwenhoek 1998; 74: 3–20.

Gurtler, V., Mayall, B.C. Seviour R. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus Rhodococcus? FEMS Microbiol Rev. 2004; 28(3):377–403.

Hall, Barry G. Predicting Evolution by In Vitro Evolution Requires Determining Evolutionary Pathways. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(9): 3035–3038.

- Hayashi, K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. Oncogene Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan. Genetic Analysis Biomolecular Engineering. 1992; 9(3):73-9.
- Hayden Matthew J., Thao M. Nguyen, Amanda Waterman, and Kenneth J Chalmers. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. BMC Genomics. 2008; 9: 80.
- Helmer, R. Water quality and Health. The Environmentalist. 1999; 19:11-16
- Hendricks David W., Procesos Unidad de Tratamiento de Agua: Física y Química Boca Raton. CRC Press, 2007, pp 44–62.
- Hertel, C. W. Ludwig and K. M. Schleifer. Introduction of silent mutation in a proteinase gene of *Lactococcus lactis* as a useful marker for monitoring studies. System Appl Microbiol. 1992; 15: 447-452.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko J. M., Engelhardt, H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105:963–3967
- Holt, J. G., Krieg, N.R., Sneath, P. H.A., J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland. 1994; p. 787.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. "The Actinomycetes. Groups 22-29". En: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994: pp.605-03.

Hou, X. G., Y. Kawamura, F. Sultana, S. Shu, K. Hirose, K. Goto, and T. Ezaki. Description of *Arthrobacter creatinolyticus* sp. Isolated from human urine. Int. J Syst Bacteriol.1998; 48:423-29.

Irlinger Françoise, François Bimet, Jérôme Delettre, Martine Lefevre and Patrick A. D. Grimont *Arthrobacter bergerei* sp. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005; 55: 457-62.

Ishige, T., Honda, K., Shimizu, S. «Whole organism biocatalysis». Curr Opin Chem Biol. 2005; 9 (2):174 - 80.

Jill, E. Clarridge. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinica Microbiology Reviews. 2004; 17(4)840-62.

Kageyama, A., Yazawa, K., Nishimura, K. and Mikami, Y. *Nocardia inohanensis* sp. *Nocardia yamanashiensis* sp. and *Nocardia niigatensis* sp. isolated from clinical specimens. Int. J Syst. Evol. Microbiol. 2004; 54: 563-69.

- Kairiyama Claudia, Marcela Benhaim, Patricia Buresti, Sergio Citatti Claudia Pengue, Nancy Perroni. Detección de VIH proviral por nested-PCR utilizando metodología casera (*in house*). Revista Bioquímica y Patología Clínica. 2007; 71(1):49-53
- Keddie, R. M., Collins, M. D. & Jones, D. Genus *Arthrobacter* Conn and Dimmick 1947. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986; 2:1288–1301
- Kimura, M. 1980. A simple method to estimating evolutionary of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980; 16(2):111-120.
- Klatte, S., Rainey, F. A. and Kroppenstedt, R. M. 1994. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* and *Nocardia amarae*. Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. Nov. and *Gordona amarae* comb.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982; 44: 769-73.
- Kleppe, K., Ohtsuka E, Kleppe, R., Molineux, I., Khorana H.G. "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases." *J Molec Biol.* 1971; 56:341–61.

- Korbie, D.J., Mattick, J.S., Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc.* 2008; 3(9):1452-6.
- Koch, C., Schumann, P., and E. Stackebrandt. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb.nov.and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45: 837-39.
- Koch, C., Schumann P. and E. Stackebrandt. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45: 837-39.
- Kwang Kyu Kim, Keun Chul Lee, Hee-Mock Oh, Mi Jeong Kim, Mi Kyung Eom and Jung-Sook Lee. *Arthrobacter defluvii* sp. 4-chlorophenol degrading bacteria isolated from sewage *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2008; 58: 1916–21.
- Lane David J., Bernadette Pace, Gary J. Olsen, David A. Stahl. Mitchell, Sogin. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004; 17(4):840–862.

Le Guyader F., M. K. Estes, M. E. Hardy, F. H. Neill, J. Green, D. W. G. Brown, R. L. Atmar. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Archives of Virology*. 1996; 141(11):2225-35.

Lesk A. M. *Introduction to Bioinformatics*. Oxford University Press. Oxford 2002: p. 27.

Lesk, A. M. *Introduction to Bioinformatics*. Oxford University Press. Oxford 2002: p.161.

Libro Blanco. Edita: Centro de Publicaciones. Secretaría general Técnica. Ministerio de Medio Ambiente. I.S.B.N.: 84-8320-128-3 NIPO: 310-00-009-3. Depósito Legal: M-36787-2000.

Lynda B.M., Ellis and Lawrence P. Wackett. Use of the University of Minnesota Biocatalysis/ Biodegradation Database for study of microbial degradation. *Ellis and Wackett Microbial Informatics and Experimentation*. 2012.

Madigan Michael T., Matinko John M., Parker Jack. *Biología de los microorganismos* 10ª edición. La diversidad procariota: *archaea*. 2004; 13: 441-467.

Marin Galvin Rafael. Físicoquímica y Microbiología de los Medios Acuáticos. 2003. pp. 76-78.

Mauricio J. M., Herrera Cuadra. Filogenia bacteriana mediante análisis del 16S rRNA. (monografía en Internet) Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://docplayer.es/1189536-Filogenia-bacteriana-mediante-el-analisis-del-rrna-16s.html>.

Margulis, L. *Symbiotic Planet: A New Look at Evolution*, capítulo 3. ed. Basic Books; 1998.

McNeil, M. M. and Brown, J. M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994; 7: 357-417.

Montano-Perez K., Villalpando - Canchola E., Vargas – Albores F., 2006, RFLP (amplified fragment length polymorphism) and its application in aquaculture. *Interciencia.* 2006; 31(8): 563-569

Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., and Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164, 165–172.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997.

Nishiuchi, Y., Baba, T., Yano, I. (2000) Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J. Microbiol Methods*. 2000; 40:1–9.

Notredame Cédric, Desmond G Higgins, and Jaap Heringa. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*. 2000; 302:205–217.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe mundial sobre la tuberculosis. WHO/HTM/TB/2013.15. Sinopsis: pag. 2.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Riesgos del ambiente humano para la salud. 1976. pp. 184-185

Ortiz-Herrera M., Lorenzo Pérez-Fernández, Rafael Coria-Jiménez, Armando Gerónimo-Gallegos, Francisco Cuevas-Schach. Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Salud Pública Méx.* 2004; 46(2):149-57

Osoagbaka, O. U. Evidence for the pathogenic role of *Rhodococcus* species in pulmonary diseases. *J Appl Bacteriol.* 1986; 66: 497–06.

- Patel, J.B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* 2001; 6(4):313-21.
- Pace Norman, Gary J. Olsen and Carl R. Woese. Ribosomal RNA Phylogeny and the Primary lines of Evolutionary Descent *Minirwiew.Cel.*1986; 45: 325-25.
- Parekh, N. R., Walker, S. J., Roberts, S. J. and Welch, S. J. Rapid degradation of triazinone herbicide metamitron by a *Rhodococcus* sp. isolated from treated soil. *J. Applied Bacteriol.* 1994; 77: 67-75.
- Paun, O, Schönswetter, P. *Methods Mol Biol.* Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. 2012; 862: 75-87.
- Paul, N. Shum J., Le T. Hot Start PCR. *Methods Mol Biol.* 2010; 630: 301-18.
- Provost, F., Polonelli, L., Conti, S., Fiscaro, P., Gerloni, M. and Boiron, P. Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardiaasteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 8-10.
- Rainey Fred, A., Naomi, L. Ward-Rainey, Peter H. Janssen, Hans Hippe' and Erko Stackebrandt. *Clostridium paradoxum* DSM 730aT contains

- multiple 16s rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology*. 1996; 142: 2087-95.
- Ramírez Quirós, Francisco (2005). *Tratamiento de Desinfección del Agua Potable*. ISBN 84-933694-3-8.
- Raoult Didier, Gerard Aboudharam, Eric Crubezy, Georges Larrouy, Bertrand Ludes, and Michel Drancourt. Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000; 97, (23) 12800–12803.
- Rappé, M., Giovannoni S. «The uncultured microbial majority». *Annu Rev Microbiol*. 2003, 57:369 -94.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *Boletín Oficial del Estado* nº 45, de 21 de febrero de 2003, pp. 7228 a 7245.
- Rice, E.W., Bridgewater, L. *Standard methods for the examination of water and wastewater*; American Public Health Association, American Water Works Association. 2012
- Roth, A., Andrees, S., Kroppenstedt, R. M., Harmsen, D. and Mauch, H. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene

- sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 851-56.
- Roy, M., Sidhom, S., Kerr, K. G. & Conroy, J. L. Case report: *Rhodococcus erythropolis* osteomyelitis in the toe. *Clin Orthop Relat.* 2009; 467: 3029–3031.
- Saitou, N., y M. Nei. El vecino método de unión: un nuevo método para la construcción de árboles filogenéticos *Mol.Biol.* 1987; 4: 406-25.
- Seviour R.J. & Blackall L.L. (1999); Current taxonomic status of filamentous bacteria found in activated sludge. In *The Microbiology of Activated Sludge*. Kluwer Academic Press. Netherlands. ISBN: 978-94-010-5754-7 (Print) 978-94-011-3951-9 (Online)
- Strong Lisa, C., Charlotte Rosendahl, Gilbert Johnson, Michael J. Sadowsky, and Lawrence P. Wackett *Arthrobacter aurescens* TC1 Metabolizes Diverse s-Triazine Ring Compounds. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68 (12): 5973–80.
- Strong Lisa, C., Charlotte Rosendahl, Gilbert Johnson, Michael J. Sadowsky, Schleifer, K. H., and O. Kandler. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 1972; 36:407-77.

Sokolovska, I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S. N., Wattiau P. Carbon source induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:7019–7027.

Soon Deok Park, Young Uh, In Ho Jang, Kap Jun Yoon, Hwang Min Kim and Yon Jung Bae. *Rhodococcus erythropolis* septicaemia in a patient with acute lymphocytic leukaemia. *Journal of Medical Microbiology*. 2011; 60: 252–55.

Sorrequieta Augusto. Aguas residuales: Reuso y tratamiento. Lagunas de estabilización. 2004. p-7.

Stackebrandt, E. *Methods in Microbiology*. Edited by R.R. Colwell and R. Grigorova. 1987; 19: 405-459.

Stackebrandt, E., Rainey F. A., and N. L. Ward-Rainey. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis. *J. Syst. Bacteriol*. 1997; 47: 479–91.

Stackebrandt, E. y Liesack, *Handbook of Bacterial Systematic*. Ac. Press. Ed. 1993; pp. 152-194.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd edition. American Water Works Association/American public works

association/water environment federation, 01/01/2012 written by editors: Eugene W. Rice, Rodger B. Baird, Andrew D. Eaton, Lenore S. Clesceri. SBN(s): 9780875530139

Stahl, D.A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomer Appl Environ Microbiol. Appl. Environ Microbiol.1988; 54 (5): 1079-1084.

Steingrube, V. A., Brown, B. A., Gibson, J. L., Wilson, R. W., Brown, J., Blacklock, Z., Jost, K., Locke, S., Ulrich, R. F. and Wallace, R. J., Jr. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. J Clin Microbiol. 1995; 33: 3096-01.

Stratton, H. M., Seviour, R. J., Soddell, J. A., Blackall, L. L. and Muir, D. 1996. The opportunistic pathogen *Nocardia farcinica* is a foamproducing bacterium in activated sludge plants. Lett. Appl. Microbiol. 1996; 22: 342-46.

Stratton H.M., Brooks P.R., Carr E.L., Seviour R. J. Effects of culture conditions on the mycolicacid composition of isolates of *Rhodococcus spp.* from activated sludgefoams. Syst. Appl. Microbiol. 2003; 26:165–171

Sturtevant, Joy. Applications of Differential-Display Reverse Transcription-PCR to Molecular Pathogenesis and Medical Mycology. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology 2000; 13(3): 408–27.

Sutcliffe, I.C. Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998; 74: 49–58.

Teramoto, K., Kitagawa, W., Sato, H., Torimura, M., Tamura, T. & Tao, H. Phylogenetic analysis of *Rhodococcus erythropolis* based on the variation of ribosomal proteins as observed by matrixassisted laser desorption ionization-mass spectrometry without using genome information. *J Biosci Bioeng*. 2009; 108: 348–353.

Thompson Julie D., Desmond G. Higgins and Toby J. Gibson. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *European Molecular Biology Laboratory*. Heidelberg, Germany. *Nucleic Acids Res*. 1994; 11(22):4673-80.

UN-WATER/WWAP/2006/3. 2º Informe de Naciones Unidas sobre Desarrollo Recursos Hídricos en el Mundo, p.137.

UN-WATER/WWAP/2006/3. 2º Informe de Naciones Unidas sobre Desarrollo Recursos Hídricos en el Mundo, p.161.

UNE-EN ISO 6222:1999 Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo. AENOR 1999.

UNE-EN ISO 8199:2008 Calidad del agua. Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo. AENOR 2005.

Uotila, J. S., Kitunen, V. H., Apajalahti, J. H. A. and Salkinoja-Salonen, M. S. Environment-dependent mechanisms of dehalogenation by *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1. Appl. Microbiol. Biotechnol.1992; 38: 408-412.

Van Zeijl, C.M.J., van de Kamp E.H.M., P.J. Punt, G.C.M. Selten, B. Hauer. R.F.M. van Gorcom. C.A.M.J.J. van den Hondel. An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. Journal of Biotechnology. 1998; 59 (3): 221–24.

Vernazza, P. L., Bodmer, T. & Galeazzi, R. L. *Rhodococcus erythropolis* infection in HIV-associated immunodeficiency. Schweiz Med Wochenschr. 1991; 121:1095–98.

Von Below, H., Wilk, C. M., Schaal, K. P. & Naumann, G. O. *Rhodococcus luteus* and *Rhodococcus erythropolis* chronic endophthalmitis after lens implantation. *Am J. Ophthalmol.* 1991; 112: 596–97.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; 11; 23(21): 4407-14.

Wallace, R. J., Jr., Steele, L. C., Sumter, G. and Smith, J. M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32:1776-79.

Wallace, R. J., Tsukamura, M., Brown, B. A., Brown, J., Steingrube, V. A., Zhang, Y. and Nash, D. R. Cefotaxime-resistant *Nocardiaasteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardiafaracinica*. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28:2726-32.

Water quality. Enumeration of culturable micro-organisms. Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. (ISO 6222:1999) AENOR 1999.

Watson J. D., F. H. Crick. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953; 171(4356):737–8.

- Wauters. G., J. Charlier, M. Janssens, and M. Delmee. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* and *Arthrobacter albus* sp. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2412-15.
- Wayne L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. M. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1987; 37(4):463-464.
- Weinstock, D. M. & Brown, A. E. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 1379–85.
- Whitman W., Coleman D., Wiebe W. «Prokaryotes: the unseen majority». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95 (12): 6578 - 83.
- Whittaker, Robert H. «New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms». *Science.* 1969; 163: 150-194.
- Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, vol. 4.

Williams, S. T., Goodfellow, M. & Alderson, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339 AL. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Willkins. 1989; 4: 2453-2492.

Whittaker R. H. Science 10 January 1969:163(3863):150-160.

Whitman, William, Goodfellow, Michael. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Springer-Verlag)) 2nd ed. 2012.

Woese, Carl R., George E. Fox. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977; 74 (11): 5088–5090.

Woese Carl R., Otto Kandler, and Mark L. Wheelis. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya (Euryarchaeota/Crenarchaeota/kingdom/evolution) 1990; 87: 4576-4579.

Woese C, Kandler O., Wheelis M. «Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya». Proc Natl Acad Sci U S A. 1990.

Woese Carl R. Bacterial Evolution. Microbiological Reviews. 1987; 51(2):221-271.

Woo P.C., Lau S.K., Teng J.L., Tse H., and Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect. 2008; 14(10):90.

Yannick D.N., Tremblay Skander Hathroubi, et Mario Jacques. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. Can J. Vet Res. 2014; 78(2): 110–116.

Yao-Guang Liu and Yuanling Chen. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. South China Agricultural University, Guangzhou, China BioTechniques. 2007; 43: 649-56.

Ying Huang, Naixin Zhao, Liang He, Liming Wang, Zhiheng Liu, Min You, and Fulai Guan. *Arthrobacter scleromae* sp. Isolated from Human Clinical Specimens. J. Clin Microbiol. 2005; 43(3):1451–55.

Zhi XY, Li W.J., Stackebrandt E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequencebased definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two newsuborders and four new

families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int JSyst Evol. Microbiol.* 2009; 59:589–608.

Zuber B., Chami M., Houssin C., Dubochet J., Griffiths G., Daffe M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.* 2008; 190: 5672–5680.

CAPÍTULO VII. ANEXOS

SECUENCIAS DE BASES UTILIZADAS 16 S rRNA

>S1 Secuencia.Problema

GGGGTTAAGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCATGACGTGNCNGGNNNGTGTACAAG
 GCCCGGGAACGTATTCACCGCANCCTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCACGG
 GGTGAGTTGCAGACCCCGATCCGAAGTGAAGCCAGCTTTAAGGGATTTCGCTCCACCTCACGG
 TCTCGAGCCCTCTGTACTGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGAT
 GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGAGTCTCTTACGAGTCCCCACCA
 TAACGTGCTGGNNNNNTAAGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAG
 ACACGANNGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGCCACATCTCTGC
 ANCTTTCGGGTATATGTCAAACCCANGTAAGGTTCTTNCNGTTGNATCGAATTAATCCACATG
 CTCGGCCGNCNNGNNGNCCCNATTCGCGNGTCGAGCGGTNAGGCCTTTCGGGGTACA
 CGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGA
 AACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCANNNTNGCATGNNNNNGGTTGGAAAGATTTATCGGT
 GCAGGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGG
 GTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
 AGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA
 TGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAG
 AAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCG
 GAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCGTTTGTGAAAACCAGCAGCTC
 AACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGG
 TGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAG
 TAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATT
 AAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
 ACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCNGGGTTTGCAT
 ATACCGGAAAGCTGCAGANATGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGT
 CGNCAGCN CNNGNCGTG

>Rhodococcus.erythropolis gi|444304198|ref|NR_074622.1|
 Rhodococcus erythropolis PR4 strain PR4 (= NBRC 100887) 16S
 ribosomal RNA, complete sequence.

TCAACGGAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTC
 GAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGC
 CCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCAGGTTGCATG
 ACTTGGGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGG
 TAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCC
 TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAC
 GAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
 ATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCG
 CGTCTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTA

CTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
 GTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACG
 GAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAA
 CTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGC
 GAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCTTGTGGT
 CGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCC
 GGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTT
 CACACATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAA
 AGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAAT
 CGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCA
 TAAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCTTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTG
 GGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACC
 TCCTTTCT

>Rhodococcus qingshengii gi|343203016|ref|NR_043535.1|

Rhodococcus qingshengii strain djl-6 16S ribosomal RNA, partial
 sequence.

ATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGC
 GGTAAAGCCTTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACCGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTG
 CACTTCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCCTATCGCATGGTGG
 GTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAT
 GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGAT
 GCAGCGACCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAG
 CGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGTAATAC
 GTAGGTGCAAAGCCTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTC
 GTTTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGC
 AGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGAT
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCTTCCACGGAAT
 CCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAG
 AACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGT
 ATACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGG
 TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACA
 CATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCT
 GGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCA
 GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTGATGAA
 AGTCCGTAACACCCGAAGCCGGTGGCTTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGAT
 CGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAAATCG

>Rhodococcus.erythropolis.N11 gi|310975160|ref|NR_037024.1|
Rhodococcus erythropolis strain N11 16S ribosomal RNA, partial
sequence.

```
CCTGGCTGAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTC
GGGGTACACGAGCGGCCAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAA
GCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCNGGTTGCATGACTTGGGGTGGAAAGAT
TTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC
GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGT
ACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGC
GTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTGCTTTGTGAAAACC
AGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGA
ATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCT
CTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCT
AACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGG
TTTGACATATACCGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGC
ATGGCTGTTCGTAGCTCGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGGACTTACACATGCTACAATGG
AGGTGGGGACAGCTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGG
CCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGG
ATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCT
GCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACC
CGAAGCCGGTGGCTTAAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGAC
GAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGG
```

>Rhodococcus.baikonurensis gi|219857156|ref|NR_024784.1|
Rhodococcus baikonurensis strain A1-22 16S ribosomal RNA,
partial sequence.

```
GAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGTACACGAGC
GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTG
GGTCTAATACCGGATATGACCTCCTATCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGG
ATGGGCCCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG
GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAA
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTTGGTGGAAACAGCAGCTCAACTGC
TGGCTTGCAGGCAATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGC
```

GGTCAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACCTG
ACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGC
CCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTTGACATATACCG
GAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTGAG
CTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAG
CACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACG
TCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGC
TGGGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAA
CTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTT
CCCGGCCCTTGTACACACCGCCCC

>**Rhodococcus.globerulus** gi|219846592|ref|NR_026184.1|
Rhodococcus globerulus strain DSM 4954 16S ribosomal RNA,
partial sequence.

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTTCGGGG
TACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTCGGGATAAGCCT
GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCCTATCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGATTTAT
CGGTGCAGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACG
ACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
GGGACGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCT
GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTG
TCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTTGTACGTCTTTTTGTGAAAACCTCACA
GCTCAACTGTGAGCCTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGG
GCAGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAAC
GCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTT
GACATATACCGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATG
GCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATCT
TATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGG
TGGGGACGACGTC AAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCA
GTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATC
GGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGA
AGCCGGTGGCTTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAA
GTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGG

>**Rhodococcus.marinonascens** gi|219846591|ref|NR_026183.1|
Rhodococcus marinonascens strain DSM 43752 16S ribosomal RNA,
partial sequence.

CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTC
 GGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAA
 GCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCTTCGNCTGCATGACTGGGGGTGGAAAGGT
 TTA CTGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
 GACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCCGC
 GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGAGTGACGGT
 ACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGC
 GTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCGTTTGTGAAAAC
 CACAGCTCAACTGTGAGCTTGCAGGCATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGA
 ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCT
 CTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
 AGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCT
 AACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGG
 GGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGG
 TTGACATATAACGGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCTTGTGGTTCGGTATAACAGGTGGTGC
 ATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTG
 TCTTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGA
 AGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGG
 CCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGG
 ATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCT
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACC
 CGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGAC
 GAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACC

>Rhodococcus.jostii gi|444304186|ref|NR_074610.1| Rhodococcus
 jostii RHA1 strain RHA1 16S ribosomal RNA, complete sequence.

CTTCAACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCTTAACACATGCAAG
 TCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCT
 GCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTCGGCTGCA
 TGGCTGAGGGTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGG
 GGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGA
 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG
 CCTGATGCAGCGACCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGG
 ACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGTAGGGTGCAAGCCTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGT
 CGCGTCTGTTTGTGAAAACCTCACAGCTCAACTGTGAGCCTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAG
 TACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACAC
 CGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTCTTTCCA
 CGGGATCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC
 GCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGCATATAACGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTG
 GTCGGTATAACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC

GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTG
 CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGC
 TTCACACATGCTACAATGGCCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTT
 AAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTA
 ATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGT
 CATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTGGAAGG
 TGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCA
 CCTCCTT

>Rhodococcus. triatomae gi|343201626|ref|NR_042352.1|

Rhodococcus triatomae strain : IMMIB RIV-085 16S ribosomal RNA,
 partial sequence.

GGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGTACACGAGCGGCGAAC
 GGGTGTAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAA
 TACCGGATATGACTACCGGCTGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGC
 CCGCGGCCATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCT
 GAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGAATATGCAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC
 GGGTTGTAAACCTCTTTCAACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG
 GCCAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGCTTGTCCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGTGAAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCT
 TGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA
 AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAAGTACGCT
 GAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGT
 GGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCCTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCG
 CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCG
 GAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTTGACATACACCGGAAA
 GCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCG
 TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCACG
 TAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAA
 GTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCG
 ATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCG
 ACCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCG
 GGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAAC
 CCCTTGTGGGAGGGAGCCGTGGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAG
 CCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTTCCCTTCTA

>Rhodococcus. opacus gi|444304207|ref|NR_074632.1| Rhodococcus

opacus B4 strain B4 16S ribosomal RNA, complete sequence
 TCAACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTC
 GAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGC
 CCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTCGGCTGCATG
 GCCGTTGGTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGG

TAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTACCAGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCC
TGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAC
GAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCG
CGTCGTCTGTGAAAACCTCGAGGCTCAACCTCGAGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTA
CTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
GTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCCTCCAC
GGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACG
CGAAGAACCCTTACCTGGGTTTGACATATAACCGAAAGCTGCAGAGATGTGGCCCCCCTTGTGG
TCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGC
CGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCT
TCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTA
AAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAA
TCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTC
ATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTCGTGGGAGGGAGCCGTGGAAGGT
GGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC
CTCCTTTCT

>**Rhodococcus .equi** gi|343201166|ref|NR_041910.1| Rhodococcus
equi strain DSM 20307 16S ribosomal RNA, complete sequence.

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACG
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAA
CTGGGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTGCGATGGCGGGGGTTGGAAAGGTTTACTGGTGC
AGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGT
AGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAA
GAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGGTTGTCCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTGTGTCGTTGAAAACCTTGGGGCTCAA
CCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTA
AGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTTGCATA
TACCGGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTT
GCCAGCGGTAATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
CGACGTCAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAG
AGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTC

TGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAAT
 ACGTTCCC GGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGG
 TGGCCTAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAAC
 AAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT

>**Rhodococcus .rhodochrous** gi|310975159|ref|NR_037023.1|

Rhodococcus rhodochrous strain 372 16S ribosomal RNA, partial
 sequence.

CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCAGC
 TTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTCTGGG
 ATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCTTGCTGCATGGTGAGGGGTGGAA
 AGTTTTTTCGGTGCAGGATGAGCCC GCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA
 GCGGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGC
 CGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGAAAGTGAC
 GGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCG
 AGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCGTCTGTGAAA
 TCCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCGAGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACT
 GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGG
 TCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCT
 GG TAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGT
 AGCCAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
 TGGGTTTGACATGTACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCTTGTGGCCGGTAGACAGGTG
 GTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGACGCGCAACC
 CTTGTCTGTGTTGCCAGCAGTGTGGTGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCCGG
 AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACA
 ATGGTCCGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGT
 TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAA
 CGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAA
 CACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTG
 GGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCG

>**Nocardia .araoensis** gi|265678350|ref|NR_028652.1| Nocardia

araoensis strain IFM 0575 16S ribosomal RNA, partial sequence.

ACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGGCGGTAAGGCCCTTCGGGGGTACAC
 GAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTCGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAA
 ACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCTTGTGCGATGGCTTGGGGTGGAAAGATTTATCGGTTG
 CGAGATGGGCCCGCGGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGG
 TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
 GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
 GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGTAGA
 AGAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGG
 AATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGTGAAAACCTCACAGCTCA
 ACTGTGAGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGT

GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGT
AACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATT
AAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTTGACAT
ACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGT
TGCCAGCGGTTATGGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG
ACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACA
GAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGT
CTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCG
GTGGCCTAACCCCTCGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGT
ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTTCCTTTGTAAA

>Nocardia.higoensis gi|265678349|ref|NR_028651.1| Nocardia
higoensis strain IFM 10084 16S ribosomal RNA, partial sequence

ATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCT
TCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTACCCTGTACTTTCGGGAT
AAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTCCGATGCATGTCCGTGGGTGGAAAG
ATTTATCGGTACAGGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAG
CTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCC
GCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACG
GTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAG
GCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTTCGCGTTCGTCCGTGAAAA
CTTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTG
GAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGT
CTCTGGGCAGTAAC TGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTA
GCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT
GGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGG
TGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGTCTGTGTTGCCAGCAAGTAAAGTTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGA
GGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAA
TGCCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTT
CGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAAC
ACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGG
GACGAAGTCGTACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC

>**Nocardia puris** gi|265678689|ref|NR_028994.1| *Nocardia puris* strain IMMIB R-145 16S ribosomal RNA, partial sequence.

AACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACA
 CGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGA
 CCTCTGGTTGCATGACCGGGGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCA
 GCTTGTGGTGGGGTAATGGCCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCG
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
 AATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCT
 CTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACCTACGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTTG
 TAGGCGGCTTGTCCGTCGATCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGTCGATACG
 GGCAGGCTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT
 CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAGC
 GTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGGCGCTAGGTGT
 GGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACC
 GCCGCAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTA
 ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTA
 GGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCAAGTGATGTTGGGGACT
 CGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTT
 TATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGG
 AGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTG
 GAGTCGTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCAGGGCCTTGTACACAC
 CGCCCGTACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGG
 AGCCGTGCAAGGTGGGATCGGGGATTTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGT
 GCGGCTGGATCACCTTCCTTTCTAA

>**Nocardia asiatica** gi|265678342|ref|NR_028644.1| *Nocardia asiatica* strain IFM 0245 16S ribosomal RNA, partial sequence

TCAGCGGTAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGC
 CTCGCACCTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTGCTGTTCGCATG
 GCGGTGGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGG
 TAATGGCCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGC
 CTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCGACAGGGA
 CGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AATACGTAGGGTGCAGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTCTC
 GCGTCGTCCGTGAAAACCTGGGGCTCAACCCCAAGCTTGCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGT
 ACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC
 GGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCA
 CGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAAC
 GCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTG
 GTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC

GCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTG
 CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGC
 TTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTT
 AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTA
 ATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGT
 CATGAAAGTCGGTAACCCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTGCAAGG
 TGGGATCGGCGATTGGG

>**Nocardia.africana** gi|343201157|ref|NR_041872.1| Nocardia
 africana strain DSM 44491 16S ribosomal RNA, complete sequence.

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACG
 AGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTCGTACTCTGGGATAAGCCTGGGAAA
 CTGGGTCTAATACCGGATATGACCACGAATCGCATGATTTGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGC
 GAGATGGGCCCCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGT
 AGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
 ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAA
 GAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGA
 ATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTCGTGCGTTCGATCGTGAAAACCTTGCAGCTCAA
 CTGCGAGCTTGGCGTGCATACGGGCGGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
 TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTA
 ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
 GTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTA
 AGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
 CAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATA
 CACCAGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCT
 GTCAGCTCGTGTCTGGAGATTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTT
 GCCAGCGCTTATGCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
 CGACGTC AAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAG
 AGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTC
 TGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAAT
 ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGG
 TGGCCTAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAAC
 AAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT

>**Nocardia.brasiliensis** gi|343201145|ref|NR_041860.1| Nocardia
 brasiliensis strain DSM 43758 16S ribosomal RNA, complete
 sequence.

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACG
 AGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTCGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAA
 CTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGGTGGAAAGATTTATCGGTGC

GAGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGACGGGT
 AGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
 GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
 ACGGCCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAA
 GAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTGTGTCCGGA
 ATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCGTCGTCCGTGAAAACCTTGGGGCTCAA
 CCCCAGCTTGGGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
 TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGAAGTA
 ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
 GTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTA
 AGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
 CAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATA
 CACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTT
 GCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGA
 CGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAG
 AGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATCGGGGTC
 TGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAAT
 ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTGATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGG
 TGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATTGGCGATTGGGACGAAGTCGTA
 ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT

>**Nocardia asteroides** gi|44816|emb|X53205.1| *Nocardia asteroides*
 partial 16S Rrna

CACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACNCGTGGGTGATCTGCCTNGCACTCTGGGATAAGCCTGG
 GAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTCGCTCGCATNGTGTGGTNGAAAGATTTATCG
 GTGCGAGGGTGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGCCGAC
 GGTAGCCGCGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
 GGAGNCAGCAGCTGGAGAAATATTGCACAATGGGCGAAAGCANNATGCAGCGCACCGCCGTGAGG
 GATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGT
 AGAAGAAGCGCCGGCNAACTACGTGCCAGCNCNCCGCGGTAATACGTAGNGTGCAGCGTGTGTC
 CGGAATTGCTGGGCGTAAAGAGCTGGTGGGCGGCTNGTGCCTGCGATCGTGAAAACCTTGGGGC
 TCAACCCCAAGCTTGGCGTGATACGGGCAGGCTTGGTACTTTCGGGGGNGGCTGGAATTCCTN
 GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTTTTCGAAGGCGGGTCTCTGGGAA
 GTAACCTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTNGTNGTCCAC
 GCCGTAAACGGTGGGTRCTAGGTGTGGGTTTCTGCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCA
 TTAAGTACCCTGCNTNGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCN
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGAC
 ATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGNNGTGGTGTACAGGTNGTGCATGGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCTTAT
 GTTGCCAGCGGTAATGGCGGGNCTCGTGAGAGACTGCCGGGGTNAACTCGGAGGAAGTTGG
 GGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTA
 CAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTNGAGCGAATCCCTNAAAGCCGGNNTTAGTTCCGGATCGGG
 GTCTGCAACTNGACCCNGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTN
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCNCGTTACGNCATGAAAGTCGGTAACACCCGAACC
 GGTGGCTNACCCCTCGTGGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATCGGCGA

>**Gordonia soli** gi|343202840|ref|NR_043331.1| *Gordonia soli*
strain CC-AB07 16S ribosomal RNA, partial sequence.

```
GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGCCAGCTTGC
TGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCCTGACTTTGGGATAA
GCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCATGGCCTGCATGGGTTGTGGTGGAAAGCT
TTTGC GGTTGGGGATGGGCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC
GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTACCAGGGACGAAGCGCGAGTGACGGT
ACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGC
GTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAATTC
TGCAGCTTAACTGCAGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGA
ATTCCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCT
CTGGGTAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTCCTTTTACGGGATCCGTGCCGTAGC
TAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG
GTTTGACATACACCAGAAAGCTATAGAGATATAGCCCCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTG
CATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTGTATTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATG
GCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
GATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGC
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACAC
CCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGT
```

>**Gordonia terrae** gi|526445249|gb|KF177346.1| *Gordonia terrae*
strain D1 nitrilase gene, complete cds.

```
ATGGTCGAATACACAAACACATTCAAAGTTGCTGCGGTGCAGGCACAGCCTGTGTGGTTTCGAC
GCGGCCAAAACGGTCGACAAGACCGTGTCCATCATCGCGGAAGCAGCCCGGAACGGGTGCGAG
CTCGTTGCGTTTTCCCGAGGTATTCATCCCGGGTACCCGTACCACATCTGGGTGACAGCCCCG
CTCGCCGGAATGGCGAAGTTCGCCGTGCGCTACCACGAGAATTCCTGACGATGGATAGCCCCG
CACGTACAGCGGTTGCTCGATGCCGCCCGCACCACAGCATCGCCGTAGTGGTGGGAATCAGC
GAGCGGGATGGCGGCAGCTTGTACATGACCCAGCTCATCATCGACGCCGATGGGCAGCTGGTC
GCCGACGCCGCAAGCTCAAGCCCACCCACGTCGAGCGTTCGGTATACGGAGAAGGAAACGGC
TCGGATATCTCCGTGTACGACATGCCTTTCGCGCGGCTCGGCGCGCTCAACTGCTGGGAGCAT
TTCCAGACGCTCACCAAGTACGCAATGTACTCGATGCACGAGCAGGTGCACGTCGCGAGCTGG
CCTGGCATGTGCTGTACCAGCCGGAGGTCCCCGCTTCGGTGTGATGCCAGCTCACGGCC
ACGCGTATGTATGACTCGAGGGACAAACCTTCGTGGTTTTGCACCACCCAGGTGGTTCACGCCG
GAGGCCACGAGTTCCTTTCGCGAGAACGAGGAACAGCGAAAGCTGATCGGCCGAGGCGGAGGT
TTCGCGCGGATCATCGGGCCCGACGGCCCGCATCTCGCAACTCCTCTCGCCGAAGATGAGGAG
GGGATCCTCTACGCCGACATCGATCTGTCTGCGATCACCTTGGCGAAGCAGGCCGCCGACCCC
```

GTAGGCCACTACTCACGGCCGGATGTGCTGTCGCTGAACTTCAACCAGCGCCGCACCACGCCC
 GTCAACACCCCACTTTCCACCATCCATGCCACGCACACGTTTCGTGCCGCAGTTTCGGGGCACTC
 GACGGCGTCCGTGAGCTCAACGGAGCGGACGAACAGCGCGCATTGCCCTCCACACATTCCGAC
 GAGACGGACCGGGCGACAGCCACCATCTGA

>**Dietzia maris** gi|310975161|ref|NR_037025.1| Dietzia maris
 strain AUCM A-593 16S ribosomal RNA, partial sequence.

GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGCCCCCTTCGGG
 GGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACCTTCGGGATAAGC
 CTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAACTCCTGCCGCATGGTGGGGGTTGGAAAGTTTT
 TCGGTGCAGGATGAGCCCAGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
 GGGGATGACGGTCTTCGGATTGTAAACCCCTTTTCAGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACC
 TGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTT
 GTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTACAGTCGTCTGTGAAATCCCTC
 GGCCTAACCGGGGGCGTGACGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATT
 CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTG
 GGTAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGT
 CCATGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCACGGACTCCGTGCCGTAGCTAAC
 GCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
 CCCGCACAAGCGGGCGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTAGGCTT
 GACATATACAGGACGACGGCAGAGATGTCGTTTTCCCTTGTGGCTTGTATACAGGTGGTGCATG
 GTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCT
 CATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGG
 TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCTA
 GTACAGAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTTCGGATT
 GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCG
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGA
 AGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGT
 CGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGG

>**Dietzia cinnamea** gi|343201664|ref|NR_042390.1| Dietzia
 cinnamea strain :IMMIB RIV-399 16S ribosomal RNA, partial
 sequence.

GGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGTGGCGAAC
 GGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACCTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAA
 TACCGGATATTCAGCTTCTGCCGCATGGTGGTGGTTGGAAAGTTTTTTCGGTGCAGGATGAGCC
 CGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTG
 AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
 GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGTCTTCG
 GATTGTAAACCCCTTTCAGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGG

CCA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGC
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCGTCCGTGAAAACCTCGGAGCTTAACTCCGAGCTT
GCGGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTA ACTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTG
GGCGTAGGTGTGGGGTCCCTCCACGGATTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGGCA
GCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATATACAGGACGGC
GGCAGAGATGTCGTTTTCCCTTGTGGCTTGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTGTCTCATGTTGCCAGCACGTT
ATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCTAGTACAGAGGGCTGCGAT
ACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGAC
CCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCC
CCTTGTGGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAG
CCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

>**Streptomyces.gardneri** gi|343200517|ref|NR_041204.1|
Streptomyces gardneri strain NBRC 3385 16S ribosomal RNA,
partial sequence.

ACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGA
GCGGGCAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTCGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAAC
TGGGTCTAATACCGGATATGACTTCTGGTTCGATGGCTGGGGGTGGAAAGATTTATCGGTGCG
AGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTA
GCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAAATTTGCACAATGGGGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGA
CGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCGACAGGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTACCTAGTAAG
AAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGGCGTTGTCCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGACTTGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCGTCTGTGAAAACCTCACAGCTCAAC
TGTGAGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGT
AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAA
CTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTTCCCTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTA
GCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCAC
AAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTTGACATAC
ACCGGAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCG
TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTG
CCAGCGATTATGCCGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGAC
GACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAGA
GGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCT
GCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATA
CGTTCGCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGT
GGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTA
CAAGGTAGCCGTACCGGAAGG

>Arthrobacter. aurescens. TC1 gi|444303850|ref|NR_074272.1|
 Arthrobacter aurescens TC1 strain TC1; ATCC BAA-1386 16S
 ribosomal RNA, complete sequence.

TCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATCCCTGGCTTGCTG
 GGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGC
 CTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCATCTGGCGCATGTCATGGTGGTGAAAGCTT
 TTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCG
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
 TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTA
 CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCG
 TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAGACC
 GGGGCTCAACTCCGGTTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAA
 TTCTTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTC
 TGGGCTGTAACGCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTA
 GTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCT
 AACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGG
 GGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGG
 CTTGACATGAACCGAAAGACCTGGAAACAGGTGCCCGCTTGCGGTTCGGTTTACAGGTGGTG
 CATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTC
 GTTCTATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGG
 AAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATG
 GCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 GATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCCGAGTTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGC
 TGGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACAC
 CCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGGGGAGCCGTGCAAGGTGGGACCGGGCGATTGGGACT
 AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTG

>Arthrobacter. phenanthrenivorans gi|444439455|ref|NR_074770.1|
 Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 strain Sphe3 16S
 ribosomal RNA, complete sequence.

CTTCAACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAG
 TCGAACGATGATGCCAGCTTGCTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAAC
 CTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTCCATCG
 CATGGTGGTTGGTGGAAAGCTTTTTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGG
 TGAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
 GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
 AAGCCTGATGCAGCGACCGCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTA
 GGGAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCCTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTT
 TGTCGCGTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTA

GAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
CACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGCTTGGGCACTAGGTGTGGGGACAT
TCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
CTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATG
CAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGGTAACGCCTGGAGACAGGTGCCCCGC
TTGCGGTTCGGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGA
GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGTCT
TGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAAT
CCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGC
TAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGT
CAAGTCAGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGGAGGGAGCTGTC
GAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTG
GATCACCTCCTTTCTAAGGA

>Arthrobacter.chlorophenolicus gi|444304094|ref|NR_074518.1|
Arthrobacter chlorophenolicus A6 strain A6 16S ribosomal RNA,
complete sequence.

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
GAAGCCAGCTTGCTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTG
ACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTGATCATCGCATGGTGGT
TGGTGGAAAGCTTTTTCGGTTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATG
GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATG
CAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAAGAAGC
CGCAAGGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGCGCAAAGCCTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCT
CTGCCGTGAAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCGAGACTAGAGTGATG
TAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATG
GCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGCTTGGGCACTAGGTGTGGGGACATTTCCACGTT
TTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGA
AGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGGAAACGCCTGGAAACAGGTGCCCCACTTGTGGTC
GGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCG
GGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTTC
ACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAA
GCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATC
GCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCAAGTCAC
GAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGGGGGAGCCGTGGAAGGTGGGA
CTGGCGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT

>Arthrobacter.sp.FB24 gi|444304166|ref|NR_074590.1|
Arthrobacter sp. FB24 strain FB24 16S ribosomal RNA, complete
sequence.

AGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
GATCCAGCTTGCTGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTA
ACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTCCTCATCGCATGGTGGG
GGGTGGAAAGCTTTTTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAAT
GGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAG
CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTGCGGTC
TGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGT
AGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGG
CGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTT
TCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGCGAA
GAACCTTACCAAGGCTTGACATGGGCCGACCGGGCTGGAACAGTCCCTTCCCCTTTGGGGCC
GGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCA
ACGAGCGCAACCCTCGTTCATGTTGCCAGCGGTAATGGCGGGGACTCATGGGAGACTGCCG
GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTC
ACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAA
GCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATC
GCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCAC
GAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGGAAGGTGG
GACTGGCGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
CCTTT

>Arthrobacter.oxidans gi|5531224|emb|AJ243423.1| Arthrobacter
oxidans partial 16S rRNA gene.

CCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATCCAGCT
TGCTGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGAT
AAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTCCTCATCGCATGGTGGGGGGTGGAAAG
CTTTATTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTTACCA
AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACG
CCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC

AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGTTTTGTTCGCGTCTGCCGTGAA
 AGTCCGGGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGAC
 TGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAG
 GTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
 TGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTTCCGCGCCG
 TAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATT
 GACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CAAGGCTTGACATGAACCGGTAATACCTGGAGACAGGGTGCCCGCTTGCGGTTCGGTTTACAG
 GTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCTTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACT
 CGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCT
 ACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTC
 AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
 CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGG
 TAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCAAGGTGGGACTGGCGA
 TTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGTCGTA

>Arthrobacter.sp gi|2143224|emb|Y13326.1| Arthrobacter sp. 16S
 rRNA gene, partial, 825 bp.

CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGT
 ACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAA
 ACGTTGGGCACACTAGGTGTGGGGACATTCCACGTTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGC
 CCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGC
 GGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACCG
 GAAAGACCTGGAAACAGGTGCCCGCTTGCGGTTCGGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTC
 GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCA
 GCGCGTTATGGCGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGAC
 GTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGG
 TTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTGGTCTGCA
 ACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT
 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGC
 CTAACCCCTTGTGGGGGGAGCCGTCAAGGTGGGACCGGCGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGG
 TAACCG

>E.coli gi|1240025|emb|X80721.1| E.coli rrnA gene.

GTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAC
 AGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCC
 TGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGA
 GGGGGACCTTCGGGCCCTTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTA
 ACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA
 GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
 ATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGA

AGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
 GTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
 CACGCAGGCGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGA
 TACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
 AGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGA
 AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTG
 GAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGANNTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTA
 CGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGA
 GAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAA
 TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGA
 ACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC
 CCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGA
 GCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG
 TCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
 ACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGC

>**Vibrio cholerae** gi|444439495|ref|NR_074810.1| *Vibrio cholerae*
 O1 biovar El Tor str. N16961 strain N16961 16S ribosomal RNA,
 complete sequence.

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGC
 AGCACAGAGGAAC TTGTTCCCTGGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATT
 GCCCGGTAGAGGGGGATAACCATTTGAAAACGATGGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGAGCAA
 AGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTACCGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAG
 GTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC
 TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATTTGGCGCAAGC
 CTGATGCAGCCATCCCGCTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGTAGGGA
 GGAAGGTGGTTAAGTTAATACCTTAATCATTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCGGCTAAC
 TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
 GCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTAGGAATCGCATT
 TGAAACTGACAAGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATG
 CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTAC
 TTGGAGGTTGTGCCCTAGAGGTGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGA
 GTACGGTTCGCAAGATTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATCTAGCGGAG
 ACGCTGGAGTGCCTTCGGGAGCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGT
 GAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCACGTAATGG
 TGGGAACCTCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCAGGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATC
 ATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGGGCGAGCATAACG
 CGAGGTGGAGCGAATCTCACAAAGTACGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGCAGGTAGTTTAACTTTCGGG
 AGGACGCTTGCCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCGCTAGGGGA
 ACCTGGCGCTGGATCACCTCCTT

>Cryptococcus neoformans gi|37706307|gb|AY340662.1|
Cryptococcus neoformans var. neoformans cyclin (Cyclin3) mRNA,
complete cds.

```
GACCAGCCCACCCCGCTCCGTCTCCATACCTTTCTCGCTCCCCCGCCTCGTTTCTCCGCCCCG
TCGTTTCCCTCCTCCCTACGACCTTCTCTTTCCCTCCGAACATTTCGCACAACCTCTTTTCTAACA
CACAAAAACTTTGAGCATCCGGCTATGTTACGTACACCCCTCCACCCCGAATTTCGAGCCT
GTCTCTCCCGCTTCGAGGACAGGACTCATCCAGCCTCGATGGCACCCCTGCGGTATTCATGAC
CCCGCTCTTCTCGAATTCATCCGCACTGATGTCTCGCGTGAGCTCGTCTACTACCTCGCCGAA
AGGACCACCTCAGTCATTGGTCAAGCCACCAAGGCTGCCGTTCCGTTCCACCCGCTGGTACT
CCCACCAAGGAAAGCGCCGACGAAGCCCTTGGTCTCCCGTCTCTGGAAACTTTTGTTGCGGTC
GTCTGCGAGCAATCCAATGTGCAGGTATCAACCCTCCTTGCTACACTCGTATACCTTGAACGA
TTGCGACATCGTCTTCCCAAAGTGTCCAAAAGCATGCCTTGCACGCGTCATAGGGTCTTCCCTC
GCGACTCTCATCGTCTCCGCCAAGTACCTCAACGATTCTTCCCGAAGAACAAGCACTGGTGC
AAGTATGCACAGATGTTTCCGTGTTAGCGAGATCAACCTCATGGAAAAACAACCTGCTCTTTCTC
TTGGGTACGACCTTCCGTCGACGAGGGGAAATACTCGACAACCTTCCAACCGTTCTCGAGC
GAGTACTCCTTCTACTACCAAGTGTGCGCTCCTCACCAGAGCTTCCACCGACTCCGATTACC
CCTGCGCGACCGACCCTGGGCGTTCAGCCACAAGCGACACCAACGCACGTCTCGCGGGGG
TCTCGTACCTACATTGCTCCTCCCTTGGATCGATCCGGCTCGTCATCTCTCTCGAGTCTGAA
GATATGCCTCTTACTCCACAGCAACCACCTTCTCCAGTAATGGTCAACGCTGTACGCAGAGGG
CAAGGCAAGGTGCTTGTGGGCAAAGACCAGCCGCTATCTATGAGGTACCTGTGCCAGACACC
CACTACCTCCAACAGTCTATGTCTATCGAGTCGATCACGTCTGCAAACCAATCCAAAGTCGCT
CCTTCTGTGAAGGAAGTTTCCCTCCAGCGATTGCTTCGATCGGACAGACGCCGCAAACAGGTT
GCAATACAAGAGGTAGAAGCACTTGTGCTGTTTCGTCTTAGAACGTTTGTAAACCGGCTCT
TGGCGGCTTGAGTTCAGCGAAATCAGGCGAACGTGTGCGGGGGTCTCGGCTGTGCCGATCATT
GTTTTGGGTTCTTTGGACGACATGCTTGGGTTGTTGTTTTCGTGCTCTTATAGATTCTCCATTT
GTTGTTTCTCATCTCCTGGACATTCATCATTGCCATTATCATCATTTTCATCTACCGTTGTAGT
TGATCTACTATACGTGACATACGTACCTGCACTCTTTATCATAGCTTGACTCTCGTTTTATCT
TTTGCTGGCCCTGGTCCGTGAGTAACTCAGATGTATCATATGAAAACATT
```

>Debaryomyces hansenii gi|294658668|ref|XM_002770779.1|
Debaryomyces hansenii CBS767 mitochondrial 54S ribosomal
protein YmL40, partial mRNA.

```
ATGTCTTGGAATACGGCTAAGAAGAGATTTCAAAGGGAAGTCGAAAATTACCCTAAGGCTCTT
CGTGATGTTTACTTAGCAAAGACTAATAAATACACCTTGCCAACCTTTGAGACCAAGGAATGG
CCTCTCGCAAAGTGGGAAAGAAAACCAAGCTTGAACAGATCGGATTTGCTAATGGTGACCTT
GCCTATATTACTGAAGGAGAAAAGAAGGGAACAGTCTCTACCATTTTCCAATATTCTCCAGAA
ATGAACTCATTTTTATTGGCAGATGTCACTTCCAAAAGCTTCTTCCAAAGCAAAAAGTGGGTT
GAGCACCAGTCGAGTCATCTCATTGACTACCCAGAATATGTCAAGCGTGAACATATAAAAACCTT
```

GCTGCCAAAGACAAAGACGAGAATGGAAAGGTTTACTACGTTGTCGCTGACGACGTTGTTTAC
AAAGAAAAATATTATGACGAAAGATACAGGAGATGGTTACCAAAGAGATTCGTGAAAAATCAT
GATTCTATAGAAATACCATGGCCAAACCCTCCACAAGATCCTAAGGATGATCATTATCTACA
AGTCAGCAAGCGGCTTTTGAAGAAGCTTATGAGTTACAGTCTATTGCTAAACCACCAGTACCA
ACTGACGCATTATTACAATTAAGAAACCCATACTCTAAACATAAGAAGCGTGTGCTCAGTGAA
GCTCAAGCCAGAAAGGTTAATGCTCCAGATATGCCATTATCAGATGAACAAAAGATTTACTTG
GCTAAGAAAGCAACTGAGCCTAAGAAGGTGTACAAGAATTTGTCTGAAGAAATACAAGATTTT
ATTGGTTCCAGAATGGCTGATCACGTCAACAAGATTGATAATCCATCCTTACTTGCTCACTTG
GATGCCTTATCTGAATCCAAGATTCAGACTTTGCTAAAACCTATGAAGAATATTGAAGACGCT
GAACTCGAGAAGCAAAGAACTTCACAACCAAGCAATCTAA