

Inserciones conservadas en secuencias de proteínas para estudios moleculares en el género *Rhodomicrobium*

Conserved insertions in protein sequences for molecular studies in the genus *Rhodomicrobium*

Ania Margarita Cutiño-Jiménez^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-6682-0752>

Andy Manuel González-Vicente² <https://orcid.org/0009-0001-6038-0848>

¹Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba

²Hospital Provincial Clínico Quirúrgico Docente “Saturnino Lora Torres”, Santiago de Cuba, Cuba

*Autor para la correspondencia: aniacutino@uo.edu.cu

RESUMEN

El género *Rhodomicrobium* comprende especies importantes para la agricultura y el medio ambiente. Sin embargo, pocas investigaciones se han dirigido a la identificación de marcadores moleculares que distingan a sus miembros de otros grupos de bacterias. Los marcadores Indeles (inserciones y deleciones) en secuencias de proteínas son útiles para estudios evolutivos y taxonómicos en bacterias. Se analizaron secuencias homólogas de las proteínas ADN ligasa NAD⁺ dependiente, y Serina ARNt sintetasa, obtenidas de la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot, y posteriormente alineadas con el programa MUSCLE. El análisis filogenómico se realizó por el método de Máxima Verosimilitud con el programa RAxML. Se identificaron inserciones que soportan la monofilia del género y confirman que *Rhodomicrobium lacus* es un grupo hermano de *R. vannielii* y *R. udaipurensis*. Las inserciones analizadas constituyen marcadores moleculares importantes para estudios taxonómicos y evolutivos en el género *Rhodomicrobium*, y para futuros estudios bioquímicos o funcionales en dichas enzimas.

Palabras clave: *Rhodomicrobium*; identificación; marcadores moleculares; indeles.

ABSTRACT

The genus *Rhodomicrobium* comprises species with agricultural and environmental importance. However, few investigations have been conducted to identify molecular markers that could be used to distinguish members of *Rhodomicrobium* from other groups of bacteria. Conserved signature indels (insertions and deletions) in protein sequences are useful for evolutionary and taxonomic studies in bacteria. Homologous sequences of the proteins NAD⁺ dependent DNA ligase and Serine-tRNA synthetase were obtained from the UniprotKB/Swiss-Prot database and aligned using MUSCLE programme. Phylogenomic analysis was performed through the Maximum Likelihood method with RAxML. Insertions were identified which support the monophyly of this genus and confirm that *Rhodomicrobium lacus* forms a sister group of *R. vannielii* and *R. udaipurensis*. Thus, the insertions analyzed constitute important molecular markers for taxonomic and evolutionary studies in *Rhodomicrobium*, and also for future biochemical or functional studies in those enzymes.

Keywords: *Rhodomicrobium*; identification; molecular markers; indels.

Recibido: 20/12/2022

Aprobado: 5/02/2023

Introducción

La familia *Hyphomicrobiaceae*, del orden hyphomicrobiales y la clase alphaproteobacteria, constituye un grupo fenotípicamente heterogéneo de bacterias gram negativas, que comprende especies de interés médico, biotecnológico y medioambiental.⁽¹⁾ Esta familia incluye a los géneros *Caenibius*, *Dichotomicrobium*, *Filomicrobium*, *Hyphomicrobium*, *Limoniibacter*, *Methyloceanibacter*, *Methyloligella*, *Pedomicrobium*, *Prosthecomicrobium*, *Seliberia* y *Rhodomicrobium*, los cuales están validados por el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas (ICNP, por sus siglas del inglés International Code of Nomenclature of Prokaryotes).⁽²⁾

El género *Rhodomicrobium* está conformado por tres especies, *R. udaipurensis*, *R. vanniellii* y *R. lacus*, que incluyen cepas que habitan en ambientes extremos y son importantes para la biorremediación y el tratamiento anaeróbico de desechos. *Rhodomicrobium udaipurensis* JA643^T, por ejemplo, presenta genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos.⁽³⁾ Del mismo modo, *Rhodomicrobium vanniellii* presenta la maquinaria enzimática requerida para la oxidación del hierro, y *Rhodomicrobium lacus* puede habitar en ambientes alcalinos.^(4,5) Adicionalmente, todas las especies de *Rhodomicrobium* son capaces de fijar dinitrógeno. La información genómica disponible indica que presentan genes que codifican molibdeno-hierro nitrogenasa y hierro-hierro

nitrogenasa; *Rhodomicrobium vannielii* presenta además una nitrogenasa de vanadio-hierro.^(4, 5, 3)

El desarrollo de plataformas de secuenciación de alto rendimiento o nueva generación Next-Generation Sequencing (NGS), ha permitido la secuenciación de genomas completos y un incremento acelerado en el uso de los datos ómicos. La disponibilidad de genomas completamente secuenciados para un gran número de especies bacterianas, constituye una oportunidad para la taxonomía y el diagnóstico molecular. La comparación de secuencias homólogas de proteínas de diferentes especies mediante el alineamiento múltiple, permite la identificación de marcadores moleculares CSI (del inglés Conserved Signature Indels, inserciones y deleciones) que son utilizados para estimar relaciones filogenéticas y para la demarcación de grupos específicos de organismos en términos moleculares.⁽⁶⁾

A pesar de que el género *Rhodomicrobium* ha sido ampliamente estudiado, pocas investigaciones han estado dirigidas a la estimación de marcadores genéticos o bioquímicos que distingan a sus miembros de otros grupos de bacterias. Teniendo en cuenta que el mismo comprende especies de gran relevancia, el presente estudio se basa en la estimación de indeles de tipo inserción en secuencias de proteínas, que pudieran ser útiles en la identificación y clasificación de especies, y para futuros estudios bioquímicos o funcionales en las enzimas de interés.

Materiales y métodos

Se analizaron las proteínas ADN ligasa NAD⁺ dependiente y Serina ARNt sintetasa, pertenecientes a especies del orden hyphomicrobiales. Las secuencias homólogas de las mismas fueron obtenidas a partir de la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org>), y el resultado fue enriquecido mediante búsquedas en bases de datos disponibles en el sitio NCBI (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); empleando la herramienta BLASTp (Basic Local Alignment

Search Tool) y utilizando la secuencia de *Rhodomicrobium vannielii* como secuencia de entrada.^(7,8) El resultado de la búsqueda con el programa Blastp fue analizado, con el objetivo de seleccionar secuencias altamente similares a las del género *Rhodomicrobium*, sobre la base de los siguientes valores: Expected value (E value) < 0,001; Identity >35 %, y Bit score > 50.⁽⁹⁾

Las secuencias escogidas fueron organizadas en conjuntos, archivadas en formato FASTA y posteriormente alineadas mediante el programa MUSCLE.⁽¹⁰⁾ Los alineamientos obtenidos se analizaron mediante inspección visual para identificar las inserciones, considerando relevantes aquellas flanqueadas por regiones conservadas y con igual longitud en todas las especies que la comparten, como sugieren los autores de la metodología.⁽⁶⁾

Se escogieron genomas completos de especies comprendidas en la familia Hyphomicrobiaceae a partir del Centro de Recursos Bioinformáticos de Bacterias y Virus (BV-BRC, <http://www.bv-brc.org>).⁽¹¹⁾ Para ser incluidos, los genomas fueron evaluados teniendo en cuenta parámetros como calidad del 100 %, además de consistencias fina y gruesa mayor a 95. Los genomas completos que no fueron encontrados en el BV-BRC, fueron obtenidos de la base de datos Genome del NCBI, y anotados manualmente.

El alineamiento de los genomas se realizó igualmente con el programa MUSCLE, y posteriormente se realizó análisis filogenómico por el método de Máxima Verosimilitud a partir del programa RAxML, el cual está integrado al BV-BRC, y se utilizaron 1 000 réplicas de bootstrap.^(12,13) Las especies utilizadas como grupo externo fueron: *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710, *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 y *Caulobacter segnis* ATCC2175.

Resultados y discusión

En el presente trabajo se identificaron inserciones en las proteínas ADN ligasa NAD⁺ dependiente y Serina ARNt sintetasa, las cuales fueron evaluadas para estimar si estas constituyen marcadores moleculares útiles para estudios moleculares en el género *Rhodomicrobium*.

En cada figura, el nombre científico es seguido por el número de acceso de la secuencia en la base de datos. Los puntos muestran identidad con el aminoácido de la primera secuencia en el alineamiento, y los espacios representan brechas que indican ausencia de la inserción la cual está señalada por un cuadro. La figura 1 muestra parte del alineamiento de la proteína Serina ARNt sintetasa, en la que se puede observar una inserción exclusiva del género *Rhodomicrobium*, que permite diferenciar a sus miembros del resto de las bacterias analizadas. En la figura 2 se muestra una inserción de seis aminoácidos en la proteína ADN ligasa NAD⁺ dependiente, la cual está presente en las secuencias de *Rhodomicrobium vannielii* y *R. udaipurensis*, pero está ausente en *R. lacus* y en el resto de las especies analizadas.

No existen reportes de marcadores moleculares de tipo inserción distintivos del género *Rhodomicrobium*, por lo que estos resultados pudieran ser utilizados en posteriores estudios para la identificación de características bioquímicas y fisiológicas exclusivas del mismo. Los estudios funcionales y de modelación estructural han revelado, que los indeles están presentes mayormente en los bucles superficiales de las proteínas, y se plantea que los mismos desempeñan un papel esencial en las bacterias portadoras.^(14,15,16)

		80	90	100	110
Otras familias	Amorphus coralli	WP 018698340.1	QDAQRRNTSSKAIGKAKGSG	DEAEAQRILMAEVADLK	
	Aestuariiivirga litoralis	WP 111199940.1	...A...AA...E...E.MKT.	.K.R.EA.K..MGSI.	
	Afifella aestuarii	WP 128294149.1	.E..NA...QA...Q.....A...	...A..N.ID...K..	
	Ahrensia marina	WP 053998810.1	.E..S...SA...E...A.M.Q.	.TEK.EA.K...GE..	
	Alsobacter metallidurans	WP 188518245.1	.AS.E...AL...E...Q.MAAK	.L.R.EA.K...A...	
	Pinisolibacter aquiterrae	WP 217928003.1	.EL.ASA.A.A...A.M.KK	.LET.E..K...QI.	
	Blastochloris viridis	AOA0H5BEY3	EA..A...AA...E...Q...ATK	...K.AE...K...	
	Bosea thiooxidans	AOA0Q3KMI3	.AT.E...AL...E...M.AK	.V.L.EK.K...A...	
	Breoghania corrubedonensis	WP 107990351.1	.E..E...AA...E...A...	...VK.KA.ID.I.EI.	
	Chelatococcus daeguensis	AOA165GJF9	.A..E...AL.RE...E..KAK	...R.EA...A...	
	Cohaesibacter celericrescens	WP 101533608.1	...T...AA...E...AT...	...EK.KA...GE..	
	Devosia soli	AOA0F5LBQ4	NE..EK..AL..Q...Q...AQK	...K..E...SR..	
	Kaistia adipata	WP 029073955.1	.A..E...AA...E...AK	...ET...T...	
	Lichenibacterium ramalinae	WP 129220349.1	.VV.E...AAA.E...Q.M.RK	.AET.E..K...G..	
	Nitrobacter hamburgensis	Q1QME2	EQ..A...AA...E...E..KAK	...R..AK...E...	
	Notoacmeibacter ruber	WP 121644974.1	N.M.E...AA...E...Q.M.Q.	.KET.EA.K...ST..	
	Lichenihabitans psoromatis	WP 131193833.1	.S..E...AAA.E...Q.M.RK	.M.R.DE.K...S...	
	Tepidicaulis marinus	WP 045442559.1	.E..T...AT...EV.A...AK.	...ER.NA.IK...E..	
	Phreatobacter oligotrophus	MBX9989725.1	.AG.E...SA...E...Q.M.CK	.M.R.DA.K...A...	
	Methylobrevis albus	WP 197312051.1	...EK..AA...E...AQK	...R.AA...E...	
	Pseudoxanthobacter soli	WP 073625453.1	.LL.E...AA...E...AAK	.D.R.EE...L.G.	
	Rhabdaerophilum calidifontis	WP 150287204.1	EALNA...AA...E..A.MAAK	.V.R.EA.K...AG.	
	Roseiarcus fermentans	WP 113888048.1	.RS.E...AA...E..A.M.RK	.G.A.DA.K...G..	
	Salinarimonas ramus	WP 188915130.1	.A..E...SL..E..G..KA.	...R..A...G...	
	Segnochro bacterium spirostomi	WP 153485192.1	.TL.E...AA...E...Q...AAK	...K.SA...TL..	
	Stappia albiluteola	WP 182163385.1	...E...AA...E...A.R	...R..A.ID...QI.	
	Lutibaculum baratangense AMV1	V4TAU0	.E..E...AA...E...A...	...GT...ID.I.E..	
	Xanthobacter autotrophicus	A7INN1	EGKLA...AA...E...Q...AQK	...ER.S...N...	
	Aurantimonas manganoxydans	AOA0P0Z5N7	.TL.G...EA...E...T...	...G.EE.IR.IGEI.	
	Bartonella quintana	Q6G036	.S..E...AA...E...Q.LAAC	.QTM.EH.R...EEI.	
	Beijerinckia indica indica	B2IJG1	.A..E...AA...E..A.MKAK	.N.R.EA.K..M.E..	
	Brucella abortus	B2S5B8	.A..E...AA...E...MAAK	.MGT.EK.K...GE..	
	Caenibius tardaugs	WP 021690261.1	.ES.S...DA...L..Q.MAQ.	.KDK.EA.K...E...	
	Caenibius sp. WL	QZP08063.1	.ES.S...DA...L..Q.MAQ.	.KDK.EA.K...E...	
	Caenibius tardaugs NBRC 16725	AZI36694.1	.ES.S...DA...L..Q.MAQ.	.KDK.EA.K...E...	
	Dichotomicrobium thermohalophilum	WP 119061746.1	.E..T...AA...E...A...	...R..TA..D...S..	
	Filomicrobium insigne	WP 090229415.1	...S...AA...E...MAAK	.Q.A.DK.K...E...	
	Hyphomicrobium methylovorum	WP 246317663.1	.E..S...AA...E...AK	.N.T.DK...E...	
	Hyphomicrobium sulfonivorans	WP 246274695.1	.E..A...AA...E...A.K	...T.SA...T...	
	Hyphomicrobium album	WP 229309451.1	.E..A...AA...E..A.AAK	...K.NA...A...	
	Hyphomicrobium facile	WP 092867215.1	.E..SQ...AA...E...AAK	...T.T...T...E..	
	Hyphomicrobium sp. CS1GBMeth3	WP 072390253.1	...S...AA...E...AAK	...L.VK...E...	
	Hyphomicrobium sp. CS1BSMeth3	WP 072385217.1	.E..A...SA...E...A.K	...L.ST...A...	
	Hyphomicrobium sp. NDB2Meth4	WP 072376616.1	.E..S...AA...E...AAK	...K.AE...T...	
	Hyphomicrobium sulfonivorans	WP 068461052.1	.E..A...AA...E...A.K	...T.SA...T...	
Hyphomicrobium sp. GJ21	WP 046846597.1	...S...AA...E...AAK	...T.A...E...		
Hyphomicrobium sp. 99	WP 045837822.1	.E..SQ...AA...E...AAK	...T.S...T...E..		
Hyphomicrobium sp. 802	WP 024276098.1	.E..SQ...AA...E...AAK	...VT.S...G...A..		
Hyphomicrobium nitrativorans	WP 023787283.1	...S...AA...E...AAK	...L.SK...E...		
Hyphomicrobium zavarzinii	WP 020087162.1	...S...AV...E...AAK	...L.TK...E...		
Hyphomicrobium denitrificans	WP 015597581.1	...S...AA...E...AAK	...T.A...E...		
Hyphomicrobium sp. MC1	WP 013948298.1	.E..SQ...AA...E...AAK	.D.T.S...A...		
Hyphomicrobium denitrificans	WP 013215292.1	...S...AA...E...AAK	...T.A...E...		
Hyphomicrobium sp. ghe19	CAA2141555.1	.E..SQ...AA...E...AAK	...T.T...T...E..		
Hyphomicrobium sp.	KAB2941253.1	.E..A...AA...E...AAK	...T.EA...M...		
Hyphomicrobium sp. GJ21	CEJ85577.1	...S...AA...E...AAK	...T.A...E...		
Limoniibacter endophyticus	WP 189487350.1	.K..E...QA...E...Q.MAAK	.M.K.DS.KV...QI.		
Methyloceanibacter caenitepidi	WP 045366753.1	...L.A...AV...D...KDK	N...D...D...G..		
Methyloceanibacter marginalis	WP 069623672.1	.EL.AT.AA.D...D...QAK	...K..D...D...G..		
Methyloceanibacter methanicus	WP 069437661.1	...L.A...AA...D...C.K	...K...D...GI.		
Methyloceanibacter stevinii	WP 069445374.1	...L.A...AV...D...KDK	N...D...D...G..		
Methyloceanibacter sp.	GFO82136.1	...L.A...AA...E...QAK	...D...D...GI.		
Methyloceanibacter sp. wino2	WP 108680755.1	...L.A...AV...D...KDK	N...D...D...G..		
Methyloceanibacter caenitepidi	WP 045366753.1	...L.A...AV...D...KDK	N...D...D...G..		
Methyloligella halotolerans	ODA68745.1	...E...AA...E...QAK	.TL.S.D...G..		
Methyloligella sp. GL2	WP 174541880.1	.E..A...AA...E...AAK	...G..K..D...G..		
Methyloligella sp.	GJL99067.1	...AK...AA...E...AT.	...A.TAAI...KI.		
Prosthecomicrobium hirschii	KPL51012.1	.EM.A.Q.AA.D...ATK	...R..A...S...		
Prosthecomicrobium pneumaticum	WP 183858036.1	.A..E...AA...E..R.MAAK	.A.T.EA.KS.TA...		
Rhodomicrobium udaipurens JA643	KAI94868.1	...M.A...AA...E...K.G	P.K.EA...E...		
Rhodomicrobium sp. Az07	WP 251133862.1	...S.A...AA...E...K.G	P.K.EA...E...		
Rhodomicrobium vannielii	WP 210336439.1	...M.A...AA...E...K.G	P.K.EA...E...		
Rhodomicrobium udaipurens	WP 210336108.1	...M.A...AA...E...K.G	P.K.EA...E...		
Rhodomicrobium lacus	WP 127075143.1	...L.A...AA...E...K.G	Q.K.EA...E...		
Otras familias	Microvirga lotononidis	I4YX18	.A.TE...AL...E...Q...ARK	...R..E...RI.	
	Methylocystis silviterrae	WP 175094499.1	.R..E...AA...E..A.MKA.	.S.R.EA.K...RI.	
	Mesorhizobium loti	PST26613.1	...M.S...AA...E..A.MAQK	NSEL.D..K...	
	Rhizobium meliloti	Q92Q22	...M.S...AA...E..A.MAQK	NSEL.D..K...	
	Rhodobium orientis	WP 111433921.1	...E...AA...E...E...	...EK..A.ID...K..	

Fig. 1- Alineamiento de la proteína Serina ARNt sintetasa que muestra inserción de un aminoácido característica del género *Rhodomicrobium*

		310	320	330	340	350	360
Otras familias	Amorphus coralli	WP 083923499.1	KVTASRPLRFFAYAWG	EIPELPRDTQYDMVEFQSWGFTSNPLMRR	.A.Q.A...WG..QA.K...LPV...VL		
	Aestuariaiivirga litoralis	WP 196502152.1	SI.....K.....	.VTA.A...WGV.M.V.RD..LP..F.KL			
	Afifella aestuarii	WP 128291540.1	R.....S.....	SI.KE...K.....	DVSDM.S...SG..GKLE.Y...I...ITV		
	Ahrensia marina	WP 053997425.1	RI.A.....	.K.M.AR...SG...A.ARF.LP.....			
	Alsobacter metallidurans	WP 188519726.1	.I...V.K.....	.V.WEVA..FER..A.GR...PI..R.V.			
	Pinisolibacter aquiterrae	WP 217926251.1	RI.Q...K...G..	.M.V..AP..MGV..T.RR...R...K.			
	Blastochloris viridis	A0A0H5B8I8	TI.....Y.....	.MTS..A...MG.I.A.EG...V...K.			
	Bosea thiooxidans	A0A0Q3KZK5	EI.....Y.....	DVSA..A...MGV..ALGR...PI...K.			
	Breoghania corrubedonensis	WP 107991328.1	A...R...A.....	.VS.ELAP...EA..QR.DA...MV..Q..C			
	Chelatococcus daeguensis	WP 101532343.1	EI..R..N.A.....	TI...N.K...S..	.MSAM.AE..MG...A.AD..LP...R.TL		
	Cohaesibacter celericrescens	A0A0F5LDT0	.I.....	.HSG..AA..F...IAA.ARF.LP...TAL			
	Devosia soli	WP 029076177.1	A...A...Q.....	AI...K...K.....	.MTR.A...H..L.WLKV..LP...IEL		
	Kaistia adipata	WP 129220267.1	2P 00625988	SI.....A.....	.LSKR..E..MG..QWLSEI...I...E.		
	Lichenibacterium ramalinae	WP 129220267.1	RLQ88174.1	A...D...K.....	.MTS..AP...SG..AA.RR..LP...TAV		
	Nitrobacter hamburgensis X14	WP 131196606.1	WP 131196606.1	NI.RQ.....	DVSG..A...MGVI.AMGR...A.....		
	Notoacmeibacter ruber	WP 045444821.1	WP 045444821.1	RI.E.....	.AAR...SG..AW.RDL..P...TVV		
	Lichenihabitans psoromatis	WP 045444821.1	WP 045444821.1	.I.....	.AS.V.AA..F.V.QC.AA..KV..DR.T.		
	Tepidicaulis marinus	WP 045444821.1	WP 045444821.1	AL...K.....	.MSRV.ET..FA..QR.GA...CV..R...		
	Phreatobacter oligotrophus	WP 197309799.1	WP 197309799.1	A...G.....	.MSAM.AM..SG..AA.AR..P.....		
	Methylotrochium albus	WP 073626624.1	WP 073626624.1	R.....Q.....	.VS.PFAA..HEAIAAMGRF.LP...TKL		
	Pseudoxanthobacter soli	WP 150286447.1	WP 150286447.1	R...E...K.....	-AMPF.AP...EA.RR.EA...R...V.		
	Rhabdaerophilum calidifontis	WP 113892031.1	WP 113892031.1	A...R.....	.MSGV.EA...AR.GR..LPV..R.T.		
	Roseiarcus fermentans	WP 188910592.1	WP 188910592.1	A...E.....	.MSDV..Q..ME..A..GD...EI..R...		
	Salinarimonas ramus	WP 153483163.1	WP 153483163.1	RI.R...S...G..	.VS.V.STS.WGVY.EMRAF.LP.....L		
	Segnochrobacterium spirostomi	WP 182165483.1	WP 182165483.1	SI.....K.....	.ASD..AE..FGV..A.AR...T...VV		
	Stappia albiluteola	WP 081718313.1	WP 081718313.1	GI.RA.K.Q.....	.AS.V.GE..TEV.AAAGF..PV.ER.K.		
	Xanthobacter autotrophicus ATCC BAA-1158	A7IG64	A7IG64	RI...K.H...C.	.VS.TFAAS.ME.MKKLKEY..FI...TKS		
	Aurantimonas manganoxydans ATCC BAA-1229	Q1YM75	Q1YM75	...G...H.....	.AS.E.A...MG..TA.KAF.LPV...QL		
	Bartonella quintana Toulouse	CAF26355	CAF26355	...K.....	.MSDM.A...LG...V.RQ...PV...K.		
	Beijerinckia indica subsp. indica ATCC 9039	B2IGH4	B2IGH4	W...K...W.HG..	AASHVQGT..Q.VMARIAR..LPIS.ELV.		
	Bruceella abortus S19	B286P4	B286P4	EAV.RY..DIYV.DLL	TPDDEWSSHWALL.R.RD...R..KEN..		
	Caeinibius tardaugens	WP 021688949.1	WP 021688949.1	.L..K.....G..	.ASS..TE..SGV..AMGR..LPI..R.TL		
	Dichotomicrobium thermohalophilum	WP 119060585.1	WP 119060585.1	SI..Q...Q.....	AASK..S...RGV.AA.K...LPV...EI		
	Filomicrobium insigne	WP 090227994.1	WP 090227994.1	TI..A.....	.MS.FTAE..HG.IAAMHR..LPV...T.P		
	Hypomicrobium denitrificans ATCC 51888	ADJ22077.1	ADJ22077.1	SI..Q...Q.....	AASK..A...RGV.AA.RE..LPV...I		
	Hypomicrobium sp. 32-62-53	OY01641.1	OY01641.1	SI..Q...Q.....	AASK..S...RGV.AA.K...LPV...EI		
	Hypomicrobium denitrificans 1NES1	AGK56444.1	AGK56444.1	SI.....C.....	.MSDM.A...KG...A.AK..LPV...QL		
	Hypomicrobium denitrificans	WP 013214296.1	WP 013214296.1	AI..A.....	.MSDM.S.S.NG...A.AH..MPV...TL		
Hypomicrobium nitrativorans NL23	AHB49617.1	AHB49617.1	SI.....	.ASS..A...SGVD.A.AK..LPV.KAA.V			
Hypomicrobium zavarzinii	WP 020085034.1	WP 020085034.1	GI..K.....	AASK.SA...AGVLAA.EA..LPV...L.V			
Hypomicrobium album	WP 154740014.1	WP 154740014.1	TI.....	.ASS..A...SGVD.A.A...LPV...AQV			
Hypomicrobium methylovorum	WP 181336977.1	WP 181336977.1	SI..K.....T..	AAS...A...AGV.AA.KR..LPV...HA			
Hypomicrobium sulfonivorans	WP 173953231.1	WP 173953231.1	EI.R.....	DAS.PLGR...EV..QR.RD...TV.EE.KL			
Hypomicrobium sp. 99	WP 045838227.1	WP 045838227.1	S.....Q.....	.AAS..A...WGVY.A.AK...PL...ATL			
Limoniibacter endophyticus	WP 189490636.1	WP 189490636.1	S.....Q.....	DAAS..A...WGVY.A.AR...PL...AKL			
Methyloceanibacter caenitepidi	WP 0453666356.1	WP 0453666356.1	TI.....A...G..	.A.AP.A...WGAYRAMKK...PL...AE.			
Methyloceanibacter sp. wino2	WP 108681070.1	WP 108681070.1	S.....Q.....	.ASS..A...WGVY.A.AR...PL...AKL			
Methyloceanibacter superfactus	WP 244500175.1	WP 244500175.1	S.....Q.....	.AAS..A...WGVY.A.AK...PL...AKL			
Methyloceanibacter stevinii	WP 069445185.1	WP 069445185.1	S.....Q.....	.VAA..AES.WGVYDAMKR...PV...L.			
Methyloceanibacter methanicus	WP 069438437.1	WP 069438437.1	...G...A.....	.TGD..A...WGVY.AMRR..LPL...QL			
Methyloligella sp. GL2	WP 174542131.1	WP 174542131.1	AI..A...Q...S..	.MAAM.AE..MG..QA.G...PI...VL			
Methyloligella halotolerans	WP 069094185.1	WP 069094185.1	NI..A.....	.MSAM.A...LG...A.RA..LP...R.VL			
Prosthecomicrobium hirschii	WP 054357589.1	WP 054357589.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEI			
Prosthecomicrobium pneumaticum	WP 183858692.1	WP 183858692.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEI			
Rhodomicrobium vanniellii ATCC 17100	ADP71330.1	ADP71330.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEI			
Rhodomicrobium vanniellii	WP 013419713.1	WP 013419713.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEI			
Rhodomicrobium udaipurense JA643	KAI93363.1	KAI93363.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEL			
Rhodomicrobium udaipurense	WP 081796865.1	WP 081796865.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEL			
Rhodomicrobium sp. JA980	WP 127078633.1	WP 127078633.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEL			
Rhodomicrobium lacus	WP 127078633.1	WP 127078633.1	AI..A...H.....	AI..A...NFGVLQAIHG...PL..PVEL			
Otras familias	Microvirga lotononidis	I4YVI6	AI.....	.VS.M.A...HG.M.C.K.F.LKV...T..			
	Methylocystis silviterrae	WP 175092645.1	.I.....H...G..	.TSA..AN..LGVL.ALRGY.LPV...TTL			
	Mesorhizobium loti	P8T25158.1	...N.K.....	.MSAM.A...LG...T.KA...PV...Q.			
	Rhizobium meliloti 1021	Q92NM8	...N.K.....	.MSAM.A...LG...T.KA...PV...Q.			
	Rhodobium orientis	WP 111435936.1	WP 111435936.1	S...E...K.....	.MSD..A...EV.SA.AD...TV..A..L		

Fig. 2- Alineamiento de la proteína ADN ligasa NAD+ dependiente que muestra inserción de seis aminoácidos en *Rhodomicrobium vanniellii* y *R. udaipurense*, ausente en *R. lacus* y el resto de las bacterias analizadas

El género *Rhodomicrobium* es reconocido por su capacidad de crecer en ambientes extremos, por su versatilidad fisiológica e importancia ecológica en los ciclos del carbono, nitrógeno y azufre. El mismo incluye cepas que degradan químicamente una gran variedad de compuestos orgánicos, y son importantes para la agricultura al tolerar las altas temperaturas que alcanza la materia orgánica durante el proceso de compostaje. Actualmente, la aplicación de estas bacterias se ha extendido a otras áreas como la ganadería, avicultura, porcicultura, así como para el reciclaje de residuos y el tratamiento de agua y efluentes.⁽¹⁷⁾

La bacteria *R. udaipurensis* JA643^T, por ejemplo, es una cepa sicrotolerante que sobrevive en altas concentraciones de metales.⁽³⁾ Esta cepa presenta genes que codifican enzimas monooxigenasas, dioxigenasas y peroxidasas involucrados en la degradación de compuestos aromáticos heterocíclicos. Por otro lado, *R. vannielii* ATCC 17100 y *Rhodomicrobium* sp. R_RK_3 han sido identificadas como bacterias capaces de precipitar metales disueltos como el hierro.^(4,18)

La figura 3 muestra el árbol de Máxima Verosimilitud; los números en los nodos internos se corresponden con los valores de soporte de Bootstrap. La inserción de un aminoácido presente en la enzima Serina ARNt sintetasa es exclusiva de *Rhodomicrobium*, y soporta la monofilia de ese género. Este resultado es congruente con el análisis filogenómico realizado, y corrobora que el género *Rhodomicrobium* forma un grupo monofilético soportado por un valor de bootstrap de 100 % (figura 3), como fue reportado en estudios previos.⁽⁵⁾ De esta manera, la inserción constituye un marcador distintivo de *Rhodomicrobium* que puede ser utilizado como un carácter molecular complementario en estudios taxonómicos y filogenéticos.

Del mismo modo, la inserción hallada en la enzima ADN ligasa NAD⁺ dependiente, es congruente con el análisis filogenético. Esta inserción está presente en las especies *Rhodomicrobium vannielii* y *R. udaipurensis*, pero ausente en *R. lacus*. En el árbol filogenético *R. vannielii* ATCC 17100 y *R. udaipurensis* JA643 forman un grupo hermano, soportado por un valor de bootstrap de 100 %, y *R. lacus* JA980 está ubicado en una rama aparte. Este hecho sugiere que la mutación involucrada en la inserción ocurrió en el

ancestro común de las dos especies que lo portan, señalando a *R. lacus* como una especie más antigua que *R. vannielii* y *R. udaipurensis*.

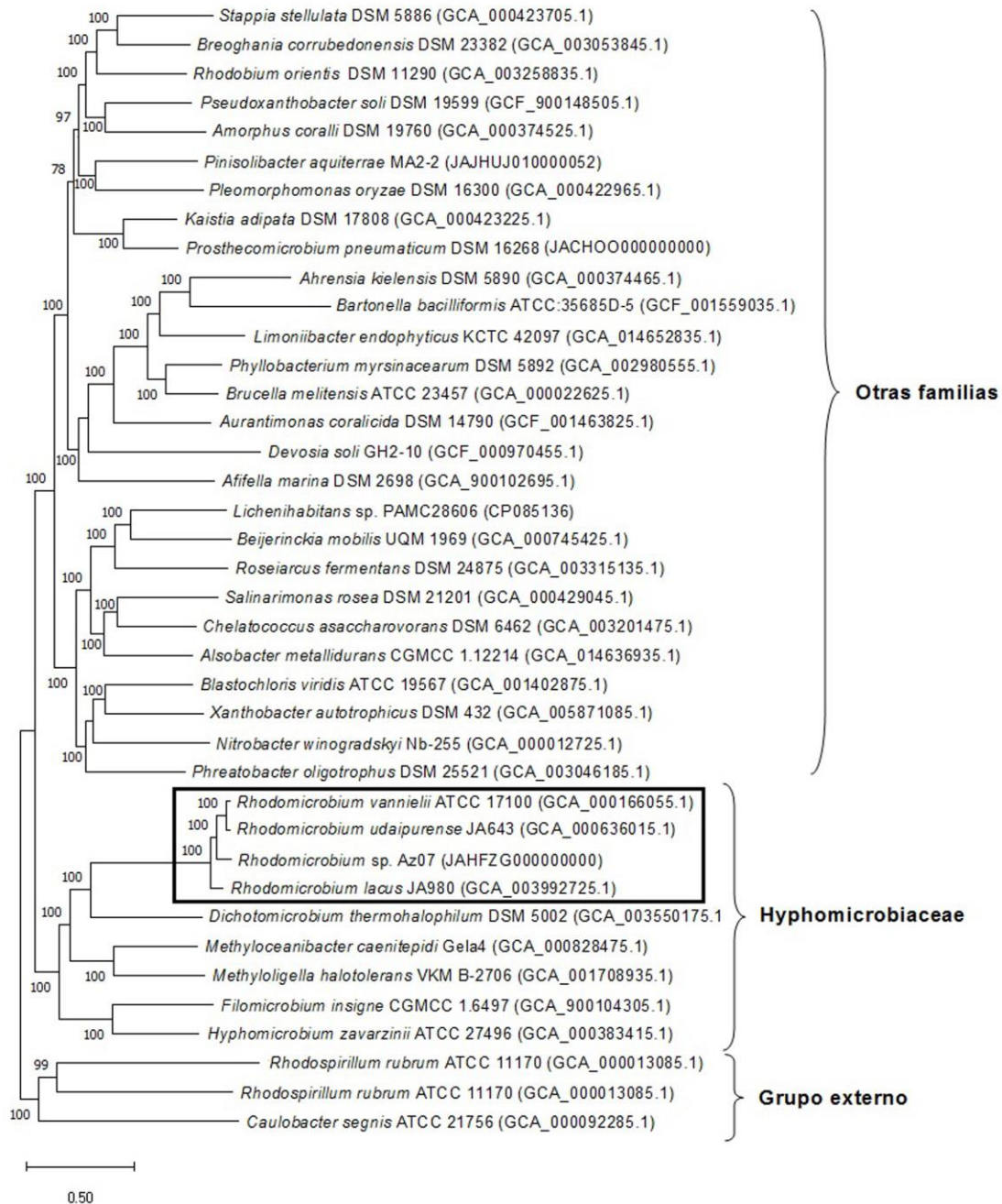


Fig. 3- Árbol filogenómico inferido por el método de Máxima Verosimilitud a partir de genomas completos de 39 especies del orden hyphomicrobiales

El trabajo que se propone constituye un aporte al conocimiento de la biología y genética de *Rhodomicrobium*, y sirve de base para futuros estudios relacionados con este género. Para la especie *Rhodomicrobium udaipurense* se ha descrito, la capacidad de biosintetizar diplopteno, diploptero, bacteriohopanotriol y aminobacteriohopanotriol, los cuales constituyen tipos particulares de hopanoides. Estos se han considerado marcadores biogeoquímicos, y potenciales precursores de los esteroides característicos de organismos más complejos.⁽³⁾ Los hopanoides contribuyen a mantener la integridad de la membrana en condiciones drásticas de pH, temperatura extremas y presencia de antibióticos, de ahí la importancia del estudio del genoma de *R. udaipurense*.

Los resultados pueden tener significado práctico en el diseño de protocolos de diagnóstico basados en técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), así como para la identificación *in silico* de especies conocidas o nuevas, mediante búsqueda por similitud con el programa BLASTp. Los marcadores indels del tipo inserción son muy utilizados en estudios taxonómicos y evolutivos como caracteres moleculares distintivos a determinados grupos. Actualmente se utilizan como complemento a los estudios filogenómicos para la descripción de nuevas especies bacterianas.^(19,20)

En el desarrollo de la sistemática bacteriana, resulta de gran valor la identificación de marcadores moleculares o características exclusivas de los diferentes grupos de bacterias. La molécula 16S ARNr es muy conservada, y a pesar de que es muy útil para el análisis de grupos distantes a nivel de phylum, resulta difícil su utilización para la diferenciación de especies, debido a que no presenta variaciones considerables para la distinción a este nivel⁽²¹⁾; todo lo cual corrobora una vez más el valor de los marcadores moleculares del tipo inserción como complemento a los métodos tradicionales para la clasificación de bacterias.

Conclusiones

El análisis de las proteínas permitió la identificación de inserciones, que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares que complementan los estudios taxonómicos y filogenéticos en *Rhodomicrobium*. La inserción de un aminoácido en la proteína Serina ARNt sintetasa soporta la monofilia de *Rhodomicrobium*, y permite una distinción a nivel de género; mientras que la inserción de seis aminoácidos en la ADN ligasa NAD⁺ dependiente confirma que *R. lacus* es un grupo hermano de *R. vanniellii* y *R. udaipurensis*. Los datos presentados representan un aporte teórico que sirve de base para futuros estudios bioquímicos y funcionales en las proteínas evaluadas.

Referencias bibliográficas

1. HÖRDT, A. y otros. “Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria”. *Frontiers in Microbiology*. 2020, **11**, p. 468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>
2. PARTE, A. C. “LPSN–List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018, **68**(6), 1825-1829. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002786>
3. TUSHAR, L.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V. “Draft genome sequence of *Rhodomicrobium udaipurensis* JA643^T with special reference to hopanoid biosynthesis”. *DNA Research*. 2014, **21**(6), 639-647. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu026>
4. CONNERS, E. M.; DAVENPORT, E. J.; BOSE, A. “Revised Draft Genome Sequences of *Rhodomicrobium vanniellii* ATCC 17100 and *Rhodomicrobium udaipurensis* JA643”.

Microbiology resource announcements. 2021, **10**(13), p. e00022-21.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00022-21>

5. SURESH, G.; KUMAR, D.; UPPADA, J.; CH. S.; RAMANA, CH. V. “*Rhodomicrobium lacus* sp. nov., an alkalitolerant bacterium isolated from Umiam lake, Shillong, India”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020, **70**(1), 662-667. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003813>

6. GUPTA, R. “Impact of genomics on the understanding of microbial evolution and classification: the importance of Darwin’s views on classification”. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016, **40**(4), 520–553. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw011>

7. THE UNIPROT CONSORTIUM. “UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021”. *Nucleic Acids Research*. 2021, **49** (D1), D480-D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>

8. ALTSCHUL, S. F. y otros. “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”. *Nucleic Acids Research*. 1997, **25**, 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

9. PEARSON, W. R. “An introduction to sequence similarity (“homology”) searching”. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2013, **42**(1), p. 3.1. 1-3.1.8 <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>

10. EDGAR, R. C. “MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput”. *Nucleic Acids Research*. 2004, **32**(5), 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

11. OLSON, R. D. y otros. “Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR”. *Nucleic Acids Research*. 2022, **1**, D678-D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>

12. KOZLOV, A. M. y otros. “RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference”. *Bioinformatics*, 2019, **35**(21), 4453-4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>

13. STAMATAKIS, A. “How many bootstrap replicates are necessary?”. *Journal of Computational Biology*, 2010, **17**(3), 337-354. <https://doi.org/10.1089/cmb.2009.0179>
14. GUPTA, R. S. “Applications of genome sequences for discovering characteristics that are unique to different groups of organisms and provide insights into evolutionary relationships”. *Frontiers in Genetics*. 2016, **7**, p. 27. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00027>
15. GUPTA, R. y otros. “SARS-CoV-2 (COVID-19) structural and evolutionary dynamicome: Insights into functional evolution and human genomics”. *Journal of Biological Chemistry*. 2020, **295**(33), 11742-11753. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014873>
16. KHADKA, B.; PERSAUD, D.; GUPTA, R. S. “Novel Sequence Feature of SecA Translocase Protein Unique to the Thermophilic Bacteria: Bioinformatics Analyses to Investigate Their Potential Roles”. *Microorganisms*. 2020, **8**(1), p. 59. <https://doi:10.3390/microorganisms8010059>
17. HU, T. y otros. “Succession of diazotroph community and functional gene response to inoculating swine manure compost with a lignocellulose-degrading consortium”. *Bioresource Technology*, 2021, **337**, p. 125469. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125469>
18. BRAUN, B.; KÜNZEL, S.; SCHRÖDER, J.; SZEWZYK, U. “Draft genome sequence of strain R_RK_3, an iron-depositing isolate of the genus *Rhodomicrobium*, isolated from a dewatering well of an opencast mine”. *Genome Announcements*. 2017, **5**(34), p. e00864-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00864-17>
19. ADEOLU, M. y otros. “Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov.”.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016, **66**(12), 5575-5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>

20. CUTIÑO JIMÉNEZ, A. M.; MENCK, C. F. M.; CAMBAS, Y. T.; DÍAZ PÉREZ, J. C. “Protein signatures to identify the different genera within the Xanthomonadaceae family”. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2020, **51**(4), 1515-1526. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00304-2>

21. NAUSHAD, S. y otros. “A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order Xanthomonadales: proposal to transfer the families *Algiphilaceae* and *Solimonadaceae* to the order Nevskiales ord. nov. and to create a new family within the order Xanthomonadales, the family *Rhodanobacteraceae* fam. nov., containing the genus *Rhodanobacter* and its closest relatives”. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015, **107**(2), 467-485. <https://doi: 10.1007/s10482-014-0344-8>

Conflicto de intereses

Los autores declaran la no existencia de conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Andy Manuel González Vicente: análisis de datos, descripción y discusión de resultados, escritura del manuscrito.

Ania Margarita Cutiño Jiménez: análisis de datos, descripción y discusión de resultados, escritura del manuscrito, revisión final del manuscrito.