



Caracterización de una nueva bacteria antártica, y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro

Ornella Carrión Fonseca

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Ornella
Carrón
Fonseca



Caracterización de una nueva bacteria antártica y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro



Caracterización de una nueva bacteria antártica y estudio de una nueva vía de
producción de dimetilsulfuro



2014

Ornella Carrón Fonseca
2014



Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias

“Caracterización de una nueva bacteria antártica y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro”

Ornella Carrión Fonseca, 2014



Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias

Programa de Doctorado de Biotecnología

**“Caracterización de una nueva bacteria antártica y estudio de una
nueva vía de producción de dimetilsulfuro”**

Memoria presentada por Ornella Carrión Fonseca para optar al título de doctora por la
Universidad de Barcelona

Directora de Tesis

Doctoranda

Dra. Elena Mercadé Gil

Ornella Carrión Fonseca

Ornella Carrión Fonseca, 2014

La presente tesis doctoral ha sido financiada mediante las becas BES-2011-044048 y EEBB-I-13-07770 concedidas a la doctoranda Ornella Carrión Fonseca por el Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español y los proyectos “Obtención de emulsionantes poliméricos de nueva generación, CTQ2010-21183-C02-01” financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del gobierno español y “Fisicoquímica i estructuració vesicular de lípids i biopolimers bacterians, 2009SGR1212” financiado por la Generalitat de Catalunya.

“El éxito es la habilidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo”

Winston Churchill

A todos los que han hecho posible que este sueño se haga realidad; en especial a mis padres, mi hermano y a ti por vuestro amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Llegó el momento, cinco años después y con la misma ilusión del principio, de llegar a la meta y echar la vista atrás para hacer balance de este camino tan intenso que supone la Tesis Doctoral. A lo largo de este periodo han habido muchas personas sin las cuales esto no habría sido posible y es el momento de decirles gracias, muchas gracias por estar siempre ahí, por el apoyo que me habéis brindado, por todo lo que me habéis enseñado, por compartir conmigo tantos momentos importantes de mi vida. Una gran parte de esto también es vuestro.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi directora de tesis, la Dra. Elena Mercadé, la oportunidad ofrecida, la flexibilidad y comprensión que siempre me ha mostrado, el apoyo profesional y personal y todo lo que he aprendido a su lado. Mile, no me imagino haciendo esto con otra persona que no seas tú... Mil gracias por todo.

También quiero mencionar y agradecer a la persona que me involucró en esta aventura, la Dra. Asun López. Nunca olvidaré tu cariño, tu cercanía y tu apoyo. Gracias por creer en mí y abrirme las puertas de esta gran aventura.

Todos aquellos que se han embarcado en este desafío que es el doctorado coincidirán conmigo en que no sólo se crece profesionalmente, sino que también se tiene la oportunidad de conocer a muchas personas que se convierten en importantes en tu vida. En mi caso, tengo el placer de haber conocido a Carmen, M^a Jesús y Lucía, sin ellas el departamento no sería el mismo. Gracias por regalarnos una sonrisa cada día, por escuchar nuestras penas y glorias, por sacarnos del apuro en más de una ocasión y ser pacientes. También quiero dar las gracias especialmente a mis compañeros de fatiga de todos estos años: a Carla, Ariadna, Guillermo, Xavi, Sara, Éscar, Lidia, Merche, Eleonora, y Joana. Gracias por esos cafés de risas, de buscar soluciones juntos, de debates filosóficos. Gracias por animarme en aquellos momentos en que no veía la luz. Gracias por tantas anécdotas vividas y, sobre todo, gracias por la paciencia infinita. Sin vosotros, esto no habría sido tan enriquecedor.

Durante estos años también tuve la oportunidad de realizar una estancia en principio breve que luego se convirtió en duradera en Inglaterra. Allí tuve la ocasión de empezar de nuevo y conocer gente maravillosa que me llevo para siempre. Gracias a mis Norwicheros Alba, Cris, Dani y Álvaro por ser mi pequeña familia en esas tierras, por vuestro apoyo incondicional, por las confidencias entorno a un café, por las risas, por los días de chicas, por las comidas

familiares de los domingos, por las fiestas y tantos planes e ilusiones compartidas. No importa allá donde estéis, sé que esta pequeña familia seguirá unida.

Gracias infinitas también a la gente del laboratorio más *cool* de la Facultad de Ciencias Biológicas, el 1.29. Gracias Andy, Emily, Simone, Ana y Ollie por acogerme tan bien, por el apoyo profesional y anímico ofrecido, por ser amigos dentro y fuera del laboratorio, por vuestra dulzura e ingenio y por estar siempre a punto para cualquier evento. Ya sabéis lo mucho que significáis para mí. Mención especial para mi supervisor durante ese tiempo, el Dr. Jonathan Todd, por brindarme la oportunidad de vivir esta gran experiencia y aprender a su lado, gracias por su pasión por la ciencia que contagia a todos aquellos que le rodean, por su motivación y por demostrar que con trabajo duro los sueños a veces se pueden conseguir.

También quiero dedicarle un enorme gracias a mis amigos de toda la vida, los de casa, los de siempre: Gema, Sara, Sandra, Héctor, Jorge, Ana, Vane, Vero, Jesús, Pedro y Emilio. Gracias por compartir vuestra vida conmigo, por crecer juntos, por tantas cosas vividas, porque es un placer ver que los años pasan, los acontecimientos se suceden, pero hay algo que no cambia: siempre estáis ahí. Gracias especialmente por la locura de venir a verme y por ese cuaderno especial que hicisteis con tanto cariño. Simplemente sois geniales y es un orgullo teneros.

Sheila, no podías faltar. Gracias por los momentos y aventuras vividas. Los cafés de Starbucks, los cotilleos, los viajes y las jornadas intensas de playa no se olvidan.

Nada de lo que soy o lo que hago tiene sentido sin mi familia, es la fortuna más grande que tengo. No me imagino la vida sin vosotros. Gracias por el apoyo incondicional, por enseñarme las cosas importantes de la vida y por estar siempre tan unidos. En especial quiero agradecerle a mis padres todo lo que han hecho por nosotros a lo largo de todos estos años, por ser como sois, por entendernos, por ayudarnos siempre, por la libertad que nos habéis dado para elegir nuestro camino, por la seguridad que siempre nos ha proporcionado saber que pase lo que pase estaréis ahí y nos tenderéis la mano. Gracias por enseñarnos que la familia siempre es lo primero y que nada tiene sentido sin ella. Todo esto os lo debo a vosotros y es vuestro también.

Finalmente, no puedo acabar sin mencionar a una persona que apareció de forma inesperada y que cambió mi vida. Sí, eres tú. Me faltan las palabras para hablar de ti y lo que significas para mí. Desde el principio no ha sido fácil pero no hay día que no me repita lo afortunada

que soy por tenerte a mi lado, porque el mayor regalo es despertarme junto a ti. Gracias por compartir mis sueños, por tu apoyo en los buenos y en los malos momentos, por hacerme sonreír día tras día, porque a tu lado me olvido del mundo y simplemente soy feliz.

Ornella Carrión Fonseca.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA ANTÁRTIDA	3
2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MICROORGANISMOS	5
2.1. Clasificación taxonómica polifásica	6
2.2. Futuras direcciones en la Clasificación Taxonómica de Microorganismos	8
3. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN AL FRÍO	9
3.1. Aumento de la fluidez de las membranas	10
3.2. Metabolismo energético	11
3.3. Transcripción y traducción	12
3.4. Catálisis y plegamiento de proteínas	12
3.5. Proteínas de choque térmico por frío o por calor	14
3.6. Proteínas anticongelantes y crioprotectores	15
4. EXOPOLISACÁRIDOS (EPSs) BACTERIANOS	16
4.1. Composición y funciones de los EPSs bacterianos	16
4.2. Aplicaciones biotecnológicas de los EPSs	17
4.3. Microorganismos de ambientes extremos como fuente de nuevos biopolímeros y enzimas	19
5. DIMETILSULFURO (DMS): FORMACIÓN, METABOLISMO Y FUNCIÓN ECOLÓGICA	19
5.1. Formación de DMS a partir de dimetilsulfoniopropionato (DMSP)	19
5.1.1. Catabolismo del DMSP	21
5.1.1.1. Ruta de desmetilación del DMSP	21
5.1.1.2. Ruta de rotura del DMSP	23
5.2. Rutas de formación de DMS independientes de DMSP	26
5.3. Metabolismo del DMS	27
5.4. Papel ecológico del DMS	27
II. OBJETIVOS	31

III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. MICROORGANISMOS	37
1.1. Cepas utilizadas en la clasificación taxonómica	37
1.2. Cepas utilizadas en el estudio del EPS	37
1.3. Cepas utilizadas en el estudio de la producción de DMS	38
2. MEDIOS DE CULTIVO	40
2.1. Preparación de los medios de cultivo	41
2.2. Suplementos de los medios de cultivo	41
3. CULTIVO DE MICROORGANISMOS	42
3.1. Mantenimiento y conservación de cepas	42
4. PLÁSMIDOS, VECTORES Y CÓSMIDOS	43
5. CEBADORES	44
6. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	46
6.1. Tinción negativa	46
6.2. Criofijación a alta presión y Criosustitución (HPF-FS)	46
6.3. Cortes ultrafinos	47
6.4. Tinción con tetraóxido de rutenio	47
6.5. Inmunomarcaje de la proteína	48
7. TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS	49
7.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	49
7.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	49
8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	50
9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO G+C	50
10. HIBRIDACIÓN DNA-DNA (DDH)	51
11. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS CELULARES	51
12. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS POLARES	51
12.1. Extracción de lípidos polares	51
12.2. Cromatografía en capa fina bidimensional	52
13. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	52
13.1. Morfología	52

13.2. Motilidad	53
13.3. Producción de pigmentos	53
13.4. Pruebas bioquímicas	53
14. OBTENCIÓN DEL EPS	53
15. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EPS	54
15.1. Determinación de carbohidratos totales	54
15.2. Análisis de azúcares neutros	54
15.3. Análisis elemental	54
15.4. Determinación del Peso Molecular	55
15.5. Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR)	55
15.6. Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{H-NMR}$)	55
15.7. Determinación de ácidos urónicos	56
15.8. Determinación de proteínas totales	56
15.9. Análisis de aminoácidos	56
15.10. Determinación del contenido de DNA	57
16. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DEL EPS	57
16.1. Determinación del peso seco del EPS	57
16.2. Cuantificación de los carbohidratos totales del EPS	57
17. CARACTERIZACIÓN	58
17.1. Análisis	58
17.2. Reología	58
17.3. Potencial	58
18. MUTAGÉNESIS PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS NO PRODUCTORAS DE EPS	58
18.1. Mutagénesis por luz ultravioleta	58
18.2. Mutagénesis por transposición	59
18.3. Tinciones de cápsula para comprobación de mutantes	59
19. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	59
19.1. Extracción de DNA genómico	59

19.2. Amplificación de DNA	60
19.3. Purificación de fragmentos de DNA	60
19.4. Extracción de DNA plasmídico	61
19.4.1. Mini-preparaciones de DNA plasmídico mediante lisis alcalina y purificación fenol:cloroformo	61
19.4.2. Midi-preparaciones de DNA plasmídico utilizando columnas Qiagen	61
19.5. Secuenciación de DNA	61
19.5.1. Secuenciación de DNA plasmídico	61
19.5.2. Secuenciación del genoma	62
20. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS	62
20.1. Digestión con enzimas de restricción	62
20.2. Desfosforilación de vectores linearizados	62
20.3. Ligación de fragmentos de DNA	63
21. SISTEMAS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO	63
21.1. Transformación	63
21.2. Electroporación	63
21.3. Conjugación triparental	64
21.3.1. Conjugación triparental en soporte de filtro o <i>filter cross</i>	64
21.3.2. Conjugación triparental por estría cruzada o <i>patch cross</i>	64
22. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE AZUFRE (VOSCs) Y DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)	64
23. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE DIMETILSULFURO (DMS) Y METANOTIOL (MeSH)	65
24. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE DMSP	66
25. CONSTRUCCIÓN DE LA LIBRERÍA GENÓMICA	66
25.1. Preparación del vector pLAFR3	66
25.2. Preparación del DNA genómico	67
25.3. Reacción de ligación	67
25.4. Empaquetamiento	67
25.5. Amplificación y conservación de la librería genómica	67
25.6. Comprobación de la librería genómica	68

26. MUTAGÉNESIS DEL GEN	68
26.1. Mutagénesis del cósmido pBIO2219	68
26.2. Intercambio de marcadores	69
27. MUTAGÉNESIS DEL GEN <i>megL</i>	69
28. SOUTHERN BLOT	69
28.1. Marcaje de la sonda	69
28.2. Preparación del DNA genómico	70
28.3. Transferencia del DNA	70
28.4. Hibridación de la sonda	70
28.5. Detección	71
29. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD GFP	71
30. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA	71
31. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA	72
32. SÍNTESIS DE QUÍMICOS	73
33. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	73
33.1. Diseño de cebadores	73
33.2. Análisis de secuencias de DNA plasmídico	73
33.3. Análisis de la secuencia de los genes 16S rRNA y <i>rpoD</i>	73
33.4. Análisis del genoma	74
33.5. Alineamiento de secuencias proteicas e identificación de dominios conservados	74
33.6. Análisis filogenético de la proteína	74
33.7. Análisis de la abundancia de en diversos metagenomas	75
33.8. Análisis de la expresión del gen de <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142, <i>B.diazoefficiens</i> USDA 110 y <i>M.tuberculosis</i> H37Rv	78
33.9. Análisis de la estructura y localización de la proteína <i>in silico</i> o mediante simulación computacional	78

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	83
1.1. Análisis de la secuencias de los genes 16S rRNA y <i>rpoD</i>	83
1.2. Determinación del contenido G+C	88
1.3. Hibridación DNA-DNA	88
1.4. Ácidos grasos celulares	88
1.5. Lípidos polares	89
1.6. Caracterización fenotípica	90
1.6.1. Morfología	90
1.6.2. Motilidad	91
1.6.3. Producción de pigmentos	91
1.6.4. Pruebas bioquímicas	92
1.6.5. Influencia de la temperatura, pH y salinidad en el crecimiento	92
1.7. Otras características	95
1.7.1. Crecimiento en anaerobiosis	95
1.7.2. Sensibilidad a antibióticos	95
1.7.3. Curva de crecimiento a diferentes temperaturas	97
1.7.4. Capacidad	98
1.8. DISCUSIÓN del capítulo de Clasificación Taxonómica	98
2. EXOPOLISACÁRIDO	103
2.1. Análisis por MET del material extracelular producido por bacterias antárticas adaptadas al frío	103
2.2. Obtención del exopolisacárido	105
2.3. Caracterización química del EPS	105
2.3.1. Determinación de carbohidratos totales	105
2.3.2. Análisis de azúcares neutros	105
2.3.3. Análisis elemental	105
2.3.4. Determinación del Peso Molecular	105
2.3.5. Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR)	106
2.3.6. Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹ H-NMR)	107
2.3.7. Determinación de ácidos urónicos	107

2.3.8.	Determinación de proteínas totales	108
2.3.9.	Análisis de aminoácidos	108
2.3.10.	Determinación del contenido de DNA	108
2.4.	Métodos de cuantificación del EPS	108
2.4.1.	Determinación del peso seco	109
2.4.2.	Cuantificación de carbohidratos totales	109
2.5.	Estudio	109
2.5.1.	Estudio	110
2.5.2.	Estudio	111
2.5.3.	Estudio	113
2.5.4.	Caracterización	113
2.5.4.1.	Análisis	113
2.5.4.2.	Reología	113
2.5.4.3.	Potencial	114
2.5.4.4.	Estudio	114
2.6.	Mutantes no productores de EPS	116
2.6.1.	Fenotipo de los mutantes no productores de EPS	116
2.6.2.	Estudios de crecimiento de la cepa salvaje y de las cepas mutantes no productoras de EPS	118
2.7.	Estudio	119
2.7.1.	Ensayos	119
2.7.2.	Ensayos	120
2.8.	Estudio	122
2.9.	DISCUSIÓN del capítulo del EPS	122
3.	PRODUCCIÓN DE DIMETILSULFURO (DMS)	129
3.1.	Identificación de VOSCs sintetizados por	129

3.2. Uso de diversos compuestos como únicas fuentes de carbono por	129
3.3. Uso de diversos compuestos como únicas fuentes de azufre por	130
3.4. Producción y consumo de DMSP	131
3.5. Producción de DMS y MeSH	131
3.6. Construcción del mutante <i>megL⁻</i> (J565)	133
3.7. Cribado de la librería genómica	133
3.8. Construcción del mutante <i>^</i> (J566)	134
3.9. Estudio por MET de la estructura de <i>^</i> en relación a la producción de DMS	135
3.10. Caracterización de la proteína	142
3.10.1. Actividad <i>in vitro</i> de	144
3.10.2. Estructura y localización de la proteína	144
3.10.2.1. Análisis bioinformáticos	144
3.10.2.2. Fraccionamiento celular	146
3.10.2.3. Fusiones traduccionales <i>::GFP</i> y <i>::PhoA</i>	146
3.10.2.4. MET e Inmunomarcage con oro coloidal de la proteína	147
3.11. Distribución taxonómica de	149
3.12. Funcionalidad de las proteínas homólogas a	151
3.13. Distribución ambiental del gen	152
3.14. Sintenia del gen	153
3.15. Inducción de la actividad <i>^</i> en	156
3.16. Ensayos de actividad β -galactosidasa para estudiar la transcripción del gen	156
3.17. Estudios de crecimiento de la cepa <i>^</i> salvaje y la cepa mutante <i>^</i> (J566)	157
3.17.1. Temperatura	157
3.17.2. Salinidad	158
3.17.3. Inductores potenciales de la producción de DMS	159
3.17.4. Estrés oxidativo	159

3.18. Producción de DMSO por	(J566)	160
3.19. DISCUSIÓN del capítulo de producción de dimetilsulfuro (DMS) por		163
V. CONCLUSIONES		169
VI. BIBLIOGRAFÍA		173
VII. PUBLICACIONES		193

ABREVIATURAS

AdoMet: S-adenosil-L-metionina

ADP: Adenosina-5'-difosfato

AFP: Proteínas anticongelantes o *Antifreeze proteins*

AMP: Adenosina-5'-monofosfato

amp: Ampicilina

ANI: Media de identidad de nucleótidos o *Average nucleotide identity*

ATP: Adenosina-5'-trifosfato

BS: Intensidad de luz en reflexión o *Backscattering*

BSA: Albúmina de suero bovino

Caps: Proteínas de aclimatación al frío o *Cold-acclimation proteins*

CAR/PDMS: Carboxeno/polidimetilsiloxano

CCN: Núcleos de condensación de nubes

cm: cloranfenicol

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Csps: Proteínas de choque térmico por frío o *Cold-shock proteins*

DDH: Hibridación DNA-DNA

DL: Difractometría Láser

DMS: Dimetilsulfuro

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSP: Dimetilsulfoniopropionato

DNA o ADN: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidad óptica

DPG: Difosfatidilglicerol

EPSs: Exopolisacáridos

FAD: Flavina adenina dinucleótido

FT-IR: Espectroscopía de Infrarrojo Transformada de Fourier

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

gm: gentamicina

GOS: Global Ocean Sampling

3HP: 3-hidroxipropionato

HPF-FS: Criofijación a alta presión y Criosustitución o *High pressure freezing – Freeze substitution*

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución o *High performance liquid chromatography*

¹H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Protón

Hsps: Proteínas de choque térmico por calor o *Heat-shock proteins*

ICR-FT-MS: Resonancia ciclométrica de iones por transformada de Fourier acoplada a espectrometría de masas o *Fourier transform ion cyclotron resonance – mass spectrometry*.

IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

kan: Kanamicina

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

LPS: Lipopolisacárido

MeSH: Metanotiol

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

MMPA: Metil mercaptopropionato

MLSA: Análisis de secuencia multi-locus o *Multi-locus sequence analysis*

MPA: Mercaptopropionato

M_r : Peso Molecular

MSA: Ácido metasulfónico

MTA-CoA: Metiltioacrilil-CoA

NAD(P)⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)

o/n: overnight

ONPG: O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

ORFs: Pautas abiertas de lectura u *Open reading frames*

PBS: Tampón fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Fosfatidiletanolamina

PG: Fosfatidilglicerol

pNPP: p-Nitrofenil fosfato

PZ: Potencial zeta

R: resistente

RAST: Rapid Annotation using Subsystems Technology

rif: rifampicina

RNA o ARN: Ácido ribonucleico

SBF: Suero Bovino Fetal

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SEC: Cromatografía de Exclusión por Tamaño o *Size exclusion chromatography*

spec: Espectinomicina

SPME: Microextracción en fase sólida o *Solid-phase microextraction*

str: Estreptomicina

TEMED: n,n,n',n'-tetrametiletilenodiamina

tet: Tetraciclina

5-THF: 5-metil-tetrahidrofolato

TGH: Transferencia genética horizontal

TLC: Cromatografía en capa fina o *Thin layer chromatography*

TSA: Medio de cultivo Triptone Soya Agar

TSB: Medio de cultivo Triptone Soya Broth

VMEs: Vesículas de Membrana Externa

VOSCs: Compuestos orgánicos volátiles de azufre

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA ANTÁRTIDA

La Antártida es el continente más frío y más seco de la Tierra, representando un área clave para la ciencia global. La investigación llevada a cabo en este ambiente extremo ha recibido una atención internacional creciente en los últimos años debido a la preocupación sobre la destrucción de la capa de ozono sobre ella, los problemas del calentamiento global y el aumento del nivel del mar. Los datos recogidos en la Antártida proporcionan información sobre un amplio rango de campos científicos. Por ejemplo, la Antártida es un registro del clima global ya que forma parte del supercontinente de Gondwana y sus rocas son un reflejo de la histórica geográfica de la Tierra (Figura 1). También, sus cielos generalmente despejados permiten a los astrónomos estudiar los confines del Universo (Walton, 2013). Además, debido a sus condiciones climáticas extremas, la Antártida supone un buen lugar para estudiar la evolución y adaptación de los organismos a ambientes adversos. A pesar de las bajas temperaturas, la falta de agua líquida en la tierra, los efectos del hielo marino y las temperaturas cercanas a la congelación en el mar, los organismos antárticos han desarrollado mecanismos no tan sólo para sobrevivir, sino también para evolucionar y prosperar en estas condiciones ambientales extremas (Convey y col., 2013). Su historia evolutiva atípica, desde el supercontinente de Gondwana a lo que es hoy en día, junto a un clima que ha sido frío durante al menos 25 millones de años, proporcionan algunas de las características únicas que han condicionado la biodiversidad antártica. De la misma manera, las adaptaciones que han desarrollado las plantas, los animales y los microbios, pueden aportar ideas importantes sobre la fisiología y la bioquímica de los organismos (Convey y col., 2013). Asimismo, la amplia biodiversidad de plantas, animales y microorganismos existente en la Antártida, también ha sido un objeto de estudio importante por parte de la comunidad científica, especialmente en el campo de la astrobiología, que requiere de investigaciones en las regiones polares congeladas de la Tierra como hábitats análogos para posibles formas de vida en otros planetas. Además, la Industria de distintos sectores ha mostrado interés en los estudios antárticos como fuente de nuevos enzimas y materiales poliméricos con nuevas funciones y aplicaciones (Antranikian y col., 2005; Deming, 2002; Nicolaus y col., 2010; Poli y col., 2010; Walton, 2013).

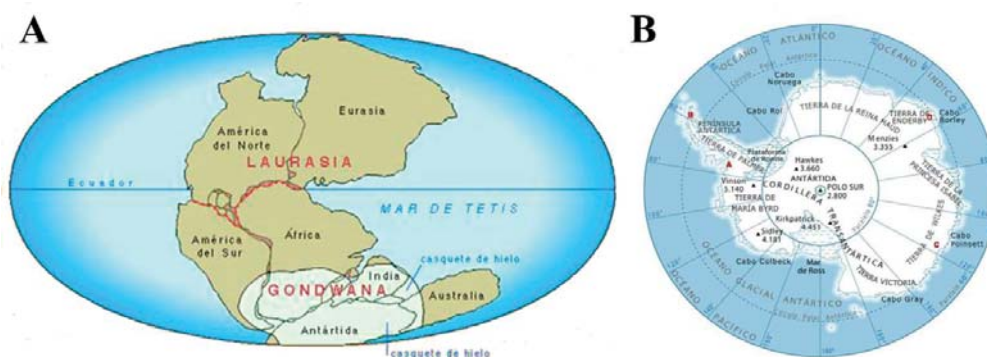


Figura 1. Situación de la Antártida en el supercontinente de Gondwana (A) y mapa actual (B). Fuentes: Docentes Navarra. La Tierra (Internet). Acceso: 21 Julio 2014. Disponible en: <http://docentes.educacion.navarra.es/metayosa/1bach/Tierra5.html> y Sánchez, S. La variación de la masa de hielo en la Antártida (Internet). Acceso: 21 Julio 2014. Disponible en: <http://cambioclimaticoenergia.blogspot.com.es/2010/05/la-variacion-de-la-masa-de-hielo-en-la.html>

A pesar de que los hábitats marinos ártico y antártico presentan unas bajas temperaturas (agua del mar y sedimentos cerca de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$, hielo marino hasta $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en invierno y lagos y glaciares por debajo de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$), (Deming, 2002), la biodiversidad de estos ambientes es remarcable, principalmente de bacterias, hongos (en particular levaduras) y microalgas. Las bacterias marinas psicrófilas y psicrotolerantes que se han descrito con más frecuencia son bacterias Gram negativas pertenecientes a las clases α -proteobacteria (*Octadecabacter*) β -proteobacteria (*Polaromonas*), γ -proteobacteria (*Colwellia*, *Glacieola*, *Marinobacter*, *Moritella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Shewanella*, *Vibrio*), δ -proteobacteria (*Desulfuromonas*, *Desulfofrigus*, *Desulfofaba*, *Desulfotalea*) y el phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (*Polaribacter*, *Psychroflexus*). Por su parte, las bacterias Gram positivas más frecuentes son corineformes, *Arthrobacter* sp. y *Micrococcus* sp. En general, el número y diversidad de bacterias son superiores a los de las arqueas, aunque en algunas áreas como las aguas marinas profundas se encuentran en un número equivalente, siendo los géneros *Methanogenium* y *Methanococcus* las arqueas que se han descrito con mayor frecuencia. También se han descrito cianobacterias de los géneros *Oscillatoria*, *Phormidium* y *Nostoc* como géneros dominantes en la mayoría de los hábitats de la Antártida (D'Amico y col., 2006; Deming, 2002; Vishniac & Klinger, 1986). Asimismo, es común encontrar levaduras psicrófilas, especialmente del género *Cryptococcus*, en muestras de

suelo e incluso algunos investigadores las han definido como la forma de vida más importante en los suelos desérticos de la Antártida (D'Amico y col., 2006; Deming, 2002; Vishniac & Klinger, 1986).

Desde 1959, gracias a la firma del Tratado Antártico, la Antártida está gobernada por un coalición internacional compuesta de 31 países miembros de pleno derecho y 6 países asociados, y toda actividad científica que se realiza en ella está regulada por el Comité Científico de Investigación Antártica (*Scientific Committee on Antarctic Research*, SCAR).

A partir del año 1985, el Profesor Jesús Guinea Sánchez, Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, inició una línea de investigación de Taxonomía bacteriana centrada en el aislamiento y clasificación de nuevos microorganismos de origen antártico. Los trabajos se desarrollaron a partir de muestras de sedimentos, aguas y lodos procedentes de distintos lugares de la Antártida, principalmente de las Islas Shetland del Sur y de puntos circundantes de la Península Antártica que fueron amablemente suministradas por la Dra. Josefina Castellví. Desde entonces el grupo, ahora dirigido por la Dra. Elena Mercadé, ha identificado numerosos microorganismos y caracterizado los materiales extracelulares que producen. Entre los nuevos aislamientos se encuentran *Pseudoalteromonas antarctica* (Bozal y col. 1997), *Cryptococcus victoriae* (Montes y col. 1999), *Shewanella livingstonensis* (Bozal y col. 2002), *Psychrobacter luti* (Bozal y col. 2003), *Psychrobacter fozii* (Bozal y col. 2003), *Paenibacillus antarcticus* (Montes y col. 2004), *Pseudomonas guineae* (Bozal y col. 2007), *Marinobacter guineae* (Montes y col. 2008) y *Shewanella vesiculosa* (Bozal y col. 2009).

2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MICROORGANISMOS

La información taxonómica es esencial para los científicos para poder entender la biodiversidad y las relaciones entre organismos de diferentes ecosistemas (Gevers y col., 2005).

Debido a la evolución que está teniendo la Taxonomía de microorganismos, el concepto de especie también evoluciona y es objeto de controversia, pero actualmente se acepta como definición de especie bacteriana aquel grupo monofilético de organismos que muestran

suficiente grado de coherencia tanto genética como fenotípica como para aislarse de forma separada de sus semejantes (Roselló-Móra, 2009).

La taxonomía bacteriana se inició a finales del s. XIX con la clasificación de los microorganismos en base a marcadores fenotípicos. La taxonomía numérica mejoró la identificación fenotípica aumentando el número de ensayos realizados y calculando los coeficientes de similitudes fenéticas entre cepas y especies, pero proporcionaba poca información sobre las relaciones filogenéticas entre procariotas. Por este motivo se empezaron a utilizar métodos quimiotaxonómicos y genotípicos para una clasificación más precisa y desde entonces el campo de la taxonomía ha experimentado un crecimiento explosivo con la descripción de cientos de nuevos géneros y miles de nuevas especies (Schleifer, 2009). Así pues, la clasificación actual de bacterias y arqueas se basa en un modelo operacional, llamado taxonomía polifásica que comprende características fenotípicas, quimiotaxonómicas, genotípicas así como información filogenética (Roselló-Móra, 2009; Tindall y col., 2010; Schleifer, 2009).

2.1. Clasificación taxonómica polifásica

Como se ha comentado, el modelo actual empleado para la clasificación de microorganismos es la taxonomía polifásica. De acuerdo a este modelo, para el reconocimiento de nuevos taxones bacterianos es totalmente imprescindible analizar la secuencia del gen 16S rRNA, ya que cumple todos los requisitos para ser un marcador molecular útil: es ubicuo, funcionalmente constante, conservado y homólogo (Roselló-Móra, 2009; Tindall y col., 2010; Schleifer, 2009). Además es un marcador estable que está menos sujeto a fenómenos de transferencia genética horizontal (TGH), (Schleifer, 2009). Sin embargo, en algunos casos, el gen 16S rRNA presenta un bajo poder de resolución a nivel de especie y es recomendable analizar también genes que codifican para proteínas conservadas, como el *rpoD* que codifica para el factor sigma RpoD de la RNA polimerasa, el *gyrB* que codifica para la subunidad beta de la DNA girasa y otros (Roselló-Móra, 2009; Tindall y col., 2010). Un planteamiento que está resultando útil en la taxonomía bacteriana es el análisis de secuencia multi-locus (*Multi-Locus Sequence Analysis*, MLSA), que consiste en secuenciar varios genes esenciales conservados y analizarlos como conjunto de datos individuales o como secuencias

combinadas concatenadas proporcionando una mayor resolución que las secuencias del gen 16S rRNA solo (Roselló-Móra, 2009; Tindall y col., 2010; Schleifer, 2009).

Los análisis MLSA deben complementarse con la determinación del contenido G+C del genoma de los microorganismos de estudio así como con métodos de hibridación DNA-DNA (DDH) con los microorganismos más relacionados filogenéticamente, especialmente en aquellos casos en los que la secuencia del 16S rRNA muestra un valor de similitud >97% (Tindall y col., 2010).

Para llevar a cabo la clasificación taxonómica polifásica es fundamental completar los análisis genéticos con estudios fenotípicos (Roselló-Móra, 2009; Schleifer, 2009; Tindall y col. 2010). Entre los parámetros que se recomiendan estudiar en la caracterización fenotípica de microorganismos se encuentran: la morfología y forma celular y colonial, test de pH y temperatura óptimos, motilidad, perfil de tinción Gram, formación de esporas y producción de pigmentos. Los estudios morfológicos se deben complementar con ensayos bioquímicos, para los cuales se pueden utilizar galerías bioquímicas como API (Biomérieux) o Biolog (Biolog Inc.) además de otras pruebas independientes (Tindall y col. 2010).

Por su parte, la quimiotaxonomía se centra en el estudio de varios elementos estructurales de las células incluyendo las capas externas de mismas (peptidoglicano, ácidos teicoicos, ácidos micólicos, etc.), la membrana celular (ácidos grasos, lípidos polares, lipoquinonas respiratorias, etc.) o constituyentes del citoplasma (poliaminas), (Schleifer, 2009; Tindall y col. 2010).

Asimismo, es muy importante siempre que se pueda incluir en el estudio polifásico las cepas tipo más relacionadas filogenéticamente con el aislamiento a clasificar para su comparación, en vez de utilizar los datos publicados en la bibliografía (Roselló-Móra, 2009; Tindall y col. 2010). También es altamente recomendable utilizar en el estudio más de un aislamiento para poder determinar qué características son variables y cuáles son estables dentro de una misma especie y así valorar la variabilidad intraespecífica (Roselló-Móra, 2009).

2.2. Futuras direcciones en la Clasificación Taxonómica de Microorganismos

En el modelo actual de taxonomía polifásica los análisis filogenéticos basados en la secuencia del gen 16S rRNA son el primer paso rutinario en la identificación de nuevas especies (Chun & Rainey, 2014; Roselló-Móra, 2009; Tindall y col., 2010; Schleifer, 2009). Los estudios de este marcador molecular se suelen complementar con el análisis DDH, especialmente cuando dos cepas presentan una similitud del 16S rRNA >97% (Tindall y col., 2010). El análisis DDH es un método experimental para medir el grado de relación entre dos genomas aplicando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (Tindall y col., 2010). Sin embargo, debido a su tedioso protocolo y el error experimental inherente de los experimentos DDH, ha habido una demanda continua de otras técnicas genotípicas (Stackebrandt y col., 2002). Se ha propuesto que la técnica DDH sea sustituida por la media en la identidad de nucleótidos (*Average Nucleotide Identity*, ANI) entre genes ortólogos entre dos genomas (Roselló-Móra, 2009; Schleifer, 2009) y se correlaciona bien con los valores de DDH (Chun & Rainey, 2014).

La secuenciación de nueva generación ha proporcionado una manera rápida y económicamente efectiva de obtener secuencias de genomas completos de cepas microbianas que ya se podría aplicar a la taxonomía de bacterias y arqueas para comparar genomas completos o elegir tantos genes como se quiera para su análisis (Chun & Rainey, 2014). Sin embargo, algunos autores han indicado algunos inconvenientes para utilizar las secuencias de genomas completos con fines taxonómicos. Aunque actualmente hay alrededor de 12.000 secuencias de arqueas y bacterias disponibles para su comparación, tan solo 1.725 son especies tipo, limitando el uso de los datos genómicos en estudios taxonómicos comparativos teniendo en cuenta que hay cerca de 11.000 especies tipo (Chun & Rainey, 2014). Otros autores como Ricker y col. (2012) han cuestionado la calidad de las secuencias genómicas disponibles en las bases de datos públicas, que pueden estar depositadas como secuencias completas o como un borrador de secuencias ensambladas, *scaffolds* o *contigs*. Así pues, ya que los borradores de genomas podrían ser menos informativos que los genomas completos para propósitos taxonómicos, existe la necesidad de definir unos criterios mínimos de calidad de secuenciación de los genomas para poder incluirlos en los análisis taxonómicos (Klassen & Currie, 2012).

Por tanto, aunque el criterio general es que los datos provenientes de la secuenciación de genomas completos deben ser incluidos entre los criterios taxonómicos para clasificar un nuevo taxón bacteriano junto con los parámetros fenotípicos y quimiotaxonómicos, actualmente no existe un consenso sobre cómo estos datos deben integrarse en la clasificación taxonómica de procariontes (Chun & Rainey, 2014; Ramasamy y col., 2014).

En cuanto a los parámetros fenotípicos, se ha propuesto que en un futuro se lleven a cabo estudios de metabolómica basados en espectrometría de alta resolución (Resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier acoplada a espectrometría de masas, *Fourier Transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry*, ICR-FT-MS) para detectar los metabolitos de bajo peso molecular (50-1.000 Da) de un microorganismo y técnicas como Maldit-Tof para observar la diversidad de moléculas de alto peso molecular (2-20 kDa), generando así bases de datos fundamentadas en perfiles moleculares que permitirán la comparación de múltiples microorganismos (Ramasamy y col., 2014; Roselló-Móra, 2009).

3. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN AL FRÍO

Aproximadamente, el 80% de la Tierra son ambientes fríos como las aguas profundas, las regiones polares y la alta montaña. Además, muchas zonas del planeta llegan a temperaturas en torno a los 5 °C durante el invierno (Yumoto & Yamazaki, 2013).

Los microorganismos adaptados al frío pueden dividirse en dos grupos: psicófilos y psicrotolerantes (Morita, 1975). Se denominan bacterias psicófilas a aquellas cuyas temperaturas mínima, óptima y máxima están a o por debajo de 0, 15 y 20 °C respectivamente y se distribuyen en ambientes permanentemente fríos. En cambio, se denominan microorganismos psicrotolerantes a aquellos que presentan temperaturas de crecimiento óptimas y máximas más altas y se encuentran tanto en ambientes permanentemente fríos como en regiones subárticas y zonas templadas (Yumoto & Yamazaki, 2013).

La habilidad de los microorganismos adaptados al frío para sobrevivir y proliferar a bajas temperaturas implica que han vencido barreras clave inherentes a los ambientes extremadamente fríos desde las aguas profundas hasta las montañas y regiones polares. Estos retos incluyen: una actividad enzimática reducida; disminución de la fluidez de membrana;

transporte alterado de nutrientes y productos de desecho; tasas de transcripción, traducción y división celular reducidas; desnaturalización fría de proteínas, plegamiento de proteínas incorrecto y formación de hielo intracelular (D'Amico y col., 2006).

El límite de temperatura inferior para la vida parece estar entorno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, que es la temperatura a la que las bacterias viven en el suelo permagel y el hielo marino (D'Amico y col., 2006). La actividad microbiana a estas temperaturas se restringe a pequeñas áreas de agua no congelada dentro del suelo permagel congelado o del hielo, o bien a los canales de salmuera. Estos hábitats contienen grandes concentraciones de sales, sustancias extrapoliméricas y/o materia particulada, y el flujo de fluidos se mantiene por gradientes de temperatura y congelación. Otros factores como la presión osmótica e hidrostática, la radiación solar, terrestre y cósmica, el estrés oxidativo y la disponibilidad de nutrientes también afectan de manera importante a las condiciones de vida de estos microorganismos. Consecuentemente, la adaptación al frío normalmente se combina con otras adaptaciones (D'Amico y col., 2006).

Las bajas temperaturas comportan que las bacterias psicofílicas y psicotolerantes tengan que hacer frente a la baja energía térmica y el aumento de la viscosidad del agua, los cuales conllevan a un flujo metabólico lento. Para superar con éxito estos retos, los microorganismos han desarrollado mecanismos específicos de adaptación al frío como por ejemplo el aumento de la fluidez de las membranas, respuestas frente al choque térmico por frío o por calor, desarrollo de enzimas adaptados al frío y síntesis de proteínas anticongelantes (*Antifreeze Proteins*, AFPs) y crioprotectores (D'Amico y col., 2006).

3.1. Aumento de la fluidez de las membranas

La biomembrana es una matriz lipídica anfipática que comprende una bicapa asociada de forma estable con varios compuestos hidrofóbicos incluyendo proteínas. Los ácidos grasos son un constituyente hidrofóbico importante de varios lípidos de membrana, los cuales incluyen lípidos polares (principalmente glicerofosfolípidos y gliceroglicolípidos) así como esfingolípidos en algunos organismos. La composición de ácidos grasos de estos lípidos pueden alterar enormemente las propiedades de la membrana modificando la fluidez y las funciones biológicas, así como la permeabilidad a solutos y la captación de nutrientes, lo cual

influirá consecuentemente en la motilidad, presión osmótica y la producción de energía que dependen del gradiente electroquímico transmembrana (Taha y col., 2013).

La modulación de la composición de la membrana lipídica en respuesta a cambios en la temperatura ambiental se denomina adaptación homeoviscosa (Sinensky, 1974). La adaptación homeoviscosa permite a los microorganismos lidiar tanto con las bajas como las altas temperaturas manteniendo la fluidez de la membrana celular. Este proceso es importante porque está relacionado directamente con la estructura y función de la membrana y por tanto con la supervivencia de los microorganismos adaptados al frío (psicrófilos y psicotolerantes). Los microorganismos llevan a cabo la adaptación homeoviscosa a las bajas temperaturas mediante una o varias de las siguientes estrategias para modificar la estructura o composición lipídica: aumento de la insaturación de las cadenas acilo de los ácidos grasos; aumento de las ramificaciones con grupos metilo; incremento de la relación entre las ramificaciones anteiso e iso; disminución de la longitud de cadena y disminución de la proporción esterol:fosfolípido. Además de estos parámetros, los cambios en la proporción carotenoides polares y no polares y cambios de composición en la clase de lípidos de la membrana (composición de los grupos polares) también pueden afectar a la fluidez de la membrana en bacterias psicrófilas y psicotolerantes (Taha y col., 2013).

3.2. Metabolismo energético

Gestionar la energía bioquímica es un reto al que los microorganismos tienen que hacer frente para mantener su actividad a bajas temperaturas, a las cuales los procesos metabólicos se alteran debido a la disminución de la ratio de las reacciones y el aumento de la rigidez de las estructuras celulares, principalmente enzimas y membranas. Frente a esto, los microorganismos adaptados al frío aumentan la concentración de compuestos adenilados (nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato), NAD(P)^+ ; flavina adenina dinucleótido, FAD, adenosina-5'-monofosfato, AMP; adenosina-5'-difosfato, ADP; adenosina-5'-trifosfato, ATP), los cuales son moléculas clave en el metabolismo energético. Esto se consigue mediante la regulación del metabolismo a múltiples niveles con el objetivo de ahorrar energía: aumento del metabolismo del adenilato orientado hacia la producción y regeneración de AMP y su fosforilación, represión de la destrucción de AMP, aumento de la tasa de respiración, intervención de enzimas específicos que permiten la síntesis rápida de ATP como las

polifosfatasas o las interferasas, cambios en la utilización de sustratos y re-direccionamiento de las vías metabólicas centrales (Amato, 2013).

3.3. Transcripción y traducción

Algunos de los principales inconvenientes para la síntesis de proteínas a bajas temperaturas son una actividad reducida de los enzimas que intervienen en la transcripción y la traducción, una disminución del plegamiento de proteínas, debida principalmente a una disminución de la tasa de isomerización prolil, y la estabilización de las estructuras secundarias de DNA y RNA. Los enzimas de las bacterias adaptadas al frío implicados en estos procesos, han evolucionado hasta conseguir una actividad óptima a bajas temperaturas. Por ejemplo, la RNA polimerasa, el factor de elongación y la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa retienen actividad cerca de los 0 °C en varios microorganismos psicófilos. De hecho, el último enzima citado cataliza las isomerizaciones *cis-trans* prolil y su elevada actividad y sobreexpresión a bajas temperaturas podría ser importante para el mantenimiento de las tasas de plegamiento de proteínas a bajas temperaturas (D'Amico y col., 2006). Además, las proteínas de unión a ácidos nucleicos y las helicasas RNA también se sobreexpresan en los psicrófilos a bajas temperaturas, lo cual podría ser importante para la desestabilización de las estructuras secundarias de DNA y RNA, (Berger y col., 1996; Lim y col., 2000).

3.4. Catálisis y plegamiento de proteínas

Los enzimas catalizan la mayoría de las reacciones químicas de los organismos y su eficiencia depende de varios parámetros, siendo la temperatura el más importante de acuerdo a la ecuación de Arrhenius (Arrhenius, 1889). Esta ecuación se escribe como $\ln k/dt = E_a / RT^2$ y si se integra asumiendo que E_a es constante en un rango limitado de temperatura, quedaría como $k = Ae^{-E_a/RT}$, donde k es el coeficiente o constante de la ratio; A es el término pre-exponencial o factor de frecuencia, el cual depende ligeramente de la temperatura y a partir del cual se puede deducir la entropía de activación de la reacción; R es la constante de gas ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) y T es la temperatura en grados Kelvin. Así pues, la tasa de una reacción depende exponencialmente tanto de la energía de activación, E_a , la cual es la energía de una fracción de moléculas que posee energía suficiente para reaccionar, y de la temperatura. Esta gran dependencia térmica sugiere que los microorganismos que viven en hábitats permanentemente fríos han tenido que desarrollar adaptaciones para mantener tasas de

reacción en niveles compatibles con la vida. Así pues, en los microorganismos adaptados al frío la supervivencia está subordinada a una disminución de la energía de activación para poder conseguir tasas de reacción apropiadas para las bajas temperaturas (Gerday, 2013).

Si se compara la actividad de los enzimas adaptados al frío con la de sus homólogos mesófilos, se observa que el punto óptimo de actividad está desplazado hacia las bajas temperaturas, su actividad específica es mucho más elevada y presentan una mayor sensibilidad térmica (Feller & Gerday, 2003; Gerday 2013), (Figura 2). Estas propiedades caracterizan a todos los enzimas adaptados al frío, aunque la amplitud de las diferencias varía de acuerdo al origen y tipo de enzima (Gerday, 2013).

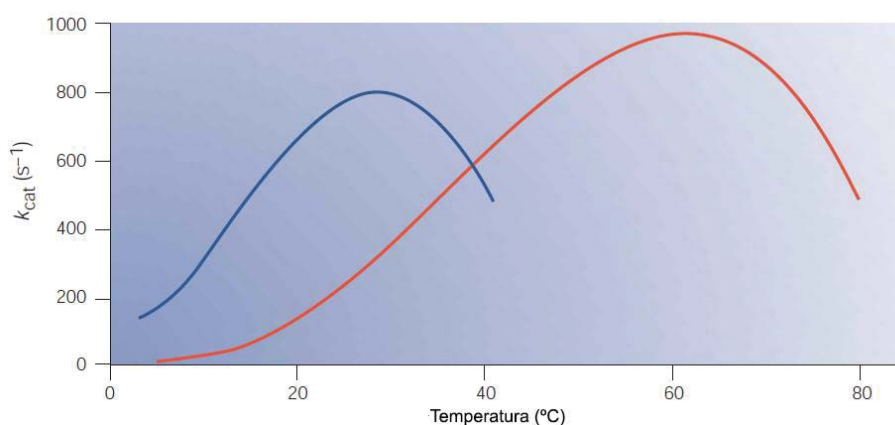


Figura 2. Actividad enzimática dependiente de la temperatura. Los enzimas psicófilos (**azul**) son hasta diez veces más activos a temperaturas bajas y moderadas (hasta 20-30 °C) que sus homólogos mesófilos (**rojo**). Esta elevada actividad compensa la inhibición de las tasas de reacción causada por el frío. Sin embargo, la actividad de los enzimas adaptados al frío también es sensible al calor a juzgar por el desplazamiento hacia debajo de su temperatura óptima de actividad aparente (parte alta de la curva). Fuente: Feller & Gerday (2003).

Así pues, los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes han desarrollado enzimas adaptados al frío que tienen una elevada actividad específica a bajas temperaturas y que hacen que presenten flujos metabólicos similares a sus homólogos mesófilos (Gerday, 2013). Los análisis de la estructura, propiedades catalíticas y la estabilidad térmica de un amplio número de enzimas adaptados al frío han demostrado que pequeños cambios en la secuencia aminoacídica confieren una elevada eficiencia catalítica a temperaturas bajas y moderadas.

Estos cambios se acompañan por una disminución significativa de la estabilización térmica y consecuentemente, un incremento importante de la flexibilidad de la estructura molecular que permite la acomodación del sustrato incluso a temperaturas inferiores al punto de congelación del agua (Gerday, 2013). Entre las modificaciones que llevan a cabo para aumentar la flexibilidad se encuentran la reducción del número de pares iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, disminución de las interacciones entre subunidades, aumento de la interacción con el solvente, una reducción de la fracción apolar en el núcleo, mayor accesibilidad al sitio activo, mayor exposición de los residuos apolares al solvente, disminución del número de co-factores unidos, agrupación de residuos de glicina y una disminución de los residuos de arginina y prolina (Feller & Gerday, 2003; Violot y col., 2005). Por otra parte, el proceso de plegamiento de proteínas, que en teoría tendría que ser difícil debido al gran aumento de la viscosidad, la baja energía residual en el sistema y el efecto depresivo de las bajas temperaturas, sobre todo en las interacciones hidrofóbicas, se lleva a cabo con éxito debido principalmente a la sobreexpresión de las peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas y del factor desencadenante o *trigger*, el cual es la única chaperona asociada con los ribosomas y la primera en entrar en contacto con la cadena polipeptídica naciente (Gerday, 2013).

3.5. Proteínas de choque térmico por frío o por calor

La exposición de los organismos a cambios repentinos de la temperatura, tanto subidas como bajadas, inducen la sobreexpresión transitoria de varias proteínas conocidas como proteínas de choque térmico por calor (*Heat-shock proteins*, Hsps), o proteínas de choque térmico por frío (*Cold-shock proteins*, Csps) respectivamente, las cuales están implicadas en varios procesos celulares como la transcripción, la traducción, el plegamiento de proteínas y la regulación de la fluidez de la membrana (Phadtare, 2004; Yoshimune y col., 2013). Aunque las temperaturas a las que se produce el *cold-shock* y el *heat-shock* en los microorganismos adaptados al frío son inferiores a las de los mesófilos, sus Hsps y Csps tienen funciones similares, tales como la unión a ácidos nucleicos, metabolismo energético, catabolismo y traducción y plegamiento de proteínas (D'Amico y col., 2006). En ambos casos se inducen proteínas de unión a ácidos nucleicos relacionadas con CspA y chaperonas como DnaK y GroEL, pero existen algunas diferencias en las respuestas *cold-shock* entre microorganismos adaptados al frío y mesófilos. Por ejemplo, en los primeros se induce la sobreexpresión de

chaperonas con actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa, las cuales permiten acelerar el plegamiento de las proteínas interconvirtiendo los isómeros *cis* y *trans* de los puentes prolina imídico peptídicos (Yoshimune y col., 2013). Otras diferencias en los microorganismos psicrófilos serían la falta de represión de los genes conservados de síntesis proteica y la presencia de proteínas de aclimatación al frío (*Cold-acclimation proteins*, Caps). Es más, muchas de las Csps descritas en mesófilos actúan como Caps en los microorganismos adaptados al frío y son expresadas constitutivamente a bajas temperaturas (D'Amico y col., 2006).

3.6. Proteínas anticongelantes y crioprotectores

Las proteínas anticongelantes (*Antifreeze proteins*, AFPs) son un grupo de proteínas diversas estructuralmente que se unen al hielo e inhiben su crecimiento disminuyendo el punto de congelación de la solución (actividad de histéresis térmica) o bien inhibiendo la recristalización de las partículas de hielo impidiendo así su crecimiento (Singh y col., 2014). Gracias a estos procesos, las membranas de los microorganismos adaptados al frío quedan protegidas del daño causado por la congelación aumentando así su tasa de supervivencia. Por otra parte, la inhibición de la recristalización mantendría las distancias entre las partículas de hielo en un glaciar creando una red de vetas líquidas que tenderían a acumular nutrientes (Singh y col., 2014).

Las AFPs se han descrito en bacterias, diatomeas, hongos, plantas, insectos y peces, todos ellos procedentes de lagos, hielo marino, núcleos de hielo y ambientes terrestres de las regiones polares, de las cuales solamente 26 se han aislado de bacterias (Singh y col., 2014).

Finalmente, el aislamiento y caracterización de nuevas AFPs ha despertado un creciente interés debido a sus potenciales aplicaciones en la industria médica para la criopreservación de órganos y sangre, en la industria alimentaria o también como inhibidores de la formación de tapones en tuberías de petróleo o gas (Singh y col., 2014).

Por otra parte, la trealosa y los exopolisacáridos también juegan un papel importante en la crioprotección de los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes. Se cree que la trealosa tiene un efecto co-ligativo, pero probablemente también intervenga en la prevención de la

desnaturalización y agregación de proteínas (Phadtare, 2004). Asimismo, se han encontrado grandes concentraciones de exopolisacáridos en bacterias árticas y antárticas (Krembs y col., 2002; Mancuso Nichols y col., 2005b) llevando a cabo diversas funciones que se describen a continuación entre las que se destaca su capacidad crioprotectora.

4. EXOPOLISACÁRIDOS (EPSs) BACTERIANOS

4.1. Composición y funciones de los EPSs bacterianos

Los exopolisacáridos (EPSs) son polímeros de elevado peso molecular que suponen un componente esencial (40-95%) de las sustancias poliméricas extracelulares que rodean a la mayoría de células microbianas de ambientes marinos y constituyen una amplia fracción del reservorio de carbono reducido de los océanos, además de aumentar la supervivencia de las bacterias marinas influenciando el ambiente físico-químico próximo a las células (Mancuso Nichols y col., 2005b, Poli y col. 2010).

Los EPSs pueden estar covalentemente unidos a la superficie celular (polisacáridos capsulares) o bien pueden estar débilmente unidos a ella o incluso encontrarse en el medio extracelular como una matriz amorfa (polisacáridos tipo limo), (Decho, 1990).

En cuanto a su composición, la mayoría de los EPSs producidos por bacterias marinas son heteropolisacáridos que contienen tres o cuatro monosacáridos diferentes que pueden ser pentosas, hexosas, amino azúcares o ácidos urónicos, organizados en grupos de diez o menos para formar unidades repetitivas. También pueden estar presentes sustituyentes orgánicos o inorgánicos, como grupos sulfato, fosfato, ácido acético, ácido succínico o ácido pirúvico (Decho, 1990; Mancuso Nichols y col., 2005b; Nicolaus y col., 2010; Poli y col. 2010; Rehm, 2009).

En la naturaleza, los EPSs bacterianos poseen varias funciones biológicas esenciales para la supervivencia de los microorganismos que los producen. Entre ellas cabe destacar que son esenciales en la adhesión celular a superficies u a otras células formando biopelículas o *biofilms* y facilitando la concentración de nutrientes (Decho, 1990). Además, los EPSs suponen un material de reserva de compuestos biodegradables debido a que adhieren diferentes tipos de materia orgánica disuelta (Decho y López, 1993). Asimismo, gracias a la

presencia de ácidos urónicos y de sustituyentes orgánicos e inorgánicos, los EPSs suelen presentar una carga neta negativa que les permite secuestrar metales pesados como el Pb^{2+} y Cu^{2+} , o metales traza como el Fe^{3+} , el cual es un factor limitante del crecimiento en ambientes oligotróficos (Mancuso Nichols y col., 2005b; Loaec y col., 1997, 1998; Wuertz y col., 2000). Por otra parte, la capacidad de estos polímeros para retener agua hace que los microorganismos que los sintetizan sean más resistentes a la desecación (Wingender y col., 1999). Asimismo, esta capa altamente hidratada que forman los EPSs alrededor de las células actúa como una barrera física contra cambios osmóticos que ocurran en el microambiente celular y las protege frente a los depredadores como los protozoos y sustancias tóxicas como antibióticos y enzimas hidrolíticas (Caron, 1987; Decho y López, 1993; Sutherland, 2001). Finalmente, a los EPSs también se les atribuye un papel crioprotector ya que inhiben la formación de cristales de hielo mediante la disminución de la temperatura de nucleación del agua (Junge, 2004; Krembs, 2002). Sin embargo, el papel concreto que desempeñan los EPSs dependerá del nicho ecológico y del hábitat natural de los microorganismos que los producen (Poli y col., 2010).

4.2. Aplicaciones biotecnológicas de los EPSs

Debido a la gran diversidad en su composición y propiedades físico-químicas, los EPSs han emergido como importantes materiales poliméricos industriales con la ventaja competitiva de tener una producción sostenible a partir de recursos naturales, además de ser biodegradables y biocompatibles (Freitas y col., 2011; Nicolaus y col., 2010; Rehm, 2009, 2010). De hecho, los EPSs bacterianos han sido ampliamente utilizados en aplicaciones de alto valor añadido como productos o procesos alimentarios, farmacéuticos, médicos y cosméticos, en los cuales actúan principalmente como espesantes, estabilizantes, emulsificantes, agentes de unión o texturizantes debido a su comportamiento no Newtoniano y a su elevada viscosidad en medio acuoso (Freitas y col., 2011; Krembs, 2002; Poli y col., 2010; Rehm, 2010).

La investigación más reciente consiste en emplear los EPSs para la creación de nuevas estructuras (micro- o nanoesferas, perlas poliméricas o cápsulas) que encapsulen compuestos bioactivos como antioxidantes, vitaminas, probióticos o prebióticos (Aguilera & Lillford, 2008). Asimismo, algunos polisacáridos poseen la capacidad de establecer interacciones intermoleculares físicas y químicas, resultando en una matriz polimérica cohesiva capaz de

formar una película o *film*. Las últimas investigaciones se han centrado en desarrollar matrices poliméricas con propiedades mejoradas (transparencia, barrera, propiedades mecánicas, biocompatibilidad o bioactividad) para múltiples aplicaciones, principalmente para recubrimiento de sustancias comestibles (Matsumoto & Kuroyanagi, 2010; Oms-Oliu y col., 2008) y empaquetamiento de alimentos (Alves y col., 2011; Nguyen y col, 2008). Además, la capacidad de los EPSs para formar matrices poliméricas permite su manipulación *in vitro* para moldearlos como materiales estructurales (p.ej. nanopartículas, expansores o hidrogeles) que se adapten a aplicaciones biomédicas específicas incluyendo la administración de fármacos, en geles para técnicas de imagen (ecografía), la ingeniería de tejidos o apósitos para heridas (Matsumoto & Kuroyanagi, 2010; Rodríguez-Carmona & Villaverde, 2010).

Así pues, debido a sus propiedades únicas y moldeables, varios EPSs bacterianos juegan un papel importante en el desarrollo de nuevos fármacos, no tan sólo por su capacidad de formar matrices poliméricas, sino también por sus actividades biológicas inherentes. Por ejemplo, el xantano, el dextrano sulfatado y el curdlan sulfatado se utilizan como agentes antivirales y anticancerígenos (Ghosh y col., 2009; Takeuchi y col., 2009).

Asimismo, los EPSs también pueden utilizarse como fuente de oligosacáridos y monómeros de azúcar, lo cual supone un valor añadido adicional (Freitas y col., 2011). Por ejemplo, la fucosa es un azúcar raro difícil de obtener. Las formulaciones u oligosacáridos que la contienen tienen propiedades que potencian su uso en fármacos (como agentes anticarcinogénicos o anti-inflamatorios), o en productos cosméticos como agentes anti-edad (Kumar y col., 2007). Por tanto, los polisacáridos con un alto contenido en fucosa (u otros componentes de valor añadido) pueden ser vistos como fuentes de productos químicos valiosos.

Los EPSs, especialmente la goma xantana, también se aplican como fluidos de perforación en la extracción de petróleo, debido a su capacidad de aumentar la viscosidad a bajas concentraciones (Baba Hamed & Belhadri, 2009).

Por último, otras aplicaciones de los EPSs que están bajo estudio son el secuestro de compuestos tóxicos, la activación de la sedimentación de lodos, la incorporación de

nanopartículas de arcilla en espumas acuosas para suprimir la vaporización de la gasolina y la producción de absorbentes elásticos para la absorción química del dióxido de carbono (Freitas y col., 2011).

4.3. Microorganismos de ambientes extremos como fuente de nuevos biopolímeros y enzimas

En los últimos años, ha habido un interés creciente en aislar y caracterizar nuevos microorganismos procedentes de ambientes extremos tales como las fumarolas hidrotermales de las aguas profundas, los ecosistemas antárticos, los lagos salinos y los manantiales geotermales, ya que éstos han desarrollado vías metabólicas especiales y mecanismos de protección específicos para sobrevivir a las duras condiciones ambientales propias de este tipo de hábitats (Nicolaus y col., 2010; Poli y col., 2010). Por tanto, los microorganismos de ambientes extremos son vistos como una nueva fuente potencial de biopolímeros y enzimas con nuevas propiedades y funciones que podrían ser explotados en procesos biotecnológicos innovadores (Antranikian y col., 2005; Freitas y col., 2011; Mancuso Nichols y col., 2005b; Nicolaus y col., 2010; Poli y col., 2010). Pero no sólo eso, sino que además, los extremófilos servirían como modelos para estudiar cómo se estabilizan las biomoléculas cuando son sometidas a condiciones extremas (Nicolaus y col., 2010; Poli y col., 2010).

5. DIMETILSULFURO (DMS): FORMACIÓN, METABOLISMO Y FUNCIÓN ECOLÓGICA

5.1. Formación de DMS a partir de dimetilsulfoniopropionato (DMSP)

El dimetilsulfuro (DMS) es un compuesto volátil orgánico de azufre que proviene principalmente de la degradación enzimática de la molécula marina dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Figura 3). El DMSP es un compuesto de azufre zwitteriónico de gran importancia en varios aspectos de la vida y biogeoquímica de los océanos y sus márgenes. El DMSP globalmente, es sintetizado en cantidades enormes ($\sim 10^9$ toneladas anuales) por el fitoplancton marino (diatomeas como p.ej. *Melosira nummuloides*, *Thalassiosira pseudonana* o *Fragilariopsis cylindrus*; dinoflagelados como *Symbiodinium* sp. o *Cryptothecodinium cohnii*; y cocolitóforos como *Emiliana huxleyi* y *Phaeocystis* sp.), macroalgas marinas (p.ej., *Ulva intestinalis* o *Polysiphonia* sp.), algunas angiospermas que habitan en la costa como *Spartina* sp. o *Wollastonia biflora* y algunos corales como *Acropora millepora* y *Acropora tenuis*

Figura 3. Formación y catabolismo del dimetilsulfoniopropionato (DMSP). Después de la liberación del DMSP del fitoplancton que lo produce, el DMSP es degradado principalmente por bacterias a través de dos rutas metabólicas. La vía de desmetilación del DMSP conlleva la producción de metil mercaptopropionato (MMPA), mientras que la vía de rotura produce DMS y acrilato o bien 3-hidroxipropionato (3HP). El DMS a su vez puede ser transformado por bacterias consumidoras de DMS o liberado a la atmósfera, donde puede convertirse en dimetilsulfóxido (DMSO) o aerosoles de sulfato. Éstos pueden actuar como núcleos de condensación de nubes (CCN) que promueven un aumento del albedo (cantidad de luz solar reflejada al espacio). Un paso esencial en el ciclo global del azufre es el retorno de estos compuestos a la superficie de la Tierra, vía lluvia o nieve, devolviendo así el azufre del mar a la tierra. El DMS también es un quimioatrayente importante para el zooplancton, crustáceos, aves marinas y mamíferos marinos. MeSH, metanotiol; X, tetrahidrofolato. Fuente: Curson y col. (2011).

5.1.1. Catabolismo del DMSP

Existen dos rutas de degradación del DMSP que compiten entre ellas. La primera comporta la desmetilación del DMSP, dando lugar a metil mercaptopropionato (MMPA), el cual se convierte posteriormente en el compuesto volátil metanotiol (MeSH). La segunda ruta de degradación del DMSP implica la liberación de DMS mediante una reacción catalizada por los enzimas denominados DMSP liasas (Figura 4). A pesar de que se considera que las bacterias marinas son los degradadores primarios del DMSP, también se han descrito algunas especies de fitoplancton marino que tienen la capacidad de degradar el DMSP y formar DMS como p.ej. *Emiliana huxleyi*, *Symbiodinium microadriaticum* o *Gephyrocapsa oceanica* (Curson y col., 2011; Reisch y col. 2011).

Se estima que el 90% del DMSP disuelto en los océanos es metabolizado por la ruta de la desmetilación y tan solo el 10% es degradado por la ruta de rotura que conlleva a la producción de DMS (Reisch y col. 2011).

Finalmente, los microorganismos degradadores de DMSP pueden poseer una o ambas vías metabólicas, como es el caso de *Ruegeria pomeroyi* DSS-3, *Phaeobacter* sp., *Roseovarius* sp., o *Dinoroseobacter shibae* DFL12 entre otros (Curson y col., 2011; Moran y col. 2012).

5.1.1.1. Ruta de desmetilación del DMSP

El enzima DmdA es un polipéptido perteneciente a la familia del sistema T de degradación de la glicina (GcvT) que cataliza la desmetilación del DMSP dando lugar a MMPA y 5-metil-

tetrahidrofolato (5-THF). A su vez el 5-THF actúa como donador de grupos metilo en la síntesis de metionina y S-adenosil-metionina (Reisch y col. 2011).

Por su parte, el MMPA se metaboliza posteriormente a través de una ruta de desmetilización que conlleva la liberación de MeSH. Concretamente, el enzima DmdB transforma en el MMPA en un tioéster MMPA-CoA, el cual es deshidrogenado por DmdC dando lugar a metiltioacrilil-CoA (MTA-CoA). Finalmente, DmdD hidrata el MTA-CoA dando lugar a MeSH, acetaldehído, CO₂ y CoA (Figura 4). El carbono y el azufre del MeSH a su vez son incorporados a los aminoácidos que contienen azufre como la metionina; aunque una parte del MeSH formado puede ser oxidado mediante un enzima MeSH oxidasa dando lugar a formaldehído, sulfuro de hidrógeno y peróxido de hidrógeno (Curson y col., 2011; Reisch y col. 2011).

Por otra parte, en algunas bacterias marinas de sedimentos anóxicos, el MMPA puede sufrir una desmetilación y formar mercaptopropionato (MPA). Sin embargo, la doble desmetilación del DMSP no es un hecho relevante en aguas marinas superficiales (Moran y col. 2012; Reisch y col. 2011).

Así pues, los metabolitos de la vía de desmetilación del DMSP suponen una fuente de carbono reducido para energía o biomasa en forma de dos grupos metilo activos así como de azufre reducido, el cual puede ser asimilado en aminoácidos que contienen azufre o bien ser oxidado para obtener energía (González y col., 2010; Moran y col. 2012).

El enzima DmdA está codificado por el gen *dmdA*, el cual está presente fundamentalmente en roseobacterias y en el abundante grupo de bacterias marinas del clade SAR11. También se encuentran homólogos en bacterias de otros abundantes clades marinos como *Candidatus* Puniceispirillum marinum str. IMCC1322 (clade SAR116) o la gammaproteobacteria marina HTCC2080 (clade OM60), lo cual puede reflejar al menos un evento de transferencia genética horizontal (TGH) (Curson y col., 2011). El gen *dmdA* es el gen catabólico del DMSP más frecuente en la base de datos de metagenomas marinos Global Ocean Sampling (GOS, Rusch y col., 2007) ya que está presente en un 27% de bacterias de la misma (Moran y col. 2012). Este dato es consistente con el hecho de que la ruta de desmetilación sea la vía de degradación

del DMSP mayoritaria con diferencia y también es lógico debido a su presencia en el abundante clade de bacterias marinas SAR11 y muchas roseobacterias (Curson y col., 2011; Moran y col. 2012; Reisch y col. 2011).

5.1.1.2. Ruta de rotura del DMSP

Aquellos enzimas que producen DMS y acrilato a partir de la rotura del DMSP se denominan DMSP liasas, aunque en algunas bacterias se genera 3-hidroxipropionato (3HP) en lugar de acrilato. Hasta el momento se han descrito 6 enzimas que degradan el DMSP liberando DMS: DddD, que además genera 3HP, y DddL, DddP, DddQ, DddW y DddY que forman acrilato junto al DMS (Curson y col., 2011; Moran y col. 2012; Reisch y col. 2011), (Figura 4).

DddD es la única “DMSP liasa” que no genera acrilato a partir del DMSP, sino que el primer producto detectable que forma es el 3HP. Este enzima es una proteína CoA-transferasa de clase III organizada en tándem que probablemente forma un derivado CoA del DMSP antes de convertirlo en 3HP. DddP es una DMSP liasa en sentido estricto que forma DMS y acrilato perteneciente a la familia de las proteasas M24, aunque no contiene co-factores metálicos. Los enzimas DddL, DddQ y DddW también generan DMS y acrilato y se ha predicho que poseen dominios de unión a metales de tipo cupin que incluyen dos motivos que contienen histidina separados por una región de longitud variable. Finalmente, DddY es una DMSP liasa asociada a la superficie celular, a diferencia de las otras liasas localizadas en el citoplasma (Curson y col., 2011; Reisch y col. 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, cinco de las DMSP liasas producen acrilato a partir del DMSP, mientras que una, DddD, produce 3HP. En *Halomonas* sp. HTNK1 el acrilato se metaboliza a 3HP mediante los enzimas AcuN and AcuK, indicando que el DMSP y el acrilato tienen un intermediario común. A su vez, el 3HP es metabolizado por la alcohol deshidrogenasa DddA que produce un intermediario que se cree que es el malonato-semialdehído, el cual es transformado a acetil-CoA mediante la metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa DddC (Curson y col., 2011; Reisch y col. 2011) (Figura 4). Así pues, en la ruta de rotura del DMSP, el azufre y dos grupos metilo del DMSP se pierden en forma de DMS, representando un gasto energético importante, mientras que en la ruta de desmetilación

se recupera todo el carbono y azufre del DMSP. Este hecho se explicaría por el papel de señalización que se le atribuye al DMS (González y col., 2010; Moran y col. 2012).

Por otra parte, hasta la fecha los genes *dddL*, *dddQ* y *dddW* sólo se han encontrado en las roseobacterias y grupos filogenéticamente cercanos. Asimismo, *dddP* también se encuentra principalmente en roseobacterias. Es más, algunas de estas bacterias marinas poseen varias DMSP liasas. Por ejemplo, *R.pomeroyi* DSS-3 contiene en su genoma *dddQ*, *dddP* y *dddW* y *Roseovarius nubinihibens* ISM tiene dos copias adyacentes de *dddQ* además de una copia de *dddP*. De entre estos cuatro genes, el *dddP* es con diferencia el más frecuente y el *dddW* el más raro entre las roseobacterias (Curson y col., 2011). Sin embargo, aunque el gen *dddP* se encuentra principalmente en roseobacterias, ha sufrido un proceso sustancial de TGH ya que se han encontrado homólogos en bacterias distantes filogenéticamente como *Oceanimonas doudoroffii* o *Candidatus Puniceispirillum marinum* IMCC1322. Incluso se han encontrado homólogos de *dddP* en varias especies de *Fusarium* sp. y *Aspergillus flavus* indicando una TGH interdominio (Curson y col., 2011).

El gen *dddD* se encuentra con más frecuencia en las gammaproteobacterias (*Pseudomonas* sp., *Marinomonas* sp., *Halomonas* sp., o *Psychrobacter* sp.) aisladas de ambientes ricos en DMSP como por ejemplo corales, algas marinas, sedimentos de marismas y el intestino de peces consumidores de plancton, aunque también se han encontrado homólogos de *dddD* en cepas esporádicas de *Burkholderia* sp. o *Rhizobium* sp., exhibiendo también una TGH importante. Es más, se ha detectado una proteína con un ~30% de homología con *DddD* en *Emiliana huxleyi*, indicando una posible TGH interdominio (Curson y col., 2011).

Finalmente, la distribución esporádica del gen *dddY* también indica una amplia TGH entre varias proteobacterias distantes filogenéticamente como *Alcaligenes* sp., *Shewanella* sp. o *Arcobacter* sp., todas ellas asociadas a ambientes microaeróbicos (Curson y col., 2011).

En la base de datos de metagenomas marinos Global Ocean Sampling (GOS), el gen *dddP* es el más frecuente de los genes *ddd* (presente en un 6% de bacterias), seguido de *dddQ*, mientras que *dddD* y *dddL* son menos comunes. Sin embargo, solamente se encuentra un homólogo cercano de *dddW* en la base de datos y no se hallan homólogos de *dddY*. Esto

puede deberse a que *dddY* se encuentra en bacterias presentes en ambientes microaerofílicos, los cuales no están bien representados en las bases de datos disponibles actualmente (Curson y col., 2011; Moran y col., 2012; Reisch y col., 2011).

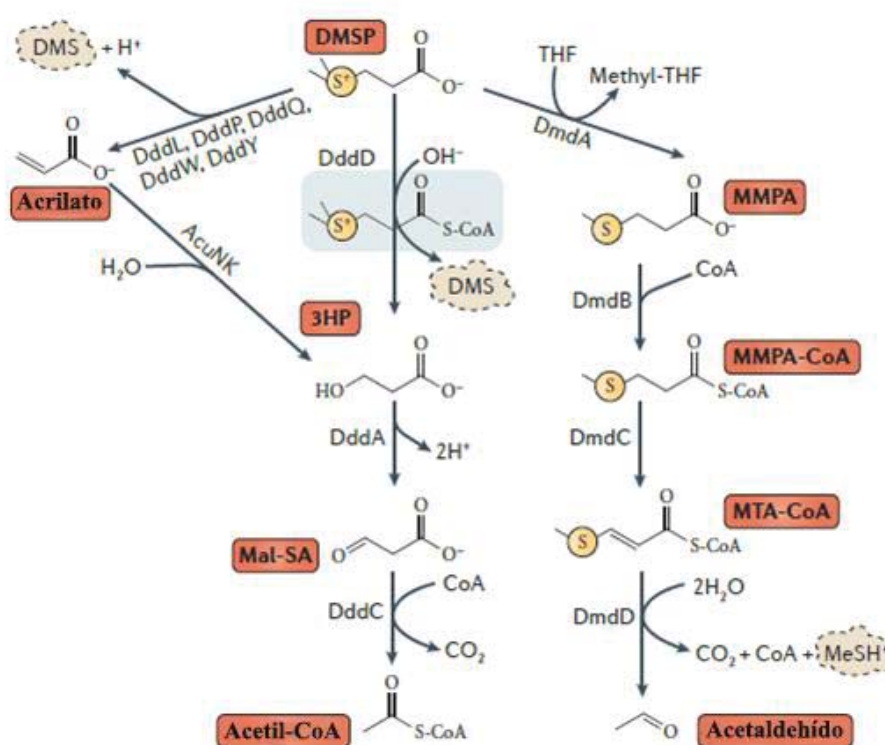


Figura 4. Rutas metabólicas de degradación del dimetilsulfoniopropionato (DMSP). Los enzimas implicados en las rutas de rotura y desmetilación están indicados. Las DMSP liasas DddL, DddP, DddQ, DddW y DddY convierten el DMSP en acrilato con la consecuente liberación de dimetilsulfuro (DMS). A su vez el acrilato es metabolizado a 3-hidroxipropionato (3HP) mediante los enzimas AcuNK. La DMSP liasa DddD convierte el DMSP en 3HP, posiblemente con la formación de un intermediario DMSP-CoA (bloque gris). El 3HP a su vez es convertido a malonato-semialdehído (Mal-SA) y posteriormente en acetil-CoA mediante los enzimas DddA y DddC respectivamente. En la ruta de desmetilación, la DMSP desmetilasa DmdA retira un grupo metilo del DMSP para formar metil mercaptopropionato (MMPA), con el tetrahidrofolato (THF) como aceptor del grupo metilo. A continuación el MMPA es metabolizado vía los intermediarios MMPA-CoA y metiltioacrililo-CoA

(MTA-CoA) a acetaldehído a través de DmdB, DmdC y DmdD. MeSH, metanotiol. Fuente: Curson y col. (2011).

5.2. Rutas de formación de DMS independientes de DMSP

En general se cree que el DMS se produce principalmente como resultado del catabolismo microbiano del DMSP en ambientes marinos a través de la acción de los enzimas conocidos como DMSP liasas. Sin embargo, también se han descrito rutas microbianas de formación de DMS independientes de DMSP que no están asociadas solamente a ambientes marinos como la lisis de metabolitos secundarios de dimetilsulfonio (p.ej., gonyaulina y gonyol), (Spielmeyer y col., 2011) y la degradación enzimática de la S-metilmetionina, dimetilsulfóxido (DMSO) o compuestos metoxiaromáticos (Stets y col., 2004). Además, en muchos ambientes anaeróbicos se ha detectado producción de DMS a niveles (1-44 nM) que pueden ser superiores a los descritos en la capa superior de la columna de agua marina (Lana y col., 2011; Lomans y col. 1997), probablemente mediante la metilación procariota del MeSH (Stets y col., 2004; Kiene & Hines, 1995), un producto del catabolismo de la metionina vía el enzima metionina gamma liasa (Tanaka y col., 1977). Estos ambientes incluyen sedimentos de lagos (Lomans y col., 1997; Zinder y col., 1978a, 1978b), sedimentos de marismas (Kiene & Visscher, 1987), tapetes de cianobacterias (Zinder y col., 1977) y turberas, las cuales representan una superficie de 4 millones de km² y pueden llegar a emitir ~6 μmol DMS·m⁻²·día⁻¹ (Kiene & Hines, 1995). Se cree que los microorganismos metanógenos están implicados en estas rutas anóxicas (Kiene & Visscher, 1987; Kiene & Hines, 1995; Stets y col., 2004) y de hecho se ha demostrado que *Methanosarcina acetivorans* produce MeSH y DMS cuando utiliza monóxido de carbono como fuente de energía (Moran y col., 2008).

Por otra parte, la capacidad de generar MeSH a partir del sulfuro y/o metionina en condiciones óxicas es común en bacterias heterótrofas de ambientes muy diversos (Drotar y col., 1987), pero la investigación de las reacciones de metilación del MeSH que generan DMS en bacterias aeróbicas en cualquier ambiente es muy limitada. Asimismo, la importancia de estos procesos en las emisiones globales de DMS es desconocida, así como lo es la base molecular de estas biotransformaciones.

5.3. Metabolismo del DMS

Globalmente, los microorganismos de los océanos y sus márgenes generan ~300 millones de toneladas de DMS anualmente (Kettle & Andreae, 2000) mediante biotransformaciones de moléculas de azufre (Curson y col., 2011; Sievert y col., 2007). El ~90% del DMS generado es posteriormente catabolizado por bacterias o bien oxidado fotoquímicamente en los océanos (Kiene & Bates, 1990). Un amplio rango de bacterias marinas pueden metabolizar este gas mediante varias rutas catabólicas, incluyendo la desmetilación y la oxidación hasta MeSH, dimetilsulfóxido (DMSO) o tetrionato (Curson y col., 2011).

Hasta el momento se ha identificado una dimetilsulfuro deshidrogenasa que cataliza la oxidación del DMS para dar lugar a DMSO en *Rhodovulum sulfidophilum*. También se ha caracterizado un enzima DMS monooxigenasa en *Hyphomicrobium sulfonivorans* que oxida el DMS a MeSH y formaldehído. Finalmente, se ha descrito una nueva ruta de oxidación del DMS en *Methylophaga thiooxydans* que da lugar a tetrionato como producto final (Reisch y col. 2011). Dado que el 90% del DMS es metabolizado por bacterias, cabe esperar que a medida que se vayan caracterizando mejor las rutas por las que se degrada se encuentren más genes y enzimas que intervengan en ellas.

5.4. Papel ecológico del DMS

A pesar de que tan solo el ~10% del DMS producido se libera a la atmósfera (Kiene & Bates, 1990), este gas supone la mayor fuente de azufre de origen biogénico que se transfiere de los océanos a la atmósfera, lo cual es un paso importante en el ciclo global del azufre ya que este elemento puede retornar después a la tierra mediante la lluvia o nieve (Lovelock y col., 1972). Por otra parte, una vez se encuentra en la atmósfera, el DMS es oxidado abiológicamente a DMSO o compuestos higroscópicos como el sulfato, el dióxido de azufre o el ácido metasulfónico (MSA). Estos compuestos atraen a las gotas de agua y actúan como núcleos de condensación de nubes (*Cloud Condensation Nuclei*, CCN) aumentando así el albedo (Figura 5). Al incrementar el albedo, (cantidad de radiación solar reflejada al espacio), disminuiría la temperatura global del planeta afectando así posiblemente a la regulación del clima. Esta teoría, conocida como la hipótesis CLAW, fue postulada por Charlson y col. en 1987 (Charlson y col., 1987). De acuerdo a la misma, la tasa de emisión de DMS de los océanos

estaría afectada por el clima, aunque no estaría claro si positiva o negativamente, cerrando así un bucle de retroalimentación (Charlson y col., 1987, Figura 5).

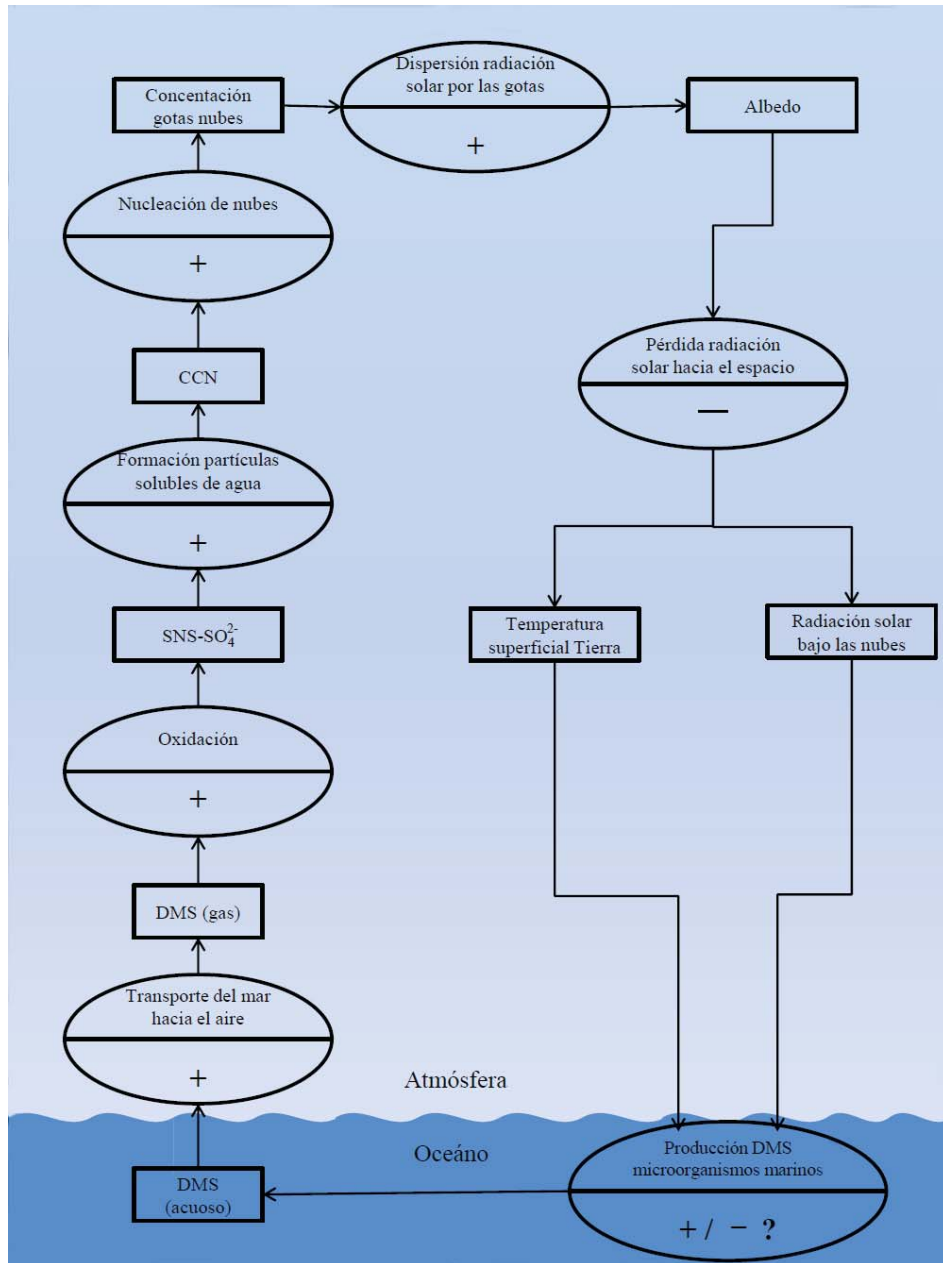


Figura 5. Teoría CLAW sobre la relación entre las emisiones de DMS y la regulación del clima. Los rectángulos indican parámetros cuantificables, mientras que los óvalos son procesos que relacionan los rectángulos. El signo + o - en los óvalos indica el efecto de un cambio positivo en la cantidad del cuadrado previo en el rectángulo posterior. La relación más incierta en el bucle es el efecto del albedo en la emisión de DMS; su signo debería ser positivo para regular el clima. SNS: Sulfato No procedente de Sales Marinas. Fuente: Charlson y col. (1987).

Algunos autores (Toole & Siegel, 2004; Vallina & Simó, 2007) han observado una fuerte correlación positiva entre las concentraciones de DMS de la superficie de los océanos y la dosis de radiación solar, sugiriendo la existencia de una retroalimentación positiva entre el plancton y el clima mediante la influencia del primero en el balance de la energía de radiación de la Tierra. Sin embargo, la teoría CLAW y la regulación del clima por las emisiones de azufre microbianas se ha cuestionado recientemente (Quinn & Bates, 2011). La evidencia más fuerte que apoya la existencia del primer paso del bucle de retroalimentación de la teoría CLAW es la coherencia entre los ciclos estacionales de DMS, sus productos de oxidación (SO_4^{2-} y MSA) y los CCN (Andreae y col., 1995; Ayers & Gras, 1991; Ayers y col., 1997). No obstante, en estos estudios no se indica la sensibilidad de la concentración de los CCN a cambios en la emisión de DMS ni tienen en cuenta otras fuentes de CCN como las sales marinas o compuestos orgánicos provenientes de la materia orgánica disuelta de los océanos (Quinn & Bates, 2011). Woodhouse y col. (2010) encontraron una baja sensibilidad de los CCN a los cambios en las emisiones de DMS por parte de los océanos (un aumento del 1% en el flujo de DMS comportaría un aumento del 0,07% de los CCN totales en el Hemisferio Sur y del 0,02% en el Hemisferio Norte) debido a la abundancia de CCN derivados de otras fuentes diferentes del DMS, sugiriendo que el papel del DMS en la regulación del clima sería muy débil. La teoría CLAW también asume que un aumento de la concentración de CCN causaría un aumento de la cantidad del albedo planetaria suficiente para disminuir la temperatura global del planeta. Sin embargo, algunos estudios de la última década han revelado mecanismos que ocurren en las nubes a escala micro- y macro-física que atenuarían la importancia del aumento del albedo como consecuencia del aumento de la concentración de CCN (Quinn & Bates, 2011).

Finalmente, el último paso de la teoría CLAW asume que los cambios en el albedo, la temperatura superficial y/o la incidencia de la radiación solar, comportan cambios en la producción de DMS por parte de los microorganismos marinos. Este paso se ha corroborado

con los resultados de varios estudios que muestran una correlación estacional entre los niveles de radiación solar y las concentraciones de DMS de la capa superior de los océanos (Toole & Siegel, 2004; Vallina & Simó, 2007). No obstante, esta correlación no revela información sobre la sensibilidad de la producción de DMS a los cambios en la radiación solar (Quinn & Bates, 2011). Sin embargo, algunos modelos indicarían que las variaciones en las emisiones de DMS debidas a los cambios en la temperatura y la irradiación oceánica serían pequeñas (Gunson y col., 2006; Vallina y col., 2007). Por ejemplo, un aumento de la dosis de radiación solar en la capa superficial de los océanos debido a un incremento del 50% de la concentración atmosférica de CO₂ resultaría tan sólo en un aumento de ~1% de la concentración superficial de DMS de los océanos (Vallina y col., 2007).

Así pues, se necesitan estimaciones más precisas de las emisiones de DMS y de los factores que las regulan, así como una mejor comprensión de la complejidad de las múltiples fuentes de CCN y la biogeoquímica y física del clima para averiguar el impacto potencial del DMS en la regulación del mismo.

Además, el DMS es un potente quimioatrayente para el zooplancton, algunas aves marinas, crustáceos y mamíferos marinos que lo usan como pista para detectar alimento (DeBose & Nevitt, 2008; Nevitt & Bonadonna, 2005; Steinke y col., 2006). Finalmente, el DMS proporciona el característico olor de la orilla del mar (Curson y col., 2011).

II.OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La tesis doctoral “Caracterización de una nueva bacteria antártica y estudio de una nueva vía de producción de dimetilsulfuro” se enmarca dentro del grupo de investigación dirigido por la Dra. Elena Mercadé en el Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Una de las principales líneas de investigación del grupo desde 1985 ha sido el aislamiento y la caracterización de nuevos microorganismos de origen antártico. El estudio de estas bacterias adaptadas al frío es interesante por su capacidad potencial de producir nuevas moléculas bioactivas que puedan tener aplicaciones biotecnológicas. Con este planteamiento el grupo se ha centrado en el estudio de las sustancias poliméricas extracelulares producidas por los nuevos microorganismos antárticos aislados y más concretamente, en la búsqueda y caracterización de exopolisacáridos que presenten capacidad emulsionante dentro del proyecto “Obtención de emulsionantes poliméricos de nueva generación” financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2010-21183-C02-01).

destacó por producir un compuesto volátil con un potente olor que inducía a pensar que se trataba de un compuesto orgánico volátil de azufre (VOSC).

De un modo más específico, los objetivos que se han abordado han sido:

1. Realizar la clasificación taxonómica polifásica
2. Realizar la caracterización del material extracelular

Objetivos

3. Caracterizar los compuestos volátiles mediante el análisis de cromatografía de gases para ver de qué compuesto(s) se trata y en función de ello estudiar las vías metabólicas implicadas en su síntesis y analizar su función.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

1.1. Cepas utilizadas en la clasificación taxonómica

Para la clasificación taxonómica se emplearon las cepas citadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas en la clasificación taxonómica

Cepa	Descripción	Fuente o Referencia

1.2. Cepas utilizadas en el estudio del EPS

Para estudiar la composición y propiedades del EPS se utilizaron las cepas mencionadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas empleadas en el estudio del EPS

Cepa	Descripción	Fuente o Referencia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Cepa salvaje	Colección de bacterias ATCC (Estados Unidos)
<i>Marinobacter guineae</i> M3B	Cepa salvaje	Dra. E. Mercadé, Universidad de Barcelona (España)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. M4.2	Cepa salvaje	Dra. E. Mercadé, Universidad de Barcelona (España)
<i>Psychrobacter fozii</i> NF23	Cepa salvaje	Dra. E. Mercadé, Universidad de Barcelona (España)
<i>Shewanella vesiculosa</i> M7 ¹	Cepa salvaje	Dra. E. Mercadé, Universidad de Barcelona (España)
<i>Shewanella livingstonensis</i> NF22 ^T	Cepa salvaje	Dra. E. Mercadé, Universidad de Barcelona (España)

1.3. Cepas utilizadas en el estudio de la producción de DMS

Las especies bacterianas utilizadas en el estudio de la producción de DMS se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas utilizadas en el estudio de la producción de DMS.

Cepa	Descripción	Fuente o Referencia
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110	Cepa salvaje	Dr. A. Gates, University of East Anglia (Reino Unido)
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	Cepa salvaje	Colección de bacterias ATCC (Estados Unidos)
<i>Emiliana huxleyi</i> CCAP920/8	Cepa salvaje	Colección de cultivos de algas y protozoos CCAP (Escocia)
<i>E. huxleyi</i> CCAP920/9	Cepa salvaje	Colección de cultivos de algas y protozoos CCAP (Escocia)
<i>E. huxleyi</i> CCAP920/12	Cepa salvaje	Colección de cultivos de algas y protozoos CCAP (Escocia)
<i>E. huxleyi</i> CCMP374	Cepa salvaje	Dr. G. Mallin, University of East Anglia (Reino Unido)
<i>E. huxleyi</i> CCMP1516	Cepa salvaje	Dr. G. Mallin, University of East Anglia (Reino Unido)
<i>E. huxleyi</i> CCAP920/12	Cepa salvaje	Colección de cultivos de algas y protozoos CCAP (Escocia)
<i>Escherichia coli</i> 803	Utilizada durante todo el trabajo rutinario	Wood, 1966
<i>E. coli</i> BL21	Cepa con polimerasa T7 utilizada para expresar los genes clonados	Invitrogen
<i>E. coli</i> A118	Cepa que contiene una copia cromosómica de Tn5 <i>lacZ</i> (tet ^R , kan ^R)	Messing, 1979
<i>P. fragi</i> DSM 3456	Cepa salvaje	Colección de bacterias DMSZ (Alemania)
<i>Pseudomonas</i> sp. GM41	Cepa salvaje	Dr. A. Pelletier, Oak Ridge National Laboratory (Estados Unidos)
<i>P. psychrophila</i> DSM 17535	Cepa salvaje	Colección de bacterias DMSZ (Alemania)
<i>P. putida</i> ATCC 12623	Cepa salvaje	Colección de bacterias ATCC (Estados Unidos)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Cepa salvaje (str ^R)	Young y col., 2006
J564	Mutante espontáneo rif ^R	Este trabajo
J565	Cepa derivada de J564 mutada en el gen <i>megL</i> mediante mutagénesis con pBIO2221 (kan ^R , rif ^R , spec ^R)	Este trabajo
J566	Cepa derivada de J564 mutada en el gen mediante intercambio de marcadores usando pBIO2220 (gm ^R , kan ^R , rif ^R)	Este trabajo

2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivos empleados para el mantenimiento de las cepas y la realización de los diversos experimentos se detallan a continuación, así como su composición por litro.

- Agar King B: 10 g peptona de carne; 10 g peptona de caseína; 1,5 g K_2HPO_4 ; 1,5 g $MgSO_4$; 15 g agar (pH 7,2).
- Agar Marino (Difco): 5 g peptona; 1 g extracto de levadura; 0,1 g $C_6H_5FeO_7$; 19,45 g NaCl; 8,8 g $MgCl_2$; 3,24 g Na_2SO_4 ; 1,8 g $CaCl_2$; 0,55 g KCl; 0,16 g $NaHCO_3$; 0,08 g KBr; 34 mg $SrCl_2$; 22 mg H_3BO_3 ; 4 mg Na_2SiO_3 ; 2,4 mg NaF; 1,6 mg NH_4NO_3 ; 8 mg Na_2HPO_4 ; 15 g agar (pH 7,6).
- Agar Nutritivo (Cultimed): 5 g peptona de caseína; 2,5 g extracto de levadura; 1 g dextrosa; 15 g agar, (pH 7).
- Luria-Bertani (LB, Sambrook & Russell, 2001): 10 g triptona; 5 g extracto de levadura; 5 g NaCl (pH 7,2).
- M9 (Sambrook & Russell, 2001): 10 mM glicerol; 6,8 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 0,5 g NaCl; 1 g NH_4Cl ; 10 mg $CaCl_2$; 0,2 g $MgSO_4$ (pH 7,4).
- Medio ATCC 1047 (Reddy y col., 1993): 0,04 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,75 g $NaNO_3$; 0,02 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 3 mg citrato; 3 mg citrato amónico de hierro; 0,5 mg EDTA; 0,02 g Na_2CO_3 ; 20 mcg vitamina B_{12} ; 1 ml elementos traza; 750 ml agua de mar (pH 8,5).
- Medio ESAW (Harrison y col., 1980): 1 l agua de mar; 5,53 mg $EDTA \cdot 2H_2O$; 46,67 mg $NaNO_3$; 30 mg $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$; 6,67 mg glicerofosfato de sodio; 3,80 mg H_3BO_3 ; 2,34 mg $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$; 0,16 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 5,4 mg $MnSO_4 \cdot 4H_2O$; 0,073 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,016 mg $CoSO_4 \cdot H_2O$; 0,1 mg tiamina; 0,002 mg vitamina B_{12} ; 0,001 mg biotina (pH 8,2).
- MM1: 20 g glucosa; 0,5 g bacto-peptona; 0,1 g extracto de levadura; 0,4 g citrato; 7 g $NaNO_3$; 2 g K_2HPO_4 ; 0,7 g $NaNH_5PO_4 \cdot 4H_2O$; 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,018 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 ml elementos traza (pH 6,8).

- Mueller Hinton Agar (Oxoid): 300 g infusión deshidratada de ternera; 17,5 g hidrolizado de caseína; 1,5 g glucógeno; 17 g agar (pH 7,3).
- Mueller Hinton Caldo (Oxoid): 300 g infusión deshidratada de ternera; 17,5 g hidrolizado de caseína; 1,5 g glucógeno (pH 7,3).
- Tryptone Soya Agar (TSA, Scharlau): 15 g digerido pancreático de caseína; 5 g peptona de soja; 5 g NaCl; 15 g agar (pH 7,3).
- Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid): 17 g digerido pancreático de caseína; 3 g digerido enzimático de soja; 5 g NaCl; 2,5 g K₂HPO₄; 2,5 g glucosa (pH 7,3).
- TY (Beringer, 1974): 3 g extracto de levadura; 5 g triptona; 0,9 g CaCl₂ · 2H₂O (pH 6,8).
- Y (Beringer, 1974): 10 mM succinato; 0,5 g NH₄Cl 0,1 g MgSO₄ · 7H₂O; 0,2 g CaCl₂ · 6H₂O; 0,2 g K₂HPO₄; 0,75 mg biotina; 0,75 mg tiamina, 0,75 mg ácido DL-pantoténico (pH 6,8).

2.1. Preparación de los medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y se esterilizaron mediante calor húmedo en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 min. Las disoluciones que no pudieron ser tratadas por este método se esterilizaron por filtración utilizando filtros de celulosa (Millipore) con diámetro de poro de 22 µm. El pH de los medios se ajustó con NaOH (Panreac) o HCl (Panreac).

2.2. Suplementos de los medios de cultivo

En los casos requeridos, los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos y otros suplementos especificados en la Tabla 4.

Materiales y Métodos

Tabla 4. Antibióticos y suplementos utilizados en este trabajo. Cuando se requieren diferentes concentraciones para diferentes microorganismos se indica entre paréntesis. Todos los suplementos fueron suministrados por Sigma y esterilizados por filtración.

Antibiótico / Suplemento	Disolvente	Concentración stock (mg·ml ⁻¹)	Concentración final (µg·ml ⁻¹)
Ampicilina (amp)	dH ₂ O	100	100
Gentamicina (gm)	dH ₂ O	10	5
IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)	dH ₂ O	200	200
Kanamicina (kan)	dH ₂ O	50	20 (<i>E.coli</i> ,) 200 (<i>R.leguminosarum</i>)
Espectinomicina (spec)	dH ₂ O	100	200 (<i>E.coli</i>) 800 ()
Estreptomycin (str)	dH ₂ O	200	400
Tetraciclina (tet)	Etanol 70%	5	5
Rifampicina (rif)	Metanol	10	20

3. CULTIVO DE MICROORGANISMOS

E.coli se cultivó o/n en LB, TSB o M9 a 37 °C. *B.diazoefficiens* USDA 110 y *R.leguminosarum* se incubaron en TY o Y durante 48 h a 28 °C. *Cyanothece* sp. ATCC 51142 se incubó en el medio ATCC 1047 a 26 °C bajo condiciones de iluminación constantes (50 µE · m⁻² · s⁻¹) durante 1 semana. *E.huxleyi* se incubó en 10 ml de medio ESAW en viales sellados de 100 ml a 26 °C durante 2 semanas bajo condiciones de iluminación constantes (50 µE · m⁻² · s⁻¹) y el crecimiento se monitorizó utilizando un analizador Multisizer 3 (Beckman Coulter), y la fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m) se midió con un analizador Phyto-Pam phytoplankton (Heinz Walz).

3.1. Mantenimiento y conservación de cepas

Las cepas se mantuvieron viables resembrándolas cada quince días en TSA o LB en el caso de *Pseudomonas* sp. y *E.coli*; en TY en el caso de *B.diazoefficiens* USDA 110 y *R.leguminosarum*, en medio ATCC 1047 en el caso de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 y en medio ESAW en el caso de *E.huxleyi*, a las temperaturas especificadas en el apartado 3. Las

cepas se conservaron también congeladas o bien criobolas (Cryo-Billes, AES, AEB400100, Combourg, Francia) o bien en alícuotas de los cultivos mezcladas con glicerol al 25 % (v/v) y DMSO al 15% (v/v). Tanto las criobolas como las alícuotas con glicerol y DMSO se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

4. PLÁSMIDOS, VECTORES Y CÓSMIDOS

Los plásmidos, vectores y cósmidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Plásmidos, vectores y cósmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido / Vector / Cósmido	Descripción	Uso	Fuente o Referencia
pET21a	Vector de expresión <i>E. coli</i> T7 (amp ^R)	Utilizado para clonar	Novagen
pLAFR3	Cósmido de amplio espectro (tet ^R)	Utilizado para generar la librería genómica	Friedman y col., 1982
pPH1JI	Plásmido del grupo de incompatibilidad IncP-1 (gm ^R)	Plásmido utilizado en el intercambio de marcadores	Hirsch & Beringer 1984
pRK415	Vector de clonación de amplio espectro (tet ^R)	Utilizado para hacer fusiones traduccionales con	Keen y col., 1988
pRK2013	Plásmido movilizador que contiene los genes <i>mob</i> y <i>tra</i> (kan ^R)	Plásmido movilizador usado en las conjugaciones triparentales	Figurski & Helinski 1979
pBIO1878	Plásmido reportero <i>lacZ</i> de amplio espectro (spec ^R , tet ^R)	Utilizado para realizar la fusión promotor de <i>-lacZ</i> y generar pBIO2232	Todd y col., 2012
pBIO1879	Plásmido suicida (spec ^R , kan ^R)	Vector utilizado en la generación del mutante <i>megL</i> ⁻	Todd y col., 2011
pBIO2219	Clon basado en pLAFR3 que contiene el gen de y la región de DNA genómico adyacente	Cósmido que confiere producción de DMS dependiente de MeSH a <i>R. leguminosarum</i>	Este trabajo
pBIO2220	Derivado de pBIO2219 que contiene Tn5 <i>lacZ</i> insertado en el gen de	Cósmido utilizado para generar la cepa mediante intercambio de marcadores	Este trabajo
pBIO2221	Derivado de pBIO1879 que contiene un fragmento interno de 0.5 kb del gen <i>megL</i> de	Utilizado para la mutagénesis del gen <i>megL</i> en	Este trabajo

pBIO2223	Clon pET21a que contiene el gen de	Utilizado para expresar la proteína de en <i>E. coli</i> BL21	Este trabajo
pBIO2224	Clon pET21a que contiene el gen de <i>Pseudomonas</i> sp. GM41	Utilizado para expresar la proteína de <i>Pseudomonas</i> sp. GM41 () en <i>E. coli</i> BL21	Este trabajo
pBIO2225	Clon pET21a que contiene el gen de <i>B.diazoeficiens</i> USDA 110	Utilizado para expresar la proteína de <i>B.diazoeficiens</i> USDA 110 () en <i>E.coli</i> BL21	Este trabajo
pBIO2227	Clon pET21a que contiene el gen de <i>B.diazoeficiens</i> USDA 110	Utilizado para expresar la proteína de <i>B.diazoeficiens</i> USDA 110 () en <i>E. coli</i> BL21	Este trabajo
pBIO2229	Clon pET21a que contiene el gen de <i>M.tuberculosis</i> H37Rv	Utilizado para expresar la proteína de <i>M.tuberculosis</i> H37Rv () en <i>E.coli</i> BL21	Este trabajo
pBIO2231	Clon pET21a que contiene el gen de <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	Utilizado para expresar la proteína de <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142 () en <i>E. coli</i> BL21	Este trabajo
pBIO2232	Derivado de pBIO1878 que contiene el promotor de de	Utilizado para ensayar la transcripción de en	Este trabajo
pBIO2235	Clon derivado de pRK415 que contiene la fusión traduccional :: <i>egfp</i>	Utilizado para determinar la localización subcelular de en	Este trabajo
pBIO2238	Clon derivado de pRK415 que contiene la fusión traduccional :: <i>phoA</i>	Utilizado para determinar la localización subcelular de en	Este trabajo

5. CEBADORES

Los cebadores utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores utilizados en este trabajo. Las dianas de restricción utilizadas para el clonaje están subrayadas.

Cebadores	Secuencia (5' – 3')	Uso
16SrRNAF	AGTTTGATCCTGGCTCAG	Amplificar gen 16S rRNA
16SrRNAR	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA	Amplificar gen 16S rRNA
<i>rpoDF</i>	ACGACTGACCCGGTACGCATGTA	Amplificar gen <i>rpoD</i> de
<i>rpoDR</i>	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT	Amplificar gen <i>rpoD</i> de
<i>lacZ</i>	GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGC	Localizar la inserción de Tn5 <i>lacZ</i> en pBIO2220
<i>NdeI</i>	CGGATCCCATATGCACACCCGAACCGCC CCG	Generar pBIO2223 y pBIO2234; Comprobar cepa J566
<i>EcoRI</i>	GCGAATTCCTCAGTCCTGGGAACCCGGG	Generar pBIO2223; Comprobar cepa J566
<i>BamHI</i>	GCGGATCCGTCCTGGGAACCCGGGTTGC G	Generar pBIO2234 y pBIO2237
<i>XbaI</i>	CCTCTAGAACTCCTACGGCAAACCTGGTT TATGAAG	Generar pBIO2232
<i>NsiI</i>	CCAATGCATGGTGATCAGCAACACATCC ACCAG	Generar pBIO2232
GFP <i>BamHI</i>	CGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG AGC	Generar pBIO2234
GFP <i>HindIII</i>	CGGGATCCAAGCTTTTACTTGTACAGCT CGTCCATG	Generar pBIO2234
<i>gfpPstI</i>	GCCTGCAGAATAATTTTGTAACTTTAA GAAG	Generar pBIO2235
<i>gfpKpnIXbaI</i>	GGGGTACCTCTAGATTACTTGTACAGCT CGTCCATG	Generar pBIO2235
<i>phoABamHI</i>	GCGGATCCGCACCAGAAAATGCCTGTTCT GG	Generar pBIO2237
<i>phoAKpnIHindIII</i>	CCCGGGAAGCTTGGTACCCGACAGCGAA AATTCACCG	Generar pBIO2237
<i>NheI</i>	GCATGGCTAGCATGGAACGTCCGATCCG AT	Generar pBIO2225
<i>EcoRI</i>	CGGAATTCCTAAACTGACCGGCGCCAGG	Generar pBIO2225
<i>NdeI</i>	GATGGATCATATGTTTCGCGCGCCTCGCA ATC	Generar pBIO2227
<i>EcoRI</i>	CGGAATTCCTCATCGGGGTGCTCCAACG	Generar pBIO2227
GM41 <i>NdeI</i>	CGGATCCCATATGAATCCTCCTAACCGG AC	Generar pBIO2224
GM41 <i>EcoRI</i>	GCGAATTCCTCAGGCACTGTGGGTGCC	Generar pBIO2224
Cyano <i>NdeI</i>	CGGATCCCATATGCAGCAGCAACAAACC TTG	Generar pBIO2231
Cyano <i>EcoRI</i>	GGAATTCCTGCCTTATCTAACCAGC	Generar pBIO2231
<i>megLEcoRI</i>	CGGAATTCATCGTCAACCGCACGTTGT ATGG	Generar pBIO2221
<i>megLXbaI</i>	GCTCTAGAGGGGTGATCCTGCAACATCT GC	Generar pBIO2221
<i>megLHindIII</i>	CCCAGCTTATTGAAATGACCGATGGCC CTC	Comprobar cepa J565
<i>megLEcoRI2</i>	CGGAATTCGGTCGTTGCCGAATATCAGC	Comprobar cepa J565

6. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

6.1. Tinción negativa

Las muestras para las tinciones negativas procedían tanto de cultivos líquidos como de cultivos sólidos. En el caso de los cultivos líquidos, éstos se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución Ringer (Scharlau). Cuando la muestra procedía de un cultivo sólido se resuspendieron varias colonias en solución Ringer hasta conseguir una turbidez aparente. Una vez preparadas las suspensiones se colocó una gota de 20 – 30 μl de éstas sobre parafilm. Seguidamente se depositó sobre la muestra una rejilla de microscopía electrónica de cobre 200/MESH (huecos/pulgada) recubierta con Formvar-carbono y se dejó en contacto con ella durante 2 min. Seguidamente la rejilla se depositó sobre una gota de agua bidestilada durante 10 s, tras los cuales se trasladó a una gota de 20 μl de acetato de uranilo 2% (p/v) durante 1 min. El exceso de acetato de uranilo se retiró con papel de filtro y la muestra se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company) a 120 kV.

6.2. Criofijación a alta presión y Criosustitución (HPF-FS)

Los pellets de los cultivos líquidos o las colonias de medios sólidos de las cepas de interés, se transfirieron a *planchettes* de 1,5 mm de diámetro y 200 μm de profundidad e inmediatamente se procedió a su criofijación por alta presión utilizando el equipo Leica EM HPM-100 High Pressure Freezer (Leica Microsystems) a una presión de 2.100 bars y una rampa de disminución de temperatura de 8.000 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$. Posteriormente, las *planchettes* se conservaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

Las muestras crioimmobilizadas se criosustituyeron en acetona pura con tetraóxido de osmio 2% (p/v) y acetato de uranilo 0,1% (p/v) durante 72 h a -90°C en el equipo Leica EM automatic freeze substitution system (Leica Microsystems). A continuación, se aumentó la temperatura a una velocidad de 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ hasta llegar a los 4 $^{\circ}\text{C}$, temperatura a la que las muestras se mantuvieron durante 2 h. Posteriormente, se aumentó la temperatura de la muestra a 25 $^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo durante 1 h. Las muestras se lavaron con acetona durante 1 h a temperatura ambiente y se infiltraron en las siguientes mezclas de Epon-acetona: 1:3 durante 2 h, 2:2 durante 2 h, 3:1 durante 16 h y finalmente en Epon pura 812 (Ted Pella, Inc.) durante

30 h. Las muestras fueron embebidas en resina Epon fresca y la polimerización de la resina tuvo lugar a 60 °C durante 48 h.

6.3. Cortes ultrafinos

Los cortes ultrafinos de las muestras criofijadas y criosustituidas (50 – 60 nm) se realizaron con el ultramicrotomo UCT (Leica Microsystems) y se depositaron en rejillas de microscopía electrónica de cobre recubiertas con Formvar-carbono. Las secciones obtenidas se contrastaron con acetato de uranilo 2% (p/v) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar la muestra con agua, se contrastó nuevamente con citrato de plomo durante 5 min previamente a su observación en el microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company) a 120 kV.

6.4. Tinción con tetraóxido de rutenio

La tinción de tetraóxido de rutenio revela los polisacáridos que rodean las células bacterianas (Waller y col., 2004).

Todas ellas fueron incubadas a 15 °C durante 72 h antes de ser sometidas a fijación química con un 5% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,3) y 4 °C durante un período o/n. Después de ser lavadas durante 10 min con tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,3) cinco veces, las muestras fueron incubadas dos veces con tetraóxido de rutenio 0,25% y ferrocianida potásica 0,25% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 6,8) durante 1 h en oscuridad a 4 °C. Las muestras se lavaron cinco veces durante 15 min con agua miliQ a 4 °C y mantenidas en tampón cacodilato 0,1 M (pH 6,8) y 4 °C hasta su criofijación por alta presión. Para la criosustitución, se utilizó una solución que contenía tetraóxido de osmio 1%, acetato de uranilo 0,5% y glutaraldehído 3% en metanol. La criosustitución empezó 72 h a -90 °C, seguida de un calentamiento hasta 4 °C con una rampa de 5 °C·h⁻¹, punto en el cual la temperatura se mantuvo durante 4 h. Una vez finalizado el proceso, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad a 4 °C. Después fueron lavadas dos veces con metanol durante 2 h y tres veces con acetona durante 15 min. Finalmente, las muestras se infiltraron con Epon:metanol 1:3, 2:2 y 3:1 durante 3 h en cada paso y finalmente fueron embebidas en Epon. Se obtuvieron secciones ultrafinas utilizando un ultramicrotomo UCT (Leica Microsystems), y se tiñeron con acetato de uranilo 2% y citrato

de plomo. Las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company) a 120 kV.

6.5. Inmunomarcaje de la proteína

cepas se sometieron a criofijación por alta presión con el equipo Leica EM HPM-100 High Pressure Freezer (Leica Microsystems). Las muestras congeladas fueron criosustituidas en el equipo Leica EM automatic freeze substitution (AFS) system (Leica Microsystems), en el que la sustitución se llevó a cabo con acetona pura con 0,5% acetato de uranilo (p/v) a -90 °C durante 80 h. Después, la temperatura se aumentó gradualmente hasta -50 °C con una rampa de 5 °C·h⁻¹. Las muestras se lavaron durante 3 h 30 min con acetona a -50 °C y se infiltraron en unas mezclas graduales de Lowicryl HM20 – acetona: 1:3 durante 3h; 2:2 o/n; 3:1 durante 7 h y Lowicryl HM20 (Electron Microscopy Science) durante 48 h. Las muestras se polimerizaron a -50 °C durante 24 h mediante irradiación ultravioleta indirecta (360 nm), seguida de un proceso de endurecimiento adicional a temperatura ambiente durante 48 h. Los cortes ultrafinos se obtuvieron con el ultramicrotomo Leica UCT (Leica Microsystems) y se depositaron en rejillas de cobre recubiertas con Formvar carbón. El inmunomarcaje con oro coloidal se llevó a cabo como se explica a continuación. A no ser que se especifique lo contrario, los lavados se realizaron flotando las rejillas boca abajo en gotas. Las rejillas con los cortes ultrafinos se hicieron flotar en tampón fosfato (PBS) 10 mM durante 3 min. Las rejillas se bloquearon con albumina de suero bovino (BSA) 5% (p/v; Sigma Aldrich) – PBS 10 mM (1 gota durante 3 min y una gota durante 12 min) y de nuevo con BSA 1% – PBS 10 mM (1 gota durante 8 s). A continuación, las rejillas se incubaron con el anticuerpo primario, una IgG policlonal diseñada específicamente contra la proteína utilizando la herramienta de diseño OptimumAntigen™ (GenScript Limited), diluido 1/100, durante 1 h. Las rejillas se lavaron durante 5 min en 5 gotas de Tween 20 0,25% (v/v) –PBS 10 mM seguido de BSA 1% – PBS 10 mM (1 gota durante 8 s). Seguidamente, las rejillas se incubaron durante 30 min con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con oro coloidal de 18 nm diluido 1/15 (Ref.111-215-144; Jackson). Las rejillas se lavaron durante 25 min en 5 gotas de PBS 10 mM y se hicieron flotar en 1% glutaraldehído (v/v)–PBS 10 mM durante 5 min. Las rejillas se

lavaron con agua bidestilada durante 10 min en 10 gotas y secadas con papel de filtro. Finalmente, las rejillas fueron contrastadas con acetato de uranilo 2% (p/v), lavadas con un chorro de agua bidestilada, teñidas con solución de Reynolds durante 1 min, lavadas de nuevo con un chorro de agua bidestilada y finalmente secadas al aire. Para comprobar la especificidad del inmunomarcaje se llevaron a cabo dos controles. En el primero, se omitió el anticuerpo primario anti- . En el segundo, se utilizó el suero pre-inmune de los conejos, obtenido antes de ser inoculados con el antígeno para producir el anticuerpo anti- . Las muestras se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company) a un voltaje de aceleración de 120 kV.

7. TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

7.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las preparaciones de DNA plasmídico y los productos de PCR obtenidos se separaron en función de su tamaño en geles de agarosa (Sigma) 1% disuelta en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, pH 7,6, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de bromuro de etidio. A las muestras se les añadió 0,2 volúmenes de tampón de carga 5x (azul de bromofenol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) antes de llevar a cabo su separación electroforética en la cubeta SCIE-PLAS HU13 Midi Horizontal (BioRad) aplicando un voltaje de 80 V con una fuente de alimentación Power Pac300 (BioRad) y con tampón TAE 1x.

Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen) que permite determinar el tamaño de los fragmentos de DNA de entre 100 y 12.000 pb.

7.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles de proteínas se hicieron de acuerdo a Sambrook & Russell (2001). La solución del gel de resolución se hizo con 5 ml de tampón de resolución 4x (Tris 1,5 M, pH 8,8), SDS 0,4% (p/v), 5 ml de agua destilada, 10 ml de solución de acrilamida ProtoGel (National diagnostics, 30% acrilamida) y 250 μl de persulfato de amonio 10% (p/v). Entonces se añadió a la mezcla 25 μl de n,n,n',n'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) y tras homogeneizarla se depositó entre los dos cristales del gel sellados con una goma hasta llegar a una altura de unos 2 cm desde el borde superior del gel. También se añadió una capa de agua destilada para nivelar el gel. El gel de apilamiento se preparó mezclando 2,5 ml de tampón de apilamiento

4x (Tris 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4% (p/v)), 5,5 ml de agua destilada, 2 ml de solución de acrilamida ProtoGel (National diagnostics, 30% acrilamida), 100 µl de persulfato de amonio y 20 µl de TEMED. Una vez que el gel de resolución polimerizó, se decantó la capa de agua que se le había añadido, se le añadió la mezcla del gel de apilamiento y se insertó en él un peine para cargar las muestras posteriormente.

Las muestras se mezclaron con tampón de muestra PAGE 2x (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, dithiothreitol, SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,2% (v/v), glicerol 20% (v/v)) y se hirvieron durante 10 min antes de realizar la electroforesis.

Una vez polimerizado el gel de apilamiento, se cargaron las muestras y los geles se corrieron en la cubeta Mini Protean Tetra Cell (BioRad) y la fuente de alimentación Power Pac Basic (BioRad) a 120 V durante 2 h con tampón de corrida PAGE 1x (Tris 25 mM, pH 8,5), glicina 200 mM, SDS 0,1% (p/v)).

Finalmente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Coomassie 0,25%, metanol 50% y ácido acético 10%) durante 1 h en agitación y posteriormente desteñidos o/n con solución de destinción (ácido acético 10% (v/v) y metanol 10% (v/v)) en agitación. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador SDS Page Molecular Weight Standard Broad Range (BioRad) que permite determinar el tamaño de proteínas de entre 6,5 y 200 kDa.

8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diversas sustancias se siguió el método de microdilución en caldo descrito por Wiegand y col. (2008) y las DO_{600} de los pocillos de las placas microtiter se midieron utilizando el lector Synergy HT (BioTek).

9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO G+C

El DNA genómico se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Wilson (1987) con modificaciones. El contenido G+C se determinó utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) tal y como describió Mesbah y col. (1989). Esta determinación fue realizada en el

Servicio de Identificación BCCM/LMG (Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie, University Ghent, Ghent, Belgium).

10. HIBRIDACIÓN DNA-DNA (DDH)

El DNA genómico

se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Wilson (1987) con modificaciones. Las hibridaciones DNA-DNA (DDH) se llevaron a cabo a 47 °C de acuerdo al método descrito por Ezaki y col. (1989) con las modificaciones de Goris y col. (1998) y Cleenwerck y col. (2002). Esta determinación fue realizada en el Servicio de Identificación BCCM/LMG (Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie, University Ghent, Ghent, Belgium).

11. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS CELULARES

Con el fin de identificar los ácidos grasos celulares

éstas se sembraron en placas de TSB suplementado con agar 1,5% y se incubaron 24 h a 28 °C. A partir de ellas se recogieron 40 mg de material celular húmedo y se determinó la composición de ácidos grasos celulares según el método descrito por Bozal y col. (2002). El análisis se llevó a cabo en el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya, en colaboración con Francesc García.

12. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS POLARES

12.1. Extracción de lípidos polares

La extracción de lípidos polares se hizo siguiendo el protocolo descrito por Tindall (1990) y Minnikin (1979). Partiendo de 50 mg de cultivo liofilizado los lípidos se extrajeron mediante una mezcla de cloroformo:metanol:NaCl 0,3% (p/v) en proporción 1:2:0,8 (v/v/v). Se dejaron los tubos o/n en agitación orbital a temperatura ambiente y se centrifugaron a 350 g durante 5 min para separar las dos fases. La fase superior se trasladó a un tubo limpio y se le añadió una mezcla de cloroformo:NaCl 0,3% (1:1, v/v). Después de centrifugar de nuevo (350 g, 5 min), se descartó la fase superior y la inferior se secó con nitrógeno gas. Los lípidos se redisolieron en cloroformo:metanol (2:1, v/v) y este

extracto resuspendido se utilizó para realizar las cromatografías en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC).

12.2. Cromatografía en capa fina bidimensional

Para llevar a cabo las TLCs se emplearon placas de silica gel de 10 x 10 cm (Merck) y una mezcla de cloroformo:metanol:agua (65:25:4, v/v/v) como fase móvil de la primera dimensión y de cloroformo:metanol:ácido acético:agua (80:12:15:4, v/v/v/v) para la segunda (Tindall, 1990). En cada placa se cargaron 15 µl de extracto lipídico en el punto de aplicación y una vez desarrolladas las dos dimensiones se realizaron los diferentes revelados para identificar químicamente los diferentes componentes lipídicos de la muestra (Tindall, 1990):

- Ácido fosfomolibdico (Sigma) al 5% (p/v) en etanol para revelar lípidos totales.
- Ninhidrina (Sigma) al 0,2% (p/v) en etanol para aminolípidos.
- Reactivo Phospray (Supelco) para fosfolípidos.
- Anisaldehído en ácido sulfúrico y acético (1:50:2, v/v/v) para la detección de azúcares (color verde), terpenos y ácidos grasos (color púrpura).
- α -Naftol al 2,3% (p/v) en una mezcla de etanol agua y ácido sulfúrico para detectar glucolípidos.
- Reactivo de Periodato-Schiff para la detección de glicerolípidos.

Los revelados con ninhidrina y Phospray son compatibles, de manera que se hicieron consecutivamente sobre la misma placa.

La determinación de lípidos polares se llevó a cabo en colaboración con el Centre de Recerca en Metabolisme (CEREMET) del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

13. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

13.1. Morfología

La morfología celular se determinó mediante tinción de Gram (Reddy y col., 2007) y también se llevaron a cabo tinciones negativas y técnicas criofijación y criosustitución para su observación en el microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company) a 120 kV.

13.2. Motilidad

La motilidad se determinó mediante el test de la gota pendiente y microscopía de contraste de fases (Reddy y col., 2007).

13.3. Producción de pigmentos

La producción de pigmentos se estudió sembrándolas en medio King B (King y col. 1954). Tras una incubación de 8 días a 32 °C se examinó la presencia de pigmentos mediante la observación de las placas bajo luz ultravioleta.

13.4. Pruebas bioquímicas

Las actividades oxidasa, catalasa, ureasa, la reducción de nitratos y la hidrólisis de caseína, lecitina, gelatina, DNA, glucógeno y Tween 80 se determinaron de acuerdo a Barrow & Feltham (1993).

La producción de ácido a partir de carbohidratos, la producción de enzimas y características adicionales se determinaron mediante las tiras de pruebas bioquímicas API 50 CH, API ZYM y API 20 NE (Biomérieux) y las microplacas Biolog GENIII (Biolog) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

14. OBTENCIÓN DEL EPS

15. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EPS

15.1. Determinación de carbohidratos totales

La determinación de carbohidratos totales se llevó a cabo por el método colorimétrico del fenol-sulfúrico descrito por Dubois y col. (1956).

15.2. Análisis de azúcares neutros

Con el fin de analizar su composición de azúcares neutros, el EPS se hidrolizó con 1% H₂SO₄ a 111 °C durante 0,5 h en un termobloque SBH200D (Stuart). El hidrolizado se utilizó para identificar y cuantificar los monosacáridos constituyentes mediante HPLC utilizando las columnas Aminex HPLC para análisis de carbohidratos HPX-87P (300 x 7,8 mm) y HPX-87C (300 x 7,8 mm) (BioRad). Como eluyente se utilizó agua miliQ a 85 °C a un flujo de 0,6 ml·min⁻¹, y la detección se realizó con un detector de índice de refracción Waters 2414 (Waters). Se utilizaron 15 azúcares y aminoazúcares como patrones para la identificación y cuantificación de los monosacáridos constituyentes del EPS. La determinación se realizó en colaboración con los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

15.3. Análisis elemental

La composición elemental del EPS fue analizada utilizando un analizador elemental orgánico Thermo EA 1108 (Thermo Scientific), trabajando en las condiciones estándares recomendadas por el proveedor del instrumento (flujo de helio a 120 ml·min⁻¹, horno de

combustión a 1.000 °C, horno de la columna cromatográfica a 60 °C, bucle de oxígeno 10 ml a 157 kPa). La determinación se realizó en colaboración con los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

15.4. Determinación del Peso Molecular

El peso molecular (M_r) del EPS fue determinado por Cromatografía de Exclusión por Tamaño (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) en un equipo de HPLC Waters 2695 equipado con una columna Ultrahydrogel 500 (7,8 x 300 mm; Waters) y un detector de índice de refracción diferencial (Waters 2414). Se utilizó NaNO_3 0,1 M a temperatura ambiente como eluyente con un flujo de $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Se utilizaron patrones de dextrano (Sigma-Aldrich) de M_r de entre $8,8 \times 10^3$ y 2×10^6 Da para calibrar la columna para la estimación del M_r . La determinación se realizó en colaboración con los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

15.5. Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR) del EPS fueron adquiridos con un microscopio FT-IR Thermo IN10MX (Thermo Scientific), utilizando un detector MCT enfriado con nitrógeno líquido. Todos los espectros fueron obtenidos en el modo de transmisión utilizando una célula de compresión de diamante Thermo (Thermo Scientific) en un área de $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, con una resolución de 4 cm^{-1} y 64 escáneres. La determinación se realizó en colaboración con los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

15.6. Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN)

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN) del EPS se obtuvieron en D_2O 99,96% (Euriso-top) a 25 °C usando un espectrómetro Varian VNMR500 (500 MHz, Varian Ltd.). La determinación se realizó en colaboración con los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

15.7. Determinación de ácidos urónicos

La determinación del contenido total de ácidos urónicos del EPS se realizó por el método meta-hidroxidifenil (Blumenkrantz & Asboe, 1973).

La presencia de ácido galacturónico y glucurónico en el EPS se analizó mediante HPLC. En primer lugar, se hidrolizó el EPS con 1% H₂SO₄ a 111 °C durante 30 min en un termobloque SBH200D (Stuart). A continuación se analizó la presencia de ácidos urónicos en el hidrolizado utilizando la columna Aminex para análisis de ácidos orgánicos (300 x 7,8 mm; BioRad) acoplada a un detector JASCO UV-1750 Intelligent UV/VIJ Detector (JASCO). Se empleó H₂SO₄ 10 mM a temperatura ambiente como eluyente a un flujo de 0,6 ml·min⁻¹. Como patrones para la identificación de los ácidos urónicos del EPS se utilizaron ácido glucurónico y ácido galacturónico (Fluka). Esta determinación se realizó en colaboración con los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

15.8. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales del EPS se realizó según el método Bradford (Bradford, 1976) con el kit BioRad Protein Assay (BioRad).

15.9. Análisis de aminoácidos

Tras hidrolizar el EPS con HCl 6 M a 110 °C durante 24 h en el termobloque SBH200D (Stuart), el hidrolizado fue utilizado para identificar y cuantificar los aminoácidos constituyentes con un analizador de aminoácidos Biochrom 30 (Biochrom) equipado con una columna de intercambio catiónico (200 x 4 mm) y derivatización post-columna con ninhidrina, según el método descrito por Spackman y col. (1958). Como eluyentes se utilizaron diferentes tampones de citrato de litio de fuerza iónica creciente y pH (Biochrom) a temperaturas de entre 34 °C y 80 °C. La detección de aminoácidos se llevó a cabo con un detector UV a 440 nm y 570 nm y como patrones se utilizaron 17 aminoácidos comerciales. La determinación se realizó en colaboración con los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

15.10. Determinación del contenido de DNA

Para determinar la concentración de DNA presente en el EPS se preparó una solución de éste al 0,06 % en agua destilada y se midió su absorbancia a $\lambda=260$ nm con el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu). Para cuantificar la concentración de DNA se utilizó la relación: 1 unidad $Abs_{260} = 50 \mu\text{g dsDNA} \cdot \text{ml}^{-1}$.

16. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DEL EPS

Para cuantificar la producción del EPS se tomaron 50 ml de cultivo y se centrifugaron a 40.000g, 30 min, a 4 °C para sedimentar las células. A continuación se alicuotaron 10 ml de los sobrenadantes en tubos para centrifuga Amicon 10K con membranas de diámetro de poro de 10 kDa (Millipore) y se centrifugaron en la centrifuga Beckman Avanti J-20 XPI rotor basculante JS-7,5 a 4.000g, 15 min, 10 °C. Seguidamente se descartó el filtrado mientras que el volumen de muestra no filtrado se lavó con agua destilada estéril en una proporción 1:10 para eliminar las sales y glucosa remanentes en el medio de cultivo. Esta operación se repitió cinco veces y se comprobó mediante tiras indicadoras de glucosa Medi-Test Glucose (Machery-Nagel) que no quedaban restos de glucosa en el filtrado. El volumen de muestra no filtrada se llevó a un volumen final de 1,5 ml con agua destilada estéril y se procedió a su cuantificación mediante dos métodos distintos: la determinación del peso seco y la cuantificación de carbohidratos totales como medida indirecta de la cantidad de EPS producido.

16.1. Determinación del peso seco del EPS

El volumen no filtrado de los sobrenadantes de los cultivos se trasladó a un recipiente de vidrio de peso conocido adecuado para la determinación de peso seco y se almacenó a 100 °C hasta llegar a peso constante. El peso del EPS se determinó por la diferencia de pesos del recipiente de vidrio antes y después de añadir la muestra, utilizando la microbalanza BP 61 (Sartorius).

16.2. Cuantificación de los carbohidratos totales del EPS

Para cuantificar los carbohidratos totales del EPS del sobrenadante de los cultivos se utilizó el método colorimétrico del fenol-sulfúrico (Dubois y col. 1956).

17. CARACTERIZACIÓN

17.1. Análisis

17.2. Reología

17.3. Potencial

18. MUTAGÉNESIS PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE EPS

NO

18.1. Mutagénesis por luz ultravioleta

Para llevar a cabo la mutagénesis al azar mediante luz ultravioleta (UV), se hizo una suspensión de _____ en Ringer de turbidez 1 de la escala McFarland. Esta suspensión se depositó en una placa de Petri de vidrio estéril y se irradió con luz UV durante

10 s, tiempo tras el cual se sembraron alícuotas de 50 µl en TSA. Mediante la mutagénesis de la cepa *S. aureus* por luz UV se obtuvieron varias colonias no mucosas, de las cuales se seleccionó una, denominada *S. aureus* 10, para realizar tinciones de cápsula y comprobar su fenotipo.

18.2. Mutagénesis por transposición

La mutagénesis por transposición de *S. aureus* se realizó empleando el kit EZ-Tn5™ <KAN-2> Tnp Transposome (Epicentre Biotechnologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células electrocompetentes transformadas con el transposón Tn5 acoplado con el enzima transposasa, se sembraron en placas de TSA suplementadas con kanamicina (20 µg·ml⁻¹). La mutagénesis de la cepa *S. aureus* con el transposón Tn5 produjo diversas colonias de apariencia no mucosa y se seleccionó una para comprobar su fenotipo, denominada *S. aureus* 11.

18.3. Tinciones de cápsula para comprobación de mutantes

Para confirmar que las colonias mutantes *S. aureus* no producían EPS en primer lugar se realizó la tinción de cápsula de Anthony (Anthony, 1931). Para llevarla a cabo se partió de una suspensión de la cepa salvaje y de las cepas mutantes *S. aureus* en BSA 30 mg·ml⁻¹. Se depositaron unas gotas de cada una de ellas sobre un portaobjetos y las preparaciones se dejaron secar al aire. Seguidamente, se tiñeron con solución de cristal violeta 1% (p/v) durante 2 min y se lavaron con solución de sulfato de cobre 20% (p/v) antes de su observación en el microscopio óptico Leica DM1000 (Leica Microsystems). Posteriormente se realizó una tinción con tetraóxido de rutenio tanto de la cepa salvaje como de las mutantes no productoras de EPS según el protocolo descrito en el apartado 6.4. de Materiales y Métodos para su observación en el microscopio electrónico.

19. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

19.1. Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA genómico de los microorganismos utilizados en el estudio de la producción de DMS se realizó de acuerdo a las instrucciones del kit Wizard Genomic DNA purification (Promega) para la extracción de DNA genómico de bacterias Gram negativas, y con las soluciones Nuclei Lysis, RNAsa y Protein Precipitation proporcionadas en él.

19.2. Amplificación de DNA

Para sintetizar DNA *in vitro* se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Mullis y col., 1986). Las reacciones de amplificación se realizaron con la polimerasa termoestable incluida en el reactivo MyFi™ Mix (Bioline). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador TC-512 (Techne). Asimismo, la mezcla típica de las reacciones de PCR se especifica en la Tabla 7.

Tabla 7. Mezcla típica de las reacciones de PCR.

Mezcla de reacción	
MyFi mix	25 µl
DNA molde	x µl
Cebador 1 (20 µM)	1 µl
Cebador 2 (20 µM)	1 µl
Agua destilada estéril	hasta 50 µl

El programa de amplificación que se utilizó de forma rutinaria se muestra en la Tabla 8. La temperatura de hibridación que se eligió en cada caso dependió de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores.

Tabla 8. Programa de reacción de PCR.

Reacción de PCR	
1 ciclo	95 °C durante 5 min
x 35 ciclos	95 °C durante 30 s
	Temperatura de hibridación (°C) durante 1 min
	72 °C durante 1 min 30 s
x 1 ciclo	72 °C durante 5 min
Mantenimiento	10 °C ∞

19.3. Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA procedentes de las reacciones de PCR se realizaron según las instrucciones del kit High pure PCR product purification (Roche Applied Science) y con los tampones Binding Buffer y Wash Buffer suministrados en él. Sin embargo, la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el

kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) con los tampones QG y PE proporcionados por el mismo.

19.4. Extracción de DNA plasmídico

19.4.1. Mini-preparaciones de DNA plasmídico mediante lisis alcalina y purificación fenol:cloroformo

Este método de extracción plasmídica se utilizó para obtener DNA plasmídico a pequeña escala (< 5 µg) y proporcionó DNA de pureza suficiente para ser utilizado en las digestiones con enzimas de restricción, PCR y transformaciones.

El procedimiento que se utilizó está basado en el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979), seguida de purificación con fenol:cloroformo y elución del DNA plasmídico. Para llevarla a cabo se siguieron las instrucciones del kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen) utilizando los tampones P1, P2 y P3 incluidos en él.

19.4.2. Midi-preparaciones de DNA plasmídico utilizando columnas Qiagen

La extracción de DNA plasmídico utilizando columnas Qiagen se realizó cuando se necesitaban grandes cantidades de DNA plasmídico de cepas de *E.coli* (>5 µg) de alta pureza para secuenciación esencialmente. Este procedimiento también está basado en el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) y comprende tres pasos: lisis alcalina, purificación por columna Qiagen y precipitación del DNA plasmídico. Con este procedimiento se obtenía rutinariamente un rendimiento de >70 µg de DNA plasmídico libre de RNA y proteínas. Los tampones P1, P2, P3, QBT, QC y QF fueron proporcionados en el kit Qiagen Plasmid Midi kit (Qiagen) y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

19.5. SECUENCIACIÓN DE DNA

19.5.1. Secuenciación de DNA plasmídico

La secuenciación de DNA plasmídico fue llevada a cabo por la empresa Eurofins Genomics (Alemania) mediante el método de terminación de cadena didesoxi (Sanger y Coulson, 1975).

19.5.2. Secuenciación del genoma

El DNA genómico de elevado peso molecular se extrajo con los kits Qiagen genomic tip 100/G y Qiagen buffer set (Qiagen). El DNA genómico se fragmentó utilizando los reactivos Ion Shear™ y después se realizó la reacción de ligación con adaptadores Ion, tal y como se describe en el manual Ion Xpress™ Plus gDNA Fragmentation Library Preparation (Life Technologies). Se preparó una librería de 400 pb mediante la selección de fragmentos de tamaño de entre 450-500 pb a partir de un gel de agarosa 2% (p/v). Las partículas Ion Sphere (ISPs) se marcaron utilizando el equipo Ion OneTouch™ 2 con el kit Ion PGM™ Template OT2 400 y se enriquecieron utilizando Ion OneTouch™ ES. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador Ion PGM™, un chip Ion 316™ v2 y el kit Ion PGM™ 400. El archivo fastq generado con las secuencias resultantes se ajustó utilizando Galaxy (<https://usegalaxy.org>). Los extremos de las secuencias se recortaron para eliminar todas las bases con puntuaciones de calidad inferiores a 50, así como también se recortaron todas las bases ambiguas de cada extremo. Las secuencias restantes se ensamblaron utilizando el programa Lasergene (DNASTAR) con las opciones de ensamblaje por defecto.

La secuenciación del genoma fue llevada a cabo por el Dr. Andrew Lang (Memorial University of Newfoundland, St. John's, NF, Canadá).

20. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

20.1. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA se llevaron a cabo con los enzimas de restricción y tampones (Roche Applied Science) adecuados para cada caso siguiendo las especificaciones del fabricante. Rutinariamente, se digirió 1 µg de DNA plasmídico en una reacción con tampón de restricción 1x y ~10 unidades de enzima de restricción en una reacción con un volumen final de 20 µl con dH₂O. En el caso de las digestiones dobles se utilizó un tampón adecuado para los dos enzimas de restricción.

20.2. Desfosforilación de vectores linearizados

Los vectores digeridos y linearizados se desfosforilaron previamente a su uso en las reacciones de ligación, utilizando el enzima rAPid fosfatasa alcalina (Roche Applied Science) y el tampón proporcionado por la casa comercial siguiendo sus instrucciones.

20.3. Ligación de fragmentos de DNA

Los productos de PCR purificados y digeridos se ligaron en los vectores digeridos y desfosforilados correspondientes usando el kit T4 ligase (Roche Applied Science) según sus instrucciones en una relación molar vector:inserto de 1:1, 1:3 y 1:7.

21. SISTEMAS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO

21.1. Transformación

E.coli se incubó en LB a 37 °C hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,3-0,4$. Llegado este punto, el cultivo se centrifugó a 6.000 rpm, 10 min, 4 °C en la centrífuga 5804R (Eppendorf), y los pellets se resuspendieron en 10 ml $CaCl_2$ 0,1 M. La suspensión se mantuvo en hielo durante 30 min y se centrifugó nuevamente a 6.000 rpm, 10 min, 4 °C. El pellet se resuspendió en 2 ml $CaCl_2$ 0,1 M y se prepararon alícuotas de 100 μ l de células competentes. A cada una de ellas se le añadió 10 μ l del DNA a transformar y se dejaron en hielo durante 1 h. Tras este tiempo se sometió a las células a un choque térmico en un baño a 42 °C durante 3 min y se volvieron a poner en hielo durante 2 min. Inmediatamente se añadieron a las células 500 μ l de LB y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Finalmente, los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 3 min en la centrífuga 5415D (Eppendorf) y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en el sobrenadante residual y se sembraron en placas de LB suplementadas con los antibióticos correspondientes.

21.2. Electroporación

se cultivó en LB a 28 °C hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,3-0,4$. En ese momento el cultivo se centrifugó a 6.000 rpm, 10 min, 4 °C. Los pellets se lavaron dos veces con 5 ml de agua destilada estéril fría y el pellet del último lavado se resuspendió con 100 μ l de glicerol 10% frío. Seguidamente, la suspensión se centrifugó a 12.000 rpm, 3 min y el pellet se resuspendió en 40 μ l de glicerol 10% frío. A las células se les añadieron 5 μ l del DNA a electroporar y se mantuvieron en hielo durante 1 h. La electroporación se realizó con el electroporador MicroPulserTM (BioRad) y tras ella las células se resuspendieron en 1 ml de LB y fueron incubadas a 28 °C durante 2 h. Finalmente, los cultivos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en el sobrenadante residual y se sembraron en placas de LB suplementadas con los antibióticos correspondientes.

21.3. Conjugación triparental

Los cósmidos y los plásmidos se transfirieron de la cepa donadora a la cepa receptora mediante conjugación triparental utilizando los métodos de la conjugación triparental en soporte de filtro o *filter cross* (Beringer y Hopwood, 1976) o de la conjugación triparental por estría cruzada o *patch cross* (Johnston y col., 1978). En ambos casos se utilizó como cepa movilizadora o *helper E.coli* 803 con el plásmido *helper* pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979).

21.3.1. Conjugación triparental en soporte de filtro o *filter cross*

Las cepas donadora, *helper* y receptora utilizadas en la conjugación triparental se cultivaron en los medios y temperaturas adecuadas indicadas en el apartado 3 de Materiales y Métodos. Para realizar la conjugación triparental se tomó 1 ml del cultivo de la cepa donadora, se centrifugó a 12.000 rpm, 3 min y el pellet se lavó tres veces con LB para eliminar los restos de antibióticos del medio de cultivo. Al pellet del último lavado se le añadieron 0,5 ml del cultivo de la cepa *helper* y 1 ml del cultivo de la cepa receptora. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm, 3 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con el volumen de sobrenadante residual y éste se transfirió a un filtro estéril de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro (Whatman) que se depositó en una placa del medio rico correspondiente (LB o TY). Tras una incubación o/n a 28 °C, el filtro se lavó con 1 ml glicerol 50%, se hicieron las diluciones seriadas apropiadas y se sembraron en placas de LB o TY suplementadas con los antibióticos adecuados.

21.3.2. Conjugación triparental por estría cruzada o *patch cross*

Para llevar a cabo las conjugaciones triparentales vía *patch cross* se mezclaron varias asas de Kolle con biomasa de la cepa donadora, *helper* y receptora en una placa del medio rico correspondiente (LB o TY). Esta placa se incubó o/n a 28 °C antes de que la mezcla se estriara en LB o TY suplementado con los antibióticos adecuados.

22. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE AZUFRE (VOSCs) Y DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Las cepas se cultivaron en TSA inclinado en viales de cromatografía de gases para muestreo de cabeza gaseosa (vapor

sobrenadante o *headspace*) de 20 ml (Chromlab) durante 72 h a 15 °C. Los VOSCs producidos se analizaron mediante microextracción en fase sólida (*Solid-phase microextraction*, SPME) utilizando una fibra de carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, Supelco) acoplada a un cromatógrafo de gases – espectrómetro de masas (GC-MS) Trace GC Ultra + DSQII, Thermo Scientific y una columna capilar de 1,8 µm DB-624 (60 m x 0,32 mm, Agilent Technologies).

23. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE DIMETILSULFURO (DMS) Y METANOTIOL (MeSH)

Para medir la producción de DMS y MeSH en *Pseudomonas* spp., *R.leguminosarum*, *B.diazoefficiens* USDA 110, se hizo un cultivo o/n de cada cepa, y de una semana para *Cyanothece* sp. ATCC 51142, en su medio mínimo adecuado, el cual contenía o no DMSP 5 mM; MeSH 0,5 mM; MMPA 2 mM o metionina 5 mM según las necesidades. Los cultivos de *Pseudomonas* spp., *R.leguminosarum* y *B.diazoefficiens* USDA 110 se ajustaron a una $DO_{600}=0,3$ y las células se diluyeron 1/10 en 300 µl del mismo medio mínimo suplementado con los aditivos mencionados anteriormente e incubados en viales a 28 °C durante 48 h antes de ensayar la producción de DMS y MeSH. En el caso de *Cyanothece* sp. ATCC 51142, se centrifugaron 300 µl de cultivo y se resuspendieron en el mismo volumen de medio fresco en viales sellados de 2 ml, los cuales fueron incubados o/n a 26 °C como se menciona anteriormente, antes de ser ensayados para cuantificar la producción de DMS y MeSH. Finalmente, las cepas de *E.huxleyi* se cultivaron como se detalla en el apartado 3 de Materiales y Métodos y la producción de DMS en el *headspace* de los viales se monitorizó durante 2 semanas. Aquellas cepas de *E.huxleyi* que produjeron niveles detectables de DMS se incluyen en la Tabla 24.

Las cepas de *E.coli* BL21 que contenían los diferentes genes clonados, se cultivaron en LB a 37 °C hasta alcanzar una $DO_{600}=0,8$. Las células se diluyeron 1/10 en 300 µl de medio M9 con IPTG 100 µM y MeSH 0,5 mM en viales de 1,5 ml. Los viales se incubaron a 28 °C durante 18 h antes de cuantificar la producción de DMS y MeSH.

La producción de DMS y MeSH en el *headspace* de los viales se cuantificó mediante cromatografía de gases utilizando un detector fotométrico de llama 7890A GC con una

columna capilar HP-INNOWax 30 m x 0,32 mm (Agilent Technologies) y utilizando una recta de calibración de ocho puntos con estándares de DMS y MeSH. El contenido proteico se determinó mediante el método de Bradford con el kit BioRad Protein Assay (BioRad) y las tasas de producción de DMS y MeSH se expresaron como $\text{pmol} \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

24. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE DMSP

se cultivó en medio M9 en presencia y ausencia de DMSP 1 mM durante 24 h a 28 °C. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó y se analizó la cantidad de DMSP en el sobrenadante de los cultivos respecto a los controles del medio mediante su conversión a DMS por adición de NaOH a las muestras contenidas en viales de cromatografía de gases de 2 ml (12 × 32 mm, Alltech Associates). El DMS formado a partir del DMSP remanente en los sobrenadantes se cuantificó mediante cromatografía de gases según el apartado 23 de Materiales y métodos.

25. CONSTRUCCIÓN DE LA LIBRERÍA GENÓMICA

25.1. Preparación del vector pLAFR3

Para construir la librería genómica se preparó el cósmido pLAFR3 utilizando el kit Qiagen midiprep (Qiagen). Se digirieron 25 μg de pLAFR3 en un volumen final de 250 μl con 5 μl de *EcoRI* (Roche Applied Science) durante 4 h a 37 °C. A continuación el cósmido pLAFR3 se corrió en un gel de agarosa para comprobar que estaba totalmente digerido. Una vez comprobado, se hizo una extracción fenol:cloroformo y precipitación con etanol del cósmido digerido. La desfosforilación del mismo se realizó utilizando rAPid fosfatasa alcalina (Roche Applied Science) y una incubación o/n a 37 °C. Se repitió de nuevo la extracción con fenol:cloroformo dos veces y se volvió a precipitar el cósmido digerido y desfosforilado con etanol. Finalmente, el cósmido se resuspendió en 50 μl de agua destilada estéril. El vector pLAFR3 se religó y con él se transformaron células competentes de *E.coli* 803 y no se obtuvieron transformantes en las placas de LB con tetraciclina, lo cual indicó que era apto para la ligación con los fragmentos de DNA genómico

25.2. Preparación del DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico se utilizaron los kits Qiagen genomic tip 100/G y Qiagen buffer set (Qiagen). A continuación se digirieron alícuotas de 30 µl de DNA genómico con 5 µl de la dilución 1:10 de *EcoRI* (Roche Applied Science) en reacciones con un volumen final de 100 µl. Se tomaron alícuotas de 10 µl a diferentes tiempos y se transfirieron a eppendorfs con 5 µl de tampón de carga y acto seguido se congelaron con N₂ líquido para parar la reacción. Las alícuotas de los diferentes tiempos se corrieron en un gel de agarosa para comprobar que el DNA genómico había sido digerido y determinar cuál era el tiempo de digestión necesario para obtener fragmentos de entre 25 y 30 kb.

Posteriormente, se repitió la reacción de digestión con 10 µg de DNA genómico y un volumen final de 100 µl durante el tiempo de incubación seleccionado, tras el cual se añadió a la muestra 200 µl de etanol 100 % y 10 µl de acetato de sodio 3 M (pH 4,8) y se congeló en N₂ líquido para parar la reacción. Después se descongeló la muestra, se precipitó el DNA con el etanol y se resuspendió en agua destilada estéril.

25.3. Reacción de ligación

La reacción de ligación se realizó utilizando 2,5 µg de DNA genómico digerido y 1 µg de pLAFR3 digerido y desfosforilado en una reacción con un volumen final de 40 µl utilizando el enzima T₄ ligasa (Promega). Tras un periodo o/n a 4 °C, la ligación se precipitó con etanol 100% y posteriormente se resuspendió en agua destilada estéril.

25.4. Empaquetamiento

El empaquetamiento del cósmido con el DNA genómico ligado y la infección de *E.coli* 803 se llevó a cabo utilizando el kit Gigapack III XL Packaging mix (Stratagene) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

25.5. Amplificación y conservación de la librería genómica

La librería se amplificó mediante la infección repetida de la cepa *E.coli* 803 con la mezcla de empaquetamiento adecuada. Una vez se completó la amplificación se añadió 1 ml de LB a las placas con los transfectantes para recoger la biomasa y se hicieron varias alícuotas para su congelación a -80 °C combinándolas con un 25% de glicerol.

25.6. Comprobación de la librería genómica

Para comprobar que los clones de la librería genómica eran correctos se seleccionaron diez clones a los que se les hizo una extracción de DNA plasmídico según se describe en el apartado 19.4.1. de Materiales y Métodos. El DNA plasmídico se digirió con *EcoRI* (enzima con el que se digirió el vector pLARF3 y el DNA genómico) para comprobar que todos los vectores tenían un inserto de entre 25 y 30 kb y con *BamHI* (Roche Applied Science) para comprobar que había diversidad entre los fragmentos de DNA genómico clonados y por tanto, que el genoma estaba bien representado en la librería.

La construcción de la librería genómica se realizó en colaboración con el Dr. Andrew Curson (School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, Reino Unido).

26. MUTAGÉNESIS DEL GEN

26.1. Mutagénesis del cósmido pBIO2219

El cósmido pBIO2219, el cual contiene el gen y la región adyacente de DNA genómico de , se mutagenizó con el transposón *Tn5lacZ*. El *Tn5lacZ* es un derivado de *Tn5* que contiene el gen reportero *lacZ* y que se utiliza para crear mutaciones por inserción al azar. Para llevar a cabo la mutagénesis de pBIO2219, éste se transformó en *E.coli* A118, la cual contiene una copia cromosómica de *Tn5lacZ*, y la transformación se sembró en placas de LB suplementado con kanamicina ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y tetraciclina ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Los transformantes de *E.coli* A118 que contenían pBIO2219 se utilizaron como cepa donadora en una conjugación triparental vía *filter cross* con *R.leguminosarum* J391 como cepa receptora y *E.coli* 803 con pRK2013 como cepa *helper*. Sembrando las conjugaciones en placas selectivas de TY con estreptomina ($400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kanamicina ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y tetraciclina ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), fue posible aislar transconjugantes de *R.leguminosarum* que contenían pBIO2219 con el *Tn5lacZ* insertado en diferentes posiciones al azar. Los transconjugantes se inocularon en 300 μl de medio Y suplementado con MeSH 0,5 mM y se analizó cuáles de ellos habían perdido la capacidad de producir DMS. La inserción de *Tn5lacZ* en pBIO2220 fue localizada de manera precisa en el gen por secuenciación utilizando el primer *lacZ* (Tabla 6).

26.2. Intercambio de marcadores

El cósmido pBIO2220 se electroporó en *E. coli* J564 y λ ::Tn5lacZ se introdujo su genoma mediante intercambio de marcadores conjugando el plásmido del grupo de incompatibilidad P1 pPH1JI (gm^R) para eliminar el cósmido basado en pLAFR, tal y como describieron Downie y col. (1983). Para introducir el plásmido auto-transmisible pPH1JI en *E. coli* J564 se hizo un *patch cross* en el que la cepa de *E. coli* 803 con pPH1JI actuó como cepa donadora y *E. coli* J564 con pBIO2220 como cepa receptora. Los transconjugantes de *E. coli* J564 λ (J566) se seleccionaron por su resistencia a gentamicina ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kanamicina ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y sensibilidad a tetraciclina y se confirmaron por PCR y Southern blot.

27. MUTAGÉNESIS DEL GEN *megL*

Para la mutagénesis dirigida del gen metionina gamma liasa (*megL*) en *E. coli* J564 se clonó un fragmento interno de 0,5 kb del mismo en el plásmido suicida pBIO1879, dando lugar a pBIO2221 (Tablas 5 y 6). Éste se electroporó en *E. coli* J564 (rifampicina^R) y los clones recombinantes se seleccionaron sembrándolos en LB suplementado con espectinomicina ($800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y kanamicina ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). La mutación por inserción en el DNA genómico en *E. coli* *megL*⁻ (J565) se confirmó mediante PCR.

28. SOUTHERN BLOT

28.1. Marcaje de la sonda

Tanto el marcaje de la sonda como el protocolo de Southern blot se realizaron utilizando el kit DIG High Prime Labelling and Detection Starter (Roche Applied Science) siguiendo las instrucciones del fabricante y las soluciones proporcionadas en él.

Como sonda se utilizó el producto de PCR purificado del gen *megL*. Para el marcaje de la sonda, se tomó una alícuota de 16 μl del producto de PCR purificado y se incubó a 110 °C durante 10 min para desnaturalizar el DNA, seguido de un enfriamiento rápido en hielo para evitar su renaturalización. Entonces se añadieron 4 μl de DIG High prime, y se incubó o/n a 37 °C para obtener un marcaje eficiente de la sonda con digoxigenina. Tras la incubación, la sonda se guardó a -20 °C hasta su utilización.

28.2. Preparación del DNA genómico

En primer lugar, se digirió el DNA genómico salvaje y del mutante (J566) con el enzima de restricción *EcoRI* (Roche Applied Science), tras lo cual las digestiones se corrieron en un gel de agarosa y éste fue fotografiado junto a una regla para permitir la identificación de las bandas de DNA después del marcaje. Posteriormente, el gel se lavó en agua destilada durante 30 s, se sumergió en HCl 0,2 M durante 15 min para despurinizar el DNA y se volvió a lavar con agua destilada durante 30 s. A continuación el gel se sumergió en una solución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M durante 30 min para desnaturar el DNA y posteriormente se lavó con agua destilada durante 30 s. Tras esto, el gel se sumergió en solución Tris-HCl 1 M (pH 8), NaCl 1,5 M durante 20 min para neutralizarlo y finalmente se lavó con agua destilada.

28.3. Transferencia del DNA

El DNA del gel de agarosa se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amersham) por capilaridad ascendente tal y como se describe en Sambrook y col. (1989), utilizando como tampón de transferencia el tampón SSC 10x (NaCl 1,5 M, citrato trisódico 150 mM, pH 7). Después de la transferencia o/n del DNA, la membrana de nylon se lavó durante 30 s con tampón SSC 2x y se dejó secar al aire. Posteriormente, el DNA se fijó a la membrana de nylon utilizando un equipo UV Stratalinker 2400 (Stratagene).

28.4. Hibridación de la sonda

La membrana de nylon se introdujo en una bolsa de hibridación (Amersham Biosciences) a la que se añadieron 20 ml de solución DIG Easy Hyb pre-calentada a 42 °C antes de sellarla. Esta bolsa se incubó 30 min a 42 °C en agitación. Paralelamente, se desnaturizó la sonda a 110 °C durante 10 min y se añadió inmediatamente a una alícuota de 10 ml de solución DIG Easy Hyb. Una vez hecho esto, se abrió la bolsa de hibridación, se descartaron los 20 ml de DIG Easy Hyb y se añadieron los 10 ml de DIG Easy Hyb con la sonda. A continuación, la bolsa de hibridación se selló nuevamente y se incubó a 42 °C o/n en agitación.

Después de la hibridación, el filtro se lavó dos veces durante 5 min con una solución SSC 2x y SDS 0,1% (p/v) a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 min con una solución SSC 0,1x y SDS 0,1% (p/v) a 68 °C.

28.5. Detección

La membrana de nylon se lavó durante 30 s en tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, Tween 20 0,3% (v/v)) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con tampón de bloqueo (Dilución 1:10 de la solución Blocking Solution del kit en ácido maleico 0,1 M y NaCl 0,15 M, pH 7,5). Transcurrido este tiempo, el tampón de bloqueo se sustituyó por 20 ml de tampón de bloqueo fresco con 4 μ l de anticuerpo DIG-Ap. La membrana se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con esta solución y posteriormente se lavó dos veces con tampón de lavado durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se hizo un lavado de 5 min con tampón de detección (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1 M, pH 9,5), tras el cual la membrana se incubó con solución de sustrato de color (200 μ l de NBT/BCIP en 10 ml de tampón de detección) en oscuridad hasta la aparición de bandas. La reacción se paró añadiendo dH₂O a la membrana de nylon.

29. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD GFP

Para ensayar la actividad de la fusión traduccional λ ::eGFP se llevó a cabo el protocolo descrito por Fontaine y col. (2011). La cepa mutante λ J566 (control) y la cepa mutante J566 con el plásmido pBIO2235 (plásmido con la fusión λ ::eGFP clonada) se incubaron o/n a 28 °C en medio M9. Los cultivos se ajustaron a una DO₆₀₀= 0,2, se indujeron con IPTG 0,5 mM y se incubaron a 28 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀= 0,4. Los cultivos se centrifugaron a 6.000 rpm, 15 min y los pellets se resuspendieron en 500 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM y EDTA 15 mM (pH 8). Las muestras se incubaron 30 min a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se alicuotaron 100 μ l de muestra por pocillo en una placa microtiter y se midió la fluorescencia emitida en el lector de placas microtiter Synergy HT (BioTek) con λ_{ex} = 490 nm y λ_{em} = 520 nm. A los resultados obtenidos por J566 con el plásmido pBIO2235 se les sustrajo los valores de J566 (control) y los resultados obtenidos se normalizaron por la concentración de proteínas determinada por el método de Bradford con el kit BioRad Protein Assay (BioRad).

30. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA

La actividad de la fusión traduccional λ ::PhoA se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Fontaine y col. (2011) con los reactivos suministrados en el kit Alkaline Phosphatase Assay Colorimetric (Abcam). La cepa mutante λ J566 (control) y la cepa

mutante J566 con el plásmido pBIO2238 (plásmido con la fusión β -galactosidasa::PhoA clonada) se incubaron o/n a 28°C en M9. Los cultivos se ajustaron a una $DO_{600} = 0,2$, se indujeron con IPTG 0,5 mM y se incubaron a 28 °C hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,4$. En este punto se tomaron alícuotas de 1 ml de cada cultivo y los pellets se lavaron tres veces con tampón Tris-HCl 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM frío (pH 8). El pellet del último lavado se resuspendió en 1 ml de tampón Tris-HCl 1M (pH 8). En cada pocillo de una placa microtiter se alicuotaron 80 μ l de esta suspensión a los que posteriormente se añadieron 50 μ l de reactivo p-nitrofenil fosfato (pNPP). Tras una incubación de 1 h en oscuridad a 25 °C se añadieron 20 μ l de solución stop para parar la reacción. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a $\lambda = 405$ nm en el lector de placas microtiter Synergy HT (BioTek). A los resultados obtenidos por J566 con el plásmido pBIO2238 se les sustrajo los valores de J566 (control) y los resultados obtenidos se normalizaron por la concentración de proteínas determinada por el método de Bradford con el kit BioRad Protein Assay (BioRad).

31. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

El promotor del gen β -galactosidasa se clonó en el plásmido reportero *lacZ* pBIO1878 dando lugar a pBIO2232 (Tablas 5 y 6). Este constructo se transformó en *E. coli* mediante electroporación y los transformantes se cultivaron o/n bajo diversas condiciones y se registró su DO_{600} antes de determinar la actividad β -galactosidasa siguiendo el protocolo descrito por Wexler y col. (2001). Concretamente, se tomaron 0,5 ml de cultivo y se les añadieron 0,5 ml de tampón Z, 2 gotas de cloroformo y 1 de SDS 0,1% (p/v) y las muestras se vortearon durante 10 s. A continuación se incubaron a 28 °C durante 5 min antes de añadir 0,2 ml de O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG, Sigma, 4 mg·ml⁻¹) a cada una de ellos. Cuando se observó coloración amarillenta en las muestras se paró la reacción añadiendo 0,5 ml de Na_2CO_3 . Seguidamente, éstas se centrifugaron durante 3 min a 13.000 rpm para sedimentar la debris celular y se midió la DO_{420} de los sobrenadantes con el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).

La actividad β -galactosidasa, en unidades de Miller, se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades de Miller} = \frac{1000 \times \text{DO}_{420}}{t \times V \times \text{DO}_{600}}$$

t = tiempo de reacción (min)
V = volumen de cultivo utilizado (ml)

El tampón Z estaba compuesto por 1 ml Na₂HPO₄·7H₂O 3 M, 0.5 ml NaHPO₄·7H₂O 4 M, 0,5 ml KCl 1 M, 0,5 ml MgSO₄·7H₂O 0,1 M, 175 µl mercaptoetanol, llevados a un volumen final de 50 ml con dH₂O.

32. SÍNTESIS DE QUÍMICOS

El dimetilsulfoniopropionato (DMSP) utilizado en los distintos experimentos fue fabricado mediante síntesis interna siguiendo el protocolo descrito por Todd y col. (2010). El metil mercaptopropionato (MMPA) empleado en este trabajo también fue sintetizado en el laboratorio de acuerdo al método descrito por Wackett y col. (1987).

33. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

33.1. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores citados en la Tabla 6 se hizo manualmente de acuerdo a las necesidades de cada caso y fueron sintetizados por la empresa Eurofins Genomics (Alemania).

33.2. Análisis de secuencias de DNA plasmídico

El análisis de las secuencias procedentes de la secuenciación de DNA plasmídico se realizó con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, Altschul y col. 1997) y Artemis v14.0.0 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>).

33.3. Análisis de la secuencia de los genes 16S rRNA y *rpoD*

La extracción del DNA genómico se realizó de acuerdo al protocolo de Niemann y col. (1997). Para determinar su posición filogenética en primer lugar se amplificó y secuenció una región de 1.452 pb del gen 16S rRNA siguiendo el protocolo descrito por Bozal y col. (2002). Como segundo marcador molecular se seleccionó el gen *rpoD*, cuya amplificación de una región de 900 pb y secuenciación se llevó a cabo según el protocolo descrito por Yamamoto & Harayama (1998).

Los alineamientos de las secuencias, los cálculos de la matriz de distancias y el análisis filogenético de las secuencias de ambos genes

obtenidas de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), se realizaron con el paquete informático MEGA versión 4.0 (Tamura y col. 2007).

Los árboles filogenéticos de acuerdo a las secuencias de los genes 16S rRNA y *rpoD* se reconstruyeron con el método *neighbour-joining* y se evaluó su robustez topológica mediante el análisis de *bootstrap* basado en 1.000 réplicas.

33.4. Análisis del genoma

La tecnología Ion torrents permitió secuenciar el 99% del genoma (apartado 19.5.2. de Materiales y Métodos). Éste comprende 1,4 Mpb en 7.247 *contigs*. Estos *contigs* fueron analizados para detectar pautas abiertas de lectura (*Open Reading Frames*, ORFs) utilizando el servidor Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST, Aziz y col. 2008). La base de datos generada se almacenó y se analizó mediante los programas Artemis v14.0.0 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>) y BioEdit v7.1.3.0 (Hall, 1999) y se buscaron genes de interés utilizando Blast (Altschul y col., 1997).

33.5. Alineamiento de secuencias proteicas e identificación de dominios conservados

Las secuencias de las proteínas de *Pseudomonas* sp. GM41 (), *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (), *B.diazoefficiens* USDA 110 () y (), *M.tuberculosis* H37Rv (), *M.maris* MCS10 (), and *Sulfurovum* sp. NBC37-1 () y la proteína S-isoprenilcisteína metiltransferasa Ste14p de *S.cerevisiae* () se alinearon con el programa ClustalW incluido en el paquete informático MEGA versión 6.0 (Tamura y col. 2013) y se analizaron para detectar dominios conservados con el programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997).

33.6. Análisis filogenético de la proteína

Los alineamientos de las secuencias, los cálculos de la matriz de distancias y el análisis filogenético de la proteína se realizaron con el paquete informático MEGA versión 6.0 (Tamura y col. 2013). Para construir el árbol filogenético se utilizaron secuencias con una

homología $\geq 40\%$ con la proteína de proporcionadas por Blast (Altschul y col., 1997) y se empleó el método *neighbour-joining* y el modelo de sustitución de aminoácidos Jones-Taylor-Thornton (JTT). La robustez topológica del árbol filogenético se evaluó mediante el análisis de *bootstrap* basado en 1.000 réplicas.

33.7. Análisis de la abundancia de en diversos metagenomas

Para analizar la abundancia de en diversos ambientes, se realizó un blastp (Altschul y col. 1997) con las secuencias ratificadas de de los diferentes clades bacterianos y varias bases de datos de péptidos creadas a partir de secuencias metagenómicas descargadas de CAMERA y MG-RAST (Tabla 9).

Las secuencias se recuperaron de la base de datos utilizando un valor E de $<1e^{-30}$ como valor de corte. El número de *hits* únicos de se normalizó por el número de secuencias únicas RecA (utilizando 120 secuencias RecA de la base actualizada de Toulza y col., 2012) (Tabla 10). Se siguió una estrategia similar para procesar las secuencias de DmdA y DddD,L,P,Q,W utilizando también secuencias de proteínas ratificadas como secuencias de búsqueda en las bases de datos.

El análisis de la presencia de la proteína en los diferentes metagenomas se hizo en colaboración con el Dr. Deepak Kumaresan (School of Earth and Environment, University of Western Australia, Crawley, Australia).

Tabla 9. Información sobre los metagenomas utilizados en este estudio. Las secuencias de péptidos se descargaron de los metagenomas mencionados descargados de las bases de datos CAMERA o MG-RAST.

Metagenoma / Proyecto	N° acceso	Bioma	Localización	N° total secuencias base de datos	Base de datos
Suelo Rothamsted	4453247.3	Praderas templadas	Rothamsted, Reino Unido	1.166.789	MG-RAST
Global Ocean Sampling (GOS)	CAM_PROJ_GOS	Marino	Varios	41.146.566	CAMERA
Suelo forestal	4446153.3	Suelo	Suelo forestal Laquillo, Puerto Rico	689.464	MG-RAST
Rizosfera arroz	4449956.3	Suelo	Los Baños, Filipinas	1.072.868	MG-RAST
Filosfera arroz	4450328.3	Filosfera	Los Baños, Filipinas	2.293.878	MG-RAST
Suelo granja Waseca	CAM_PROJ_Farm Soil	Suelo	Minnesota, Estados Unidos	183.297	CAMERA
<i>Bloom</i> primavera Atlántico Norte	CAM_PROJ_BATS	Marino	Mar Sargasso	3.005.827	CAMERA
Bahía Monterrey	CAM_PROJ_Monterey Bay	Costero	California, Estados Unidos	2.528.595	CAMERA
Lodo extracción de fósforo	CAM_PROJ_EBPRSludge	Lodo	Brisbane, Australia	313.657	CAMERA

Tabla 10. Número de secuencias únicas con un valor $<e^{-30}$ de las proteínas Ddd, DmdA y RecA de los metagenomas indicados en la columna 1.

Metagenoma	DmdA		DddD	DddP	DddQ	DddW	DddL	RecA
Suelo Rothamsted	2	30	0	19	0	0	0	153
Global Ocean Sampling (GOS)	750	3	12	810	182	3	43	3.064
Suelo forestal	0	23	1	2	0	0	0	109
Rizosfera arroz	2	6	1	0	0	0	0	208
Filosfera arroz	0	1	8	0	0	0	0	293
Suelo granja Waseca	0	13	0	0	0	0	0	17
<i>Bloom</i> primavera Atlántico Norte	14	0	0	14	0	0	0	99
Bahía Monterrey	26	1	0	33	0	0	0	193
Lodo extracción de fósforo	2	0	0	2	0	0	1	65

33.8. Análisis de la expresión del gen *hsp70* de *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *B.diazoefficiens* USDA 110 y *M.tuberculosis* H37Rv

Los datos de expresión génica de *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *B.diazoefficiens* USDA 110 y *M.tuberculosis* H37Rv disponibles públicamente en GEO (NCBI) se analizaron para identificar aquellas condiciones que comportasen cambios significativos en la expresión del gen *hsp70*. Los datos de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 y *B.diazoefficiens* USDA 110 se analizaron usando GEOR2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r>). Los datos de *M.tuberculosis* H37Rv se analizaron utilizando la base de datos de expresión TB (<http://www.tbdb.org/tbdbPages/expressionData.shtml>). Se consideraron condiciones que variaban significativamente la expresión de *hsp70* aquellas en las que el gen se sobreexpresó o reprimió >2 veces en >2/3 de las réplicas en experimentos con muestras tomadas a diferentes tiempos.

33.9. Análisis estructura y localización de *hsp70* *in silico* o mediante simulación computacional

Para determinar la estructura y localización de la proteína *hsp70* se analizó su secuencia con los programas informáticos que se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Programas informáticos utilizados para el estudio de la estructura y localización de la proteína en

Programa	Institución	Referencia
MPex	University of California, Irvine	Snider y col., 2009
Optimum Antigen	Genscript, Hong Kong	http://genscript.be/antigen_design.html
Predict Protein	Technical University of Munich, Germany	Rost y col., 2004
PRED-TMR2	University of Athens, Greece	Pasquier & Hamdrakas, 1999
PSIPRED v.2.3.	University College London, United Kingdom	McGuffin y col., 2000
TMHMM Server v.2.0.	Center for Biological Sequence Analysis (CBS), Denmark	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0
TMPred	European Molecular Biology Network, Swiss node	Hofmann & Stoffel, 1993
TOP Pred	Institute Pasteur, France	http://mobyte.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred
SACS MEMSAT2	University of California, San Diego	Jones y col., 1994
Split Server	University of Split, Croatia	Juretic y col., 2002

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Para la clasificación taxonómica se siguió el esquema de taxonomía polifásica vigente que incluyó las pruebas y resultados que siguen a continuación.

1.1. Análisis de la secuencia de los genes 16S rRNA y *rpoD*

La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA se realizó de acuerdo al apartado 33.3. de Materiales y Métodos.

(Figura 6).

(Tabla 12).



Resultados y Discusión

Figura 6. Árbol *neighbour-joining* basado en las secuencias del gen 16S rRNA

Los números de acceso de GenBank están indicados entre paréntesis. La barra representa 0,005 sustituciones por posición de nucleótido. Los valores de *bootstrap* $\geq 50\%$ (basado en 1.000 réplicas) se muestran en los puntos de ramificación.

Debido a la baja resolución del gen 16S rRNA a nivel intragenérico, se analizó el gen conservado , el *rpoD*, de acuerdo al apartado 33.3. de Materiales y Métodos.

Por otra parte, el árbol filogenético del gen *rpoD* se construyó utilizando el método del *neighbour-joining* y el modelo de sustitución de nucleótidos Jukes-Cantor (Figura 7).



Figura 7. Árbol filogenético *neighbour-joining* basado en las secuencias del gen *rpoD*

Los números de acceso de GenBank se indican entre paréntesis.

La barra representa 0,02 sustituciones por posición de nucleótido. Los valores de *bootstrap* $\geq 50\%$ (basado en 1.000 réplicas) se muestran en los puntos de ramificación.

1.2. Determinación del contenido G+C

El contenido G+C del DNA genómico se determinó de acuerdo al apartado 9 de Materiales y Métodos, obteniendo un resultado de 58,3 mol%.

1.3. Hibridación DNA-DNA

El DNA genómico se hibridó con el DNA según el apartado 10 de Materiales y Métodos obteniendo unos valores de reasociación bajos

1.4. Ácidos grasos celulares

Los ácidos grasos celulares se determinaron según se detalla en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Los ácidos grasos celulares principales

se muestran en la Tabla 13.

(Tabla 13).

Tabla 13. Composición de ácidos grasos celulares

Los valores que se muestran en la tabla son los porcentajes respecto al contenido total de ácidos grasos celulares. Cepas:

Solo se representan los ácidos grasos celulares con porcentajes $\geq 1\%$. tr, traza ($<1\%$); - no detectado.

Ácido graso	1	2	3	4	5

1.5. Lípidos polares

Los lípidos polares se identificaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

(Figura 8).



Figura 8. TLC bidimensional de los lípidos polares

1.6. Caracterización fenotípica

1.6.1. Morfología

(Figura 9).

(Tabla 14).



Figura 9. Imagen de MET de una tinción negativa . Barra, 1 μ m.

1.6.2. Motilidad

La motilidad se determinó mediante el test de la gota pendiente y microscopía de contraste de fases a partir de un cultivo de TSB incubado 24 h a 15 °C

1.6.3. Producción de pigmentos

La producción de pigmentos se analizó sembrándolas en medio King B. Tras una incubación de 8 días a 32 °C se examinó la presencia de pigmentos mediante la observación de las placas bajo luz ultravioleta.

(Tabla 14).

1.6.4. Pruebas bioquímicas

Para confirmar la posición diferencial se llevaron a cabo diversas pruebas bioquímicas (apartado 13.4. de Materiales y Métodos)

(Tabla 14).

1.6.5. Influencia de la temperatura, pH y salinidad en el crecimiento

Se quiso estudiar la influencia de diversos factores en el crecimiento

En primer lugar, se determinó la tolerancia de todas estas cepas al NaCl sembrándolas en Agar Nutritivo (Cultimed) suplementado con NaCl 0-7% (p/v) y se determinó su crecimiento tras una incubación de 20 días a 20 °C.

Seguidamente, se estudió su crecimiento en un rango de temperaturas de entre -4 °C y 42 °C sembrando las cepas en TSA e incubándolas durante 14 días.

Finalmente, se estimó el rango de pH en el que podrían crecer estas cepas sembrándolas en tubos de TSB con un pH de entre 3,5-11 (en incrementos de 0,5 unidades de pH) e incubándolas 10 días a 20 °C antes de valorar su crecimiento mediante la observación de turbidez.

(Tabla 14).

1.7. Otras características

1.7.1. Crecimiento en anaerobiosis

1.7.2. Sensibilidad a antibióticos

Se determinó la sensibilidad a los antibióticos ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, tetraciclina y gentamicina (Sigma) en un rango de concentraciones de entre 12,5 y 400 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ en placa microtiter según se indica en el apartado 8 de Materiales y Métodos. La placa microtiter se incubó 24 h a 25 °C en agitación antes de leer la DO_{600} de los pocillos en el lector Synergy HT (BioTek).

(Tabla 15).

Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria de varios antibióticos expresada como DO_{600} con sus respectivas desviaciones estándar ($n=3$). El crecimiento a las diferentes concentraciones de antibióticos se

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Ampicilina	Cloranfenicol	Gentamicina	Kanamicina	Tetraciclina

1.7.3. Curva de crecimiento a diferentes temperaturas

Para ver cómo variaba la curva de crecimiento en función de la temperatura de incubación, se hizo una suspensión con turbidez 1 en la escala de McFarland de la cepa con la que se inocularon (2%) matraces con 100 ml de TSB. Estos matraces se incubaron a 0, 15 y 30 °C respectivamente y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar el crecimiento mediante la lectura de la DO_{600} de las muestras en el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu). Tal y como se puede observar en la Figura 10, cuanto más alta es la temperatura, hay un menor tiempo de latencia y se entra antes en fase exponencial. Así pues, en las condiciones ensayadas la fase de latencia dura aproximadamente 8 h a 30 °C, 14 h a 15 °C y 58 h a 0 °C.



Figura 10. Curva de crecimiento en TSB a 0, 15 y 30 °C. El crecimiento se expresa como DO_{600} de los cultivos. Azul: 0 °C; Rojo: 15 °C; Verde: 30 °C.

1.7.4. Capacidad

1.8. DISCUSIÓN del capítulo de Clasificación Taxonómica



Figura 11.



Figura 12.

Para realizar la clasificación taxonómica se siguió el modelo de clasificación taxonómica vigente que combina diversas pruebas fenotípicas, genéticas y quimiotaxonómicas (Roselló-Móra, 2009; Tindall y col., 2010; Schleifer, 2009). Para asegurar la validez de la clasificación taxonómica es importante incluir en el estudio polifásico a las especies más cercanas filogenéticamente y utilizar cuando sea posible más de un aislamiento para valorar la variabilidad intraespecífica (Roselló-Móra, 2009; Tindall y col. 2010).

2. EXOPOLISACÁRIDO

2.1. Análisis por MET del material extracelular producido por bacterias antárticas adaptadas al frío

Para analizar por microscopía electrónica la estructura del material extracelular y compararlo con la estructura de otras matrices extracelulares de bacterias antárticas adaptadas al frío estudiadas por el grupo (*Pseudoalteromonas* M4.2, *Shewanella livingstonensis* NF22^T, *Shewanella vesiculosa* M7^T y *Marinobacter guineae*), las cepas se cultivaron en TSA durante 72 h a 15 °C. Sus colonias se sometieron a criofijación a alta presión y criosustitución (apartado 6.2. de Materiales y Métodos), y posteriormente se realizaron secciones ultrafinas y se contrastaron (apartado 6.3. de Materiales y Métodos) para su observación en el microscopio electrónico.

Figura 13



Figura 13. Imágenes de MET de secciones ultrafinas de bacterias antárticas adaptadas al frío tras criofijación a alta presión y criosustitución.

Barras, 200 nm excepto A: 500 nm.

2.2. Obtención del exopolisacárido

2.3. Caracterización química del EPS

2.3.1. Determinación de carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales del EPS determinado por el método del fenol-sulfúrico (apartado 15.1. de Materiales y Métodos) fue de respecto al peso total del EPS, dato que confirmó que el exopolímero era de naturaleza polisacárida.

2.3.2. Análisis de azúcares neutros

Los azúcares neutros detectados en el hidrolizado del EPS mediante HPLC (apartado 15.2. de Materiales y Métodos) expresados en porcentaje respecto al peso total del biopolímero fueron:

2.3.3. Análisis elemental

La composición química del EPS en base al análisis elemental realizado según el apartado apartado 15.3. de Materiales y Métodos fue

2.3.4. Determinación del Peso Molecular

El peso molecular del EPS determinado mediante SEC (apartado 15.4. de Materiales y Métodos) resultó

2.3.5. Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro de Espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR) del EPS se muestra en la Figura 14.



Figura 14. Espectro de FT-IR del EPS

2.3.6. Resonancia Magnética Nuclear de Protón ($^1\text{H-NMR}$)

La resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$) del EPS se realizó de acuerdo al apartado apartado 15.6. de Materiales y Métodos y el espectro obtenido se presenta en la Figura 15.



Figura 15. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ del EPS

2.3.7. Determinación de ácidos urónicos

El contenido total de ácidos urónicos del EPS se determinó mediante el método de meta-hidroxidifenil (apartado 15.7. de Materiales y Métodos), representando del peso total del polímero.

2.3.8. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (apartado 15.8. de Materiales y Métodos), obteniendo un valor del _____ del peso total del biopolímero.

2.3.9. Análisis de aminoácidos

Los aminoácidos presentes en el EPS se identificaron por HPLC según se describe en el apartado 15.9. de Materiales y Métodos.

2.3.10. Determinación del contenido de DNA

El contenido de DNA del EPS se determinó mirando la absorbancia a 260 nm de acuerdo al apartado 15.10. de Materiales y Métodos, obteniéndose un valor de _____ respecto al peso total del EPS.

2.4. Métodos de cuantificación del EPS

De cara a futuros estudios relacionados con la producción del EPS se quiso valorar varios métodos para cuantificar el EPS de forma fácil a partir de los sobrenadantes de los cultivos,

Concretamente, se decidió ensayar dos métodos de cuantificación del EPS, por un lado uno basado en la determinación del peso seco del EPS y otro basado en la cuantificación de carbohidratos totales mediante el método del fenol-sulfúrico.

2.4.1. Determinación del peso seco

Durante el proceso de obtención del EPS se guardó una alícuota de 50 ml de los sobrenadantes de los cultivos y se determinó el peso seco del EPS siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 16.1. de Materiales y Métodos.

2.4.2. Cuantificación de carbohidratos totales

A partir de los sobrenadantes de los cultivos obtenidos durante el proceso de producción del EPS se tomó una alícuota de 50 ml para cuantificar el EPS de acuerdo al apartado 16.2. de Materiales y Métodos.

Ambos métodos proporcionaron el mismo resultado respecto al EPS producido, por lo que los dos resultaron válidos para posteriores determinaciones de la cantidad de EPS presente en los sobrenadantes de los cultivos.

2.5. Estudio

2.5.1. Estudio



Figura 16.

2.5.2. Estudio



Figura 17.

2.5.3. Estudio

2.5.4. Caracterización

2.5.4.1. Análisis

2.5.4.2. Reología



Figura 18. Reograma

2.5.4.3. Potencial

2.5.4.4. Estudio



Figura 19.



Figura 20.

2.6. Mutantes no productores de EPS

2.6.1. Fenotipo de los mutantes no productores de EPS

Para poder determinar la capacidad protectora frente al frío y elevada osmolaridad, se obtuvieron dos mutantes según lo descrito en el apartado 18 de Materiales y Métodos, seleccionándose dos cepas que presentaban un aspecto colonial no

mucoso. Para comprobar que las dos cepas derivaban de se llevaron a cabo varias pruebas como la tinción de Gram, la galería de pruebas bioquímicas API20NE (Biomérieux), las pruebas de la oxidasa y la catalasa y la motilidad. Tanto como presentaron el mismo perfil que salvaje en todos los parámetros analizados, lo cual confirmó que derivaban de ella. A continuación se procedió a comprobar que realmente eran cepas no productoras de EPS mediante tinciones de cápsula. En primer lugar se realizó la tinción de cápsula de Anthony (apartado 18.3. de Materiales y Métodos) para corroborar que no producían EPS. Así pues, como se muestra en la Figura 21A, se observó cápsula alrededor de la mayoría de las células de la cepa salvaje. Sin embargo, en las preparaciones de los mutantes (Figura 21B) y (Figura 21C) las células no estaban rodeadas por el halo blanco correspondiente a la cápsula.



Figura 21. Tinción de Anthony para observar la cápsula
Observación a 1.000x.

Seguidamente, para confirmar que las cepas mutantes no producían EPS se procedió a realizar una tinción con tetraóxido de rutenio y observación por MET (apartado 6.4. de Materiales y Métodos) tanto de éstas como de la cepa salvaje. Con esta tinción se observó que había una gran cantidad de EPS rodeando a las células de la cepa salvaje (Figuras 22A, 22B puntas de flecha negras).

En cambio, ni las células del mutante (Figura 22C) ni las del mutante (Figura 22D) se encontraban rodeadas por EPS. Este hecho vino a confirmar las observaciones macroscópicas y de la tinción de Anthony de microscopía óptica, con lo cual se

concluyó que los mutantes y no sintetizaban EPS y por ello se utilizaron en diversos experimentos para estudiar las propiedades del EPS.



Figura 22. Tinción con tetraóxido de rutenio para observar por MET la cápsula de cepa salvaje y la ausencia de cápsula en las cepas mutantes y de morfología colonial no mucosa. Las puntas de flecha indican el EPS que rodea las células. Barras, 500 nm, excepto B: 1 μ m.

2.6.2. Estudios de crecimiento de la cepa salvaje y de las cepas mutantes no productoras de EPS

2.7. Estudio

2.7.1. Ensayos

Tabla 16.

2.7.2. Ensayos



Figura 23.

2.8. Estudio

Tabla 17.

2.9. DISCUSIÓN del capítulo del EPS

Nuestro grupo, en trabajos anteriores había demostrado que muchas bacterias antárticas adaptadas al frío de diferentes géneros, como por ejemplo, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter* o *Marinobacter*, presentaban un material extracelular de estructura compleja formado por una mezcla de fibras poliméricas y abundantes vesículas de membrana externa (VMEs) (Frias y col., 2010). Las VMEs son vesículas esféricas rodeadas de una bicapa lipídica procedente de la membrana externa bacteriana que se forman a partir de

protuberancias de determinadas regiones de dicha membrana arrastrando también parte del contenido del periplasma. De acuerdo a este proceso de formación, las VMEs contienen lipopolisacárido (LPS), proteínas periplasmáticas, proteínas de membrana externa y fosfolípidos, y actualmente está plenamente aceptado que se producen durante el metabolismo y crecimiento celular normal de la mayoría de bacterias Gram negativas (Kulp & Kuehn, 2010). La presencia de VMEs secretadas por bacterias puede ser un inconveniente en la producción de EPSs ya que pueden dificultar la extracción y/o purificación de los EPSs y al mismo tiempo aumentar su toxicidad y/o antigenicidad ya que diversos análisis han demostrado que las vesículas contienen una amplia variedad de factores de virulencia. Estos factores de virulencia incluyen proteínas, concretamente adhesinas, toxinas y enzimas así como antígenos no proteicos como LPS (Ellis & Khuen, 2010). Además, el pequeño tamaño de las VMEs, entre 20-200 nm, complica su separación de los EPSs que son secretados simultáneamente por las bacterias.

El hecho de que no se llegue a identificar una gran parte de la composición química del polímero es un hecho común entre los EPSs bacterianos (Gutiérrez y col., 2008), debido a que no son sustancias puras y a que las hidrólisis no siempre rompen todos los enlaces glucosídicos. Además, hay que tener en cuenta que un porcentaje importante de la composición de los EPSs puede ser agua ambiental retenida en ellos, ya que una de sus funciones principales es proteger a las células frente a la desecación (Wingender y col., 1999).

En los últimos años, la caracterización de EPSs bacterianos de ambientes polares se ha convertido en un campo de investigación activo, pero se han estudiado pocos EPSs de bacterias marinas adaptadas al frío. La mayoría de los EPSs caracterizados están producidos por bacterias del género *Pseudoalteromonas*, como es el caso de *Pseudoalteromonas* sp. SM2030, aislada del hielo ártico invernal, la cual secreta un EPS compuesto principalmente por manosa y trazas de glucosa, galactosa, ramnosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y xilosa (Liu y col., 2013). Otras bacterias adaptadas al frío de la Antártida son *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, la cual sintetiza un EPS compuesto por manosa y trazas de glucosa (Corsaro y col., 2004) y *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653, con un EPS compuesto de galactosa y glucosa (Kim & Yim, 2007).

También se han descrito EPSs más complejos de ambientes antárticos, incluyendo *Pseudoalteromonas* sp. CAM025 y *Pseudoalteromonas* sp. CAM036. El EPS producido por la primera es un heteropolisacárido sulfatado con elevados niveles de ácidos urónicos con grupos acetilo y se ha estimado que su composición monosacarídica es glucosa, galactosa, ramnosa y ácido galacturónico. La última cepa también sintetiza un heteropolisacárido sulfatado con altos niveles de ácidos urónicos con grupos acetilo, pero está compuesto principalmente por glucosa, manosa, arabinosa, ácido galacturónico y N-acetilgalactosamina (Mancuso Nichols y col., 2004, 2005c).

Así pues, el EPS es un nuevo biopolímero de una cepa antártica con una composición que difiere de la de otros EPSs producidos por otras bacterias adaptadas al frío descritos hasta el momento.

3. PRODUCCIÓN DE DIMETILSULFURO (DMS)

3.1. Identificación de VOSCs sintetizados por

Para identificar los VOSCs producidos por *S. cerevisiae* se cultivó en viales de 20 ml de cromatografía de gases con TSA inclinado durante 72 h a 15 °C antes de analizar los VOSCs en el *headspace* mediante SPME-GC-MS (apartado 22 de Materiales y Métodos).

El VOSC mayoritario producido por *S. cerevisiae* fue el dimetilsulfuro (DMS), detectándose a una concentración muy superior a otros VOSCs también sintetizados por la cepa. El segundo VOSC más abundante fue el metanotiol (MeSH), el cual muy probablemente procedería de la metabolización de la metionina presente en las peptonas del TSA por parte del enzima metionina gamma liasa (*megL*). Otro compuesto interesante detectado en los cultivos de TSA *S. cerevisiae* fue el dimetilsulfóxido (DMSO), aunque en pequeñas concentraciones. Finalmente, también se detectó dimetil disulfuro y dimetil trisulfuro en los cultivos de TSA no suplementados con ninguna fuente de azufre.

3.2. Uso de diversos compuestos como únicas fuentes de carbono por

Se centrifugó un cultivo o/n a 28 °C de *S. cerevisiae* en medio M9 y el pellet se lavó tres veces con medio M9 sin ninguna fuente de carbono, como paso previo a inocular *S. cerevisiae* en medio fresco M9 que no contenía ninguna fuente de carbono o bien contenía una de las siguientes como únicas fuentes de carbono: glicerol 10 mM, DMSP 5 mM (síntesis interna, apartado 32 de Materiales y Métodos), MMPA 5 mM (síntesis interna, apartado 32 de Materiales y Métodos), metionina 5 mM (Sigma Aldrich), DMSO 2 mM (Sigma Aldrich), DMS 1 mM (Sigma Aldrich) o MeSH 1 mM (Sigma Aldrich). Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 5 días y el crecimiento se estimó midiendo la DO_{600} de los cultivos con un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu). Tras este periodo se observó que

fue capaz de utilizar el glicerol como única fuente de carbono para crecer, pero sin embargo, no pudo usar el DMSP, el MMPA, la metionina, el MeSH, el DMS o el DMSO (Tabla 18).

Tabla 18. Crecimiento de *Chlorella* en medio M9 con diferentes compuestos como única fuente de carbono. El crecimiento de *Chlorella* se expresa como DO_{600} de los cultivos y los resultados son la media de tres réplicas biológicas con sus respectivas desviaciones estándar.

Compuesto	DO_{600}
Control medio	$0,048 \pm 0,001$
Glicerol	$1,265 \pm 0,138$
DMSP	$0,049 \pm 0,009$
Metionina	$0,061 \pm 0,006$
MMPA	$0,061 \pm 0,004$
DMSO	$0,052 \pm 0,002$
MeSH	$0,063 \pm 0,002$
DMS	$0,055 \pm 0,001$

3.3. Uso de diversos compuestos como únicas fuentes de azufre por

Se centrifugó un cultivo o/n a 28 °C de *Chlorella* en medio M9 y el pellet se lavó tres veces con medio M9 sin azufre antes de inocular la cepa en medio fresco M9 sin azufre o con $MgSO_4$, DMSP, MMPA, metionina, DMSO, DMS o MeSH como únicas fuentes de azufre a una concentración de 100 μM . Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 5 días y el crecimiento se determinó midiendo la DO_{600} de los cultivos con un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu). Se observó que *Chlorella* pudo utilizar MMPA, metionina y MeSH como únicas fuentes de azufre, aunque no se obtuvo un crecimiento tan elevado como al utilizar el $MgSO_4$ (Tabla 19).

Tabla 19. Crecimiento de *Halobacterium salinarum* en medio M9 con diferentes compuestos como única fuente de azufre. El crecimiento de *Halobacterium salinarum* se expresa como DO₆₀₀ de los cultivos y los resultados son la media de tres réplicas biológicas con sus respectivas desviaciones estándar.

Compuesto	DO ₆₀₀
Control medio	0,127 ± 0,001
MgSO ₄	0,764 ± 0,013
DMSP	0,125 ± 0,001
Metionina	0,456 ± 0,023
MMPA	0,428 ± 0,069
DMSO	0,118 ± 0,003
MeSH	0,424 ± 0,036
DMS	0,126 ± 0,004

3.4. Producción y consumo de DMSP por *Halobacterium salinarum*

A pesar de que *Halobacterium salinarum* no fue capaz de utilizar el DMSP ni como única fuente de carbono ni como única fuente de azufre, se quiso verificar si al menos lo metabolizaba mediante el experimento detallado en el apartado 24 de Materiales y Métodos, en el cual se determinó la cantidad de DMSP remanente en los sobrenadantes de los cultivos mediante su conversión a DMS tras la adición de NaOH. No hubo diferencias significativas entre el DMS liberado a partir del DMSP entre el control del medio y los sobrenadantes de los cultivos de *Halobacterium salinarum*, con lo cual se puede concluir que esta bacteria antártica no metaboliza el DMSP.

3.5. Producción de DMS y MeSH por *Halobacterium salinarum*

Para elucidar la ruta biosintética del DMS en *Halobacterium salinarum*, la bacteria se cultivó en ausencia y presencia de precursores potenciales de DMS (DMSP, MeSH, MMPA y metionina) y se cuantificó el DMS producido en el *headspace* como se detalla en el apartado 23 de Materiales y Métodos, utilizando el medio M9 que contiene glicerol como fuente de carbono y MgSO₄ como fuente de azufre. Como resultado se determinó que esta bacteria antártica produjo 7,65 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹ a partir del medio mínimo M9 sin suplementar, mientras que la adición del aminoácido metionina y los productos de la desmetilación y desmetiolización del DMSP (MMPA y MeSH, respectivamente), aumentaron significativamente (3-7 veces) la producción de DMS por parte de *Halobacterium salinarum* (Tabla 24). Además, la cepa también produjo MeSH a partir de MMPA

(1.035,69 pmol MeSH·min⁻¹·mg proteína⁻¹) y a partir de metionina (1.433,47 pmol MeSH·min⁻¹·mg proteína⁻¹).

Fruto de los resultados de este experimento, se formuló la hipótesis de que en *Halobacterium salinarum*, el MMPA y la metionina son catabolizados por enzimas aún desconocidos y por el enzima MegL respectivamente, dando lugar ambos a MeSH. Así pues, el MeSH sería el sustrato directo del enzima que forma DMS en presencia de una molécula donadora de grupos metilo como la S-adenosil-L-metionina (Ado-Met). Este enzima, no descrito en la literatura, lo hemos denominado *DmsM* (DMS Dependiente de MeSH, Figura 24).

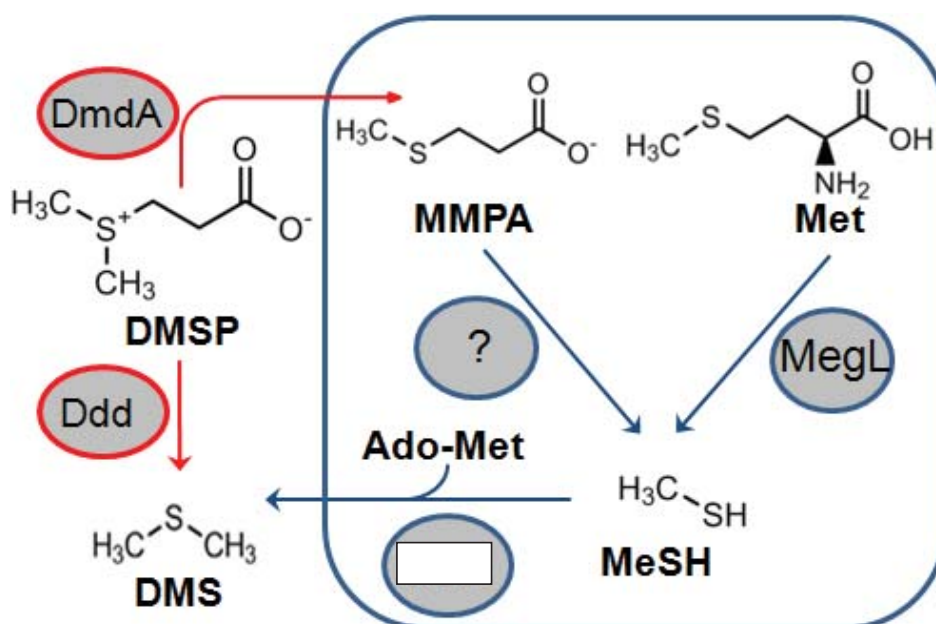


Figura 24. Representación esquemática de las rutas de producción de DMS DMSP-dependiente y MeSH-dependiente. Las flechas azules representan las vías que tienen lugar en *Halobacterium salinarum*, representada con cuadro azul. Las flechas rojas indican las rutas llevadas a cabo por otras bacterias marinas. También se muestran los enzimas DMSP liasas (Ddd) que generan DMS. El MMPA se genera por la desmetilación del DMSP mediante el enzima DmdA y/o posiblemente del metabolismo general de *Halobacterium salinarum*. En *Halobacterium salinarum*, el MMPA y la metionina son catabolizados por enzimas aún desconocidos y por el enzima MegL respectivamente, dando lugar ambos a MeSH. El enzima *DmsM*, metila el MeSH y genera DMS utilizando S-adenosil-L-metionina (Ado-Met) como donador de grupos metilo.

3.6. Construcción del mutante *megL*⁻ (J565)

Para confirmar que la ruta propuesta en el apartado anterior en la que se postula que el MeSH generado a partir de MMPA o metionina es el sustrato directo del nuevo enzima para producir DMS era correcta, se construyó un mutante del gen *megL* en *E. coli* y se estudió su fenotipo.

Para construir el mutante *megL*⁻, se clonó un fragmento interno de 0,5 kb de este gen en el vector suicida pBIO1879, dando lugar a pBIO2221 (apartado 27 de Materiales y Métodos). pBIO2221 se introdujo en *E. coli* J564 (rifampicina^R) por electroporación y los recombinantes se seleccionaron sembrándolos en LB con espectinomicina (800 µg·ml⁻¹) y kanamicina (20 µg·ml⁻¹). Para comprobar que el vector suicida pBIO2221 se había insertado en el DNA genómico, se utilizaron dos cebadores externos al gen *megL* (*megL*HindIII y *megL*EcoRI2, Tabla 6), de manera que si el vector se había insertado en el gen *megL* cromosómico el fragmento sería tan grande que no se obtendría producto de amplificación. Efectivamente, no se obtuvo producto de PCR, con lo cual se confirmaba que el mutante *megL*⁻ era correcto y a partir de ese momento se le denominó cepa J565. Cuando la cepa J565 se cultivaba en medio mínimo M9 sólo o suplementado con metionina, no producía ni MeSH ni DMS (Tabla 24). Sin embargo, cuando al cultivo se le añadía MeSH 0,5 mM o MMPA 1 mM exógeno, sí era capaz de sintetizar DMS (51,55 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹ a partir de MeSH y 23,80 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹ a partir de MMPA) confirmando que el MeSH era el precursor directo de la formación de DMS en una reacción mediada por un enzima tal y como se postula en la Figura 24.

3.7. Cribado de la librería genómica

Para identificar el gen o genes responsables de la producción de DMS a partir de MeSH se construyó una librería genómica de *E. coli* en el vector de amplio espectro pLAFR3 (apartado 25 de Materiales y Métodos) y se obtuvieron aproximadamente unos 12.000 clones primarios en *E. coli*. Después de comprobar mediante análisis de restricción que la librería era correcta, ésta se movilizó en masa por conjugación triparental a *Rhizobium leguminosarum* J391, el cual fue utilizado como huésped heterólogo. Se cultivaron 250 transconjugantes en medio TY con tetraciclina (5 µg·ml⁻¹) y estreptomycin (400 µg·ml⁻¹), se re-inocularon en viales de cromatografía de gases con 300 µl de medio TY suplementado con

MeSH 0,5 mM y se cribaron para la producción de DMS tras una incubación de 48 h a 28 °C. Un clon, pBIO2219, confirió a *R. leguminosarum* la capacidad de producir DMS a partir del MeSH (57,72 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹). La re-transformación del clon en *E. coli* y conjugación de nuevo en *R. leguminosarum* confirmaron que el fenotipo ⁺ era debido a pBIO2219.

3.8. Obtención del mutante ⁻ (J566)

Usando la mutagénesis con transposón (apartado 26.1. de Materiales y Métodos) se identificó una inserción de Tn5lacZ que abolía el fenotipo ⁺ que confería pBIO2219 (cósmido que confería producción de DMS a partir de MeSH a *R. leguminosarum*). El punto de inserción de Tn5lacZ en pBIO2220 (pBIO2219 con Tn5lacZ insertado que anula el fenotipo ⁺) se localizó por secuenciación en un gen al que se denominó “DMS Dependiente de MeSH” (Figura 30). El cósmido pBIO2220 fue introducido en J564 (rifampicina^R) mediante electroporación y la inserción ::Tn5lacZ se introdujo en el genoma de J564 mediante intercambio de marcadores, introduciendo el plásmido pPH1JI del grupo de incompatibilidad P1 (gentamicina^R) para eliminar pLAFR3 (apartado 26.2. de Materiales y Métodos). Los transconjugantes de J564 se seleccionaron por su resistencia a gentamicina (5 µg·ml⁻¹), kanamicina (20 µg·ml⁻¹) y sensibilidad a tetraciclina. Para comprobar que el mutante ⁻ (J566) era correcto se realizó una PCR con los cebadores *NdeI* y *EcoRI* (Tabla 6), no obteniéndose producto de amplificación. Asimismo, se llevó a cabo un Southern blot con las cepas salvaje y mutante ⁻ (J566) utilizando como sonda el producto de PCR del gen (apartado 28 de Materiales y Métodos). En primer lugar, se pudo observar que el producto de PCR del gen que se utilizó como sonda, hibridó consigo mismo (Figura 25, carril A), con lo cual se confirmó que el Southern blot funcionó. También se observó que el gen en la cepa salvaje se localizaba en un fragmento *EcoRI* de 4,5 kb (Figura 25, carril C). Sin embargo, en el carril correspondiente a la cepa J566 (Figura 25, carril B) se observó que el fragmento de 4,5 kb se había perdido debido a la inserción del transposón y en su lugar aparecieron una banda de 6 kb y otra de 7 kb ya que Tn5lacZ contiene una diana *EcoRI* en su secuencia. Así pues, con los resultados de la PCR y del Southern blot se confirmó que el intercambio de marcadores había funcionado y que el mutante J566 era correcto.



Figura 25. Southern blot de las cepas *Halobacterium salinarum* salvaje y mutante *H. salinarum* J566 utilizando como sonda *hds*. A: producto de PCR del gen *hds*; B: J566; C: *H. salinarum* salvaje.

Para estudiar el fenotipo del mutante *H. salinarum* (J566), éste se cultivó en medio mínimo M9 solo o suplementado con MMPA 2 mM, metionina 5 mM, MeSH 0,5 mM y se cuantificó el DMS y el MeSH en el *headspace* de los viales como se indica en el apartado 23 de Materiales y Métodos. Se observó que el mutante J566 no producía DMS independientemente de la molécula precursora (Tabla 24), aunque siguió produciendo cantidades detectables de MeSH a partir de la metionina ($4.926,16 \text{ pmol MeSH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) y del MMPA ($2.078,68 \text{ pmol MeSH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$).

3.9. Estudio por MET de la estructura *hds* en relación a la producción de DMS

Desde su aislamiento, *Halobacterium salinarum* llamó la atención por el olor característico a compuestos sulfurosos que desprendían sus colonias, especialmente cuando se sembraba en medios ricos como TSA o TSB solidificado. Tras identificar mediante SPME-GC-MS que el principal compuesto volátil de azufre que producía esta bacteria antártica era DMS, se quiso investigar si la producción de este gas comportaba cambios en su ultraestructura. Para ello se

criofijaron y criosustituyeron (apartado 6.2. de Materiales y Métodos) colonias crecidas a 15 °C durante 72 h, tiempo en el que el olor a DMS era más que notable. Las imágenes de MET de células crecidas en TSA, mostraban una gran cantidad de zonas redondeadas de baja densidad a los electrones y que no estaban delimitadas por membrana. Además, próximas a estas zonas esféricas claras se observaban con mucha frecuencia agrupaciones fibrilares (Figura 26). Las zonas de baja densidad de electrones podrían tratarse de áreas en las que se está produciendo una gran cantidad de DMS que se acumula momentáneamente antes de liberarse.



Figura 26. Imágenes de MET

Las áreas de baja densidad de electrones que podrían tener relación con la producción de DMS se indican con asterisco. Las agrupaciones de fibras citoplasmáticas se indican con una flecha. Barras, 500 μm .

Para intentar dilucidar si las zonas de baja densidad de electrones y/o las agrupaciones de fibras citoplasmáticas estaban relacionadas con la producción de DMS, se hizo una cinética de crecimiento de la cepa a 15 °C y paralelamente se tomaron muestras a diferentes tiempos para observarlas por MET después de someterlas a criofijación y criosustitución, y también se cuantificó el DMS producido mediante cromatografía de gases en relación al número de células viables. En la Figura 27 se puede observar como la producción de DMS empezó a aumentar a partir de las 10 h de cultivo a 15 °C y alcanzó un pico máximo a las 48 h para después estabilizarse al entrar en fase estacionaria.

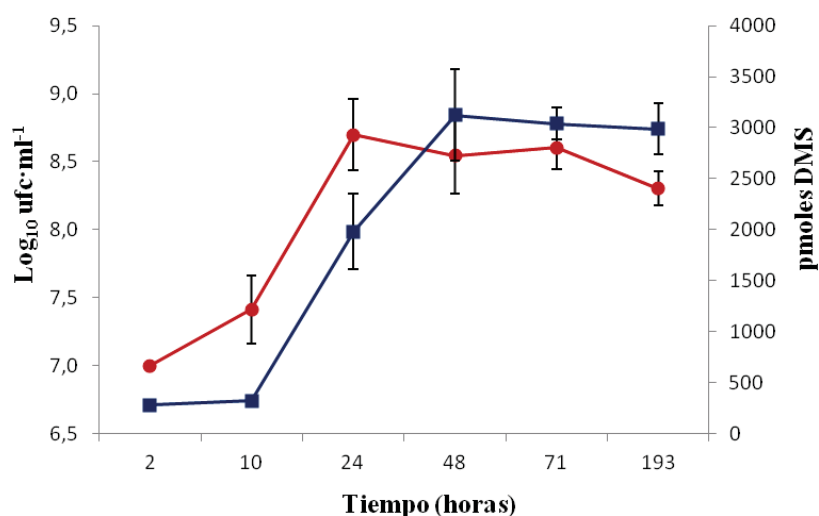


Figura 27. Cinética de crecimiento y producción de DMS

El crecimiento se expresa como $\text{Log}_{10} \text{ ufc} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Curva roja) y la producción de DMS como pmoles de DMS en el *headspace* de los viales de cromatografía de gases (Curva azul) (n=3).

Cuando se analizaron por MET las muestras tomadas a los mismos tiempos, se observó que las células a las 2 h de incubación apenas presentan áreas de baja densidad a los electrones ni fibras citoplasmáticas. Lo mismo sucedía a las 10 h de incubación, mientras que a las 24 h

cuando el cultivo estaba en plena fase exponencial, la ultraestructura de las células se veía muy alterada observándose gran abundancia de zonas poco densas a los electrones y agrupaciones fibrilares, coincidiendo con una elevada producción de DMS (Figuras 27 y 28). Por tanto, es razonable pensar que las zonas de baja densidad de electrones en el citoplasma se correspondan con acumulaciones momentáneas de este gas. Además, las envueltas celulares se apreciaban con frecuencia rotas presentando amplias discontinuidades tanto a nivel de membrana externa como interna. Estas roturas son con toda probabilidad artefactuales, ya que la presencia de gas acumulado en esta fase de crecimiento en el interior de la célula, hace que la criofijación con los equipos de alta presión (2.000 bares) no funcione adecuadamente. La presión no se transmite adecuadamente a la célula que resulta menos compresible por la presencia de DMS y se forman cristales de hielo que dañan la estructura celular.



Figura 28. Imágenes de MET *S. aureus* ATCC 12228. A: 2 h; B: 24 h. Las áreas de baja densidad de electrones que se podrían corresponder con acumulaciones transitorias de DMS en el citoplasma se indican con asterisco. Las agrupaciones fibrilares citoplasmática se indican con una flecha. Barras, 500 μm .

Por otra parte, el mutante *S. aureus* J566 no producía DMS cuando se añadía al medio de cultivo MMPA, metionina o MeSH (apartado 3.8. de Resultados y Discusión). Al examinar su estructura se observó que no presentaba ni zonas de baja densidad de electrones ni agregados de fibras citoplasmáticas cuando se incubaba en las mismas condiciones que la cepa salvaje (15 °C, 72h) (Figura 29), lo cual sugería que ambas estructuras estarían relacionadas con la producción de DMS.



Figura 29. Imágenes de MET de la cepa mutante *S. aureus* J566 crecida en TSA durante 72 h a 15 °C. Barra, 500 μm .

3.10. Caracterización de la proteína

La proteína tiene un dominio C-terminal S-isoprenilcisteína metiltransferasa conservado (COG2020) pero no presenta una amplia homología con ningún enzima caracterizado (Figura 30).

Un enzima metiltransferasa es consistente con la ruta predicha (apartado 3.5. de Resultados y Discusión), en la que catalizaría la metilación del MeSH para formar DMS. Además, cuando se clonó y expresó el gen solo y bajo el control del promotor T7 en *E.coli*, confirió producción de DMS dependiente de MeSH ($414,07 \text{ pmol DMS} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), mientras que el mutante J566 dejó de producir DMS independientemente de la molécula precursora añadida (Tabla 24).

Figura 30. Alineamiento ClustalW de polipéptidos de bacterias de distintos clades representativos y de la S-isoprenilcisteína metiltransferasa Ste14p de *Saccharomyces cerevisiae*. Los residuos que son idénticos o tienen propiedades similares están resaltados en rojo, naranja o amarillo según si están conservados en los 9 polipéptidos, en al menos 7 o en al menos 5 respectivamente. Los residuos con propiedades similares que están conservados en las 8 secuencias bacterianas de se marcan con asteriscos. La posición de la inserción Tn5lacZ en el mutante J566 se indica con una “X” debajo de ella. Los nombres de las especies con los números de acceso de los polipéptidos entre paréntesis son: *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (), *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 (), *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 (), *Pseudomonas* sp. GM41 (), , *Maricaulis maris* MCS10 (), *Sulfurovum* sp. NBC 37-1 (). La almohadilla junto al nombre de las especies indica aquellas secuencias MdaA cuya actividad ha sido ratificada en *E.coli*. El número de acceso de la proteína Ste14p de *Saccharomyces cerevisiae* es

3.10.1. Actividad *in vitro* de

Para estudiar la actividad *in vitro* de se indujeron cultivos de *E.coli* BL21 que contenían pBIO2223 (pET21a con el gen de clonado) con una DO₆₀₀=0,4 con IPTG 0,1 mM y se incubaron durante 18 h a 24 °C. Tras este tiempo, los cultivos se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en tampón Tris 100 mM, MES 50 mM, ácido acético 50 mM (pH 7) frío y luego se sonicaron (5 x 10 s) con el sonicador Ultrasonic processor VC50 (Jencons). Las suspensiones se centrifugaron y el sobrenadante se incubó con AdoMet 1 mM y MeSH 1 mM en viales de cromatografía de gases durante 20 min antes de cuantificar el DMS producido. El lisado celular de *E.coli* BL21 con pBIO2223 produjo 1.754,10 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹, mientras que si no se le añadía AdoMet no había producción de DMS. Así pues, la actividad *in vitro* de requiere AdoMet como molécula donadora de grupos metilo para generar DMS a partir del MeSH, lo cual concuerda con el hecho de que sea una metiltransferasa.

3.10.2. Estructura y localización de la proteína

3.10.2.1. Análisis bioinformáticos

La secuencia de la proteína de se analizó con varios programas bioinformáticos (apartado 33.9. de Materiales y Métodos) y los resultados proporcionados por ellos se muestran en la Tabla 20. En la misma se muestra el número de hélices transmembrana predicho por cada programa y su localización. Entre paréntesis se indican los niveles de

confianza de la localización de las hélices transmembrana cuando eran proporcionados por los programas. En la Tabla 20 se puede observar que las cuatro primeras hélices transmembrana son claramente detectadas por todos los programas. Sin embargo, hay divergencia en la predicción de la quinta y la sexta hélice transmembrana. Por ejemplo, Optimum Antigen y TMHMM Server v.2.0 no las detectan. Otros programas como TMPred y TOP Pred únicamente detectan la sexta hélice, mientras que Predict Protein y Pred-TMR y Pred-TMR2 detectan las hélices cinco y seis como una única. Finalmente, los programas MPex, PSIPRED v2.3 y Split Server predicen seis hélices transmembrana.

Por tanto, de acuerdo a los diferentes programas informáticos consultados, se puede concluir que es una proteína con 4-6 hélices transmembrana.

Tabla 20. Predicción de los dominios transmembrana de la proteína de . Los programas bioinformáticos consultados se indican en la columna 1. El número de hélices transmembrana predicho se detalla en la columna 2. En las columnas 3-8 se indican las posiciones de las diferentes hélices transmembrana con sus respectivos niveles de confianza cuando los programas los proporcionaron entre paréntesis. TMPred considera significativos aquellos valores >500, MPex proporciona diferencias entre los valores de energía libre, PredictProtein proporciona puntuaciones totales, TOP Pred considera aquellos valores >1 como ciertos; PSIPRED y SACS MEMSAT2 dan puntuaciones. ND: No detectado.

Programa	Nº	1	2	3	4	5	6
MPex	6	21-42 (2,74)	57-75 (0,15)	99-120 (1,02)	135-157 (1,83)	183-203 (1,88)	206-227 (1,61)
Optimum Antigen	4	20-42	57-79	100-117	132-154	ND	ND
Predict Protein	5	21-42 (0,56)	60-77 (0,74)	101-118 (0,79)	136-154 (0,62)	194-218 (0,69)	
PRED-TMR2	5	25-42	57-75	100-117	135-154	196-215	
PSIPRED v.2.3.	6	17-41 (30,04)	59-82 (30,97)	96-117 (21,73)	133-157 (23,18)	185-204 (12,45)	207-227 (23,84)
TMHMM Server v.2.0.	4	20-42	57-79	100-117	132-154	ND	ND
TMPred	5	21-42 (2348)	59-81 (1552)	100-118 (1841)	135-154 (2727)	ND	208-227 (1286)
TOP Pred	5	24-44 (2,17)	56-76 (1,49)	100-120 (1,96)	135-155 (2,27)	ND	206-226 (1,69)
SACS MEMSAT2	5	18-42 (5,33)	59-75 (3,57)	100-117 (4,89)	131-154 (5,10)	ND	206-223 (2,73)
Split Server	6	17-50	64-92	101-130	138-165	188-205	209-230

3.10.2.2. Fraccionamiento celular

Para comprobar que la proteína *PhoA* era una proteína de membrana se realizó un cultivo de *E. coli* en medio LB durante 24 h a 28 °C y una agitación de 250 rpm. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota del cultivo de 2 ml y se procedió a realizar el fraccionamiento celular utilizando el kit PeriPreps Periplasting Kit (Epicentre) siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener las fracciones celulares correspondientes al periplasma, citoplasma y membranas. Con el fin de determinar qué fracción contenía la actividad *PhoA*, se tomó una alícuota de 50 µl de cada una de ellas y se incubaron con AdoMet 1 mM y MeSH 1 mM durante 2 h antes de cuantificar la cantidad de DMS producido en el *headspace* de los viales por cromatografía de gases (apartado 23 de Materiales y Métodos). Como control se utilizó el lisado celular de *E. coli*. Para obtenerlo, se centrifugó una alícuota de 2 ml del mismo cultivo utilizado para el fraccionamiento celular, el pellet se resuspendió en 500 µl de tampón Tris 100 mM, MES 50 mM, ácido acético 50 mM (pH 7) frío y la suspensión se sonicó (5 x 10 s) con el sonicador Ultrasonic processor VC50 (Jencons). Tras ello, dichas suspensiones se centrifugaron y se incubaron 50 µl del sobrenadante con AdoMet 1 mM y MeSH 1 mM en viales de cromatografía de gases durante 2 h al igual que las diferentes fracciones celulares obtenidas.

La fracción celular correspondiente a las membranas proporcionó una actividad de 1.374,81 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹, mientras que no se detectó producción de DMS en las fracciones correspondientes al periplasma y al citoplasma. Este hecho vendría a corroborar que la proteína *PhoA* estaría localizada en membrana. Por su parte, el lisado celular de *E. coli* mostró una actividad de 2.127,97 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹.

3.10.2.3. Fusiones traduccionales *PhoA*::GFP y *PhoA*::PhoA

Para localizar subcelularmente la proteína *PhoA*, se utilizó un ensayo diseñado para determinar la orientación de proteína de membrana en bacterias. Para ello se construyeron fusiones traduccionales C-terminales entre *PhoA* y eGFP o PhoA en el vector de amplio espectro pRK415 dando lugar a los plásmidos pBIO2235 y pBIO2238 respectivamente (Tablas 5 y 6). Estos plásmidos se electroporaron en *E. coli* (J566) para que la proteína nativa no interfiera con la *PhoA* clonada en ellos. Seguidamente, la cepa J566 con el plásmido pBIO2235 o pBIO2238 se cultivó en medio M9 con IPTG 0,5 mM antes de ensayar la actividad GFP o fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo descrito en los apartados

29 y 30 de Materiales y Métodos respectivamente. La GFP sólo se pliega dando lugar a una proteína funcional cuando se encuentra en el citosol, mientras que la fosfatasa alcalina (PhoA) sólo es funcional en el periplasma. Como resultado de este ensayo, se determinó que el extremo C-terminal de *PhoA* se encuentra probablemente en el citoplasma, ya que la fusión *PhoA*::GFP proporcionó fluorescencia ($159,36 \pm 10,42$ RFU·mg proteína⁻¹) mientras que la fusión *PhoA*::PhoA no mostró actividad fosfatasa alcalina por encima del control.

3.10.2.4. MET e Inmunomarcaje con oro coloidal de la proteína

Una vez que se determinó que la proteína *PhoA* era el enzima responsable de catalizar la formación de DMS a partir de MeSH y viendo que la máxima producción de DMS a 15 °C coincide con una presencia de zonas de baja densidad de electrones y agregados de fibras en el citoplasma, se decidió realizar un inmunomarcaje de *PhoA* para confirmar si estas estructuras fibrilares están relacionadas con la producción de DMS y tratar de determinar la localización del enzima *PhoA*. De acuerdo a las predicciones *in silico* este enzima parecía estar anclado en una membrana lipídica que podría ser la membrana citoplasmática, y que según los ensayos de actividad GFP y fosfatasa alcalina se deducía que el extremo C-terminal de *PhoA* se encontraba probablemente en el citoplasma, ya que sólo la fusión *PhoA*-GFP proporcionó fluorescencia. Para el inmunomarcaje, se utilizó un anticuerpo específico contra *PhoA* sintetizado por la empresa GenScript Limited (Hong Kong) en base a los dominios antigénicos determinados utilizando la herramienta de diseño OptimumAntigen™. El inmunomarcaje también se llevó a cabo con el mutante *PhoA*⁻ (J566).

El inmunomarcaje con oro coloidal de la proteína *PhoA* se realizó de acuerdo al apartado 6.5. de Materiales y Métodos. Las imágenes de MET del inmunomarcaje de *PhoA* salvaje con el anticuerpo anti-*PhoA* mostraron la presencia de marca de oro específica localizada en los agregados de finas fibras presentes en el citoplasma (Figura 31A-C, puntas de flecha blancas), las cuales estaban ausentes en el mutante *PhoA*⁻ (J566) (Figura 31D). Asimismo, en la cepa *PhoA* salvaje, pero no en el mutante J566, a menudo se observaban cerca de los agregados de fibras, áreas blancas redondas de baja densidad de electrones que parecían desplazar los ribosomas u otros componentes del citoplasma (Figura 31A, B, E, F, asteriscos). Estas áreas blancas redondas podrían corresponder a acumulaciones momentáneas de DMS en el citoplasma. Debido a que el anticuerpo anti-*PhoA* era nuevo, se realizó un control con el suero pre-inmune suministrado también por la empresa y con el que

no se obtuvo marca de oro en las fibras (Figura 31F). Asimismo, se comprobó la especificidad del marcaje con un control utilizando sólo el anticuerpo secundario y tampoco se observó ninguna marca de oro en las células (Figura 31E).



Figura 31. Imágenes de MET del inmunomarcaje de las cepas *Pseudomonas fluorescens* salvaje y J566 con el anticuerpo específico anti-*DmsA*. A-C: cepa *Pseudomonas fluorescens* salvaje $+$; D: cepa mutante J566 $-$; E: control utilizando solo anticuerpo secundario; F: control utilizando suero pre-inmune. El cuadrado interno en A es una ampliación de las fibras para mostrar su perfil de tinción. Las flechas de punta blancas indican las fibras donde se localiza el enzima *DmsA*. Los asteriscos indican áreas de baja densidad de electrones que podrían corresponder a acumulaciones temporales de DMS en el citoplasma. Barras, 200 nm.

3.11. Distribución taxonómica de

Con la finalidad de determinar en qué taxones taxonómicos se encontraba distribuida la proteína *DmsA* se hizo un blast y se construyó un árbol filogenético con aquellas secuencias que presentaban una homología $\geq 40\%$ con la proteína *DmsA* de *Pseudomonas fluorescens*. En la figura 32 se puede comprobar que el gen *DmsA* está altamente conservado en cepas específicas de *Pseudomonas*. También se encuentran proteínas homólogas a *DmsA* en un amplio rango de otros taxones bacterianos, incluyendo grupos importantes ampliamente estudiados y muchos de los cuales no se sospechaba previamente que produjeran DMS. Así pues, proteínas $\sim 50\%$ idénticas a *DmsA* de *Pseudomonas fluorescens* están presentes en múltiples especies de las actinobacterias *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium*, incluyendo los patógenos *M.tuberculosis* y *M.avium*; miembros de los rizobiales incluyendo los fijadores de N_2 *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (en muchos existen dos formas distintas con un 50% de homología entre ellas, p.ej., *B.diazoeficiens* USDA 110 y *B.diazoeficiens* USDA 110) y cianobacterias fijadoras de N_2 incluyendo especies de los géneros *Cyanothece*, *Pseudoanabaena* y *Nodosilinea*. Finalmente, también existen proteína homólogas a *DmsA*, aunque con menos frecuencia, en algunos planctomycetes, flavobacterias, gammaproteobacterias, verrucomicrobios, rhodobacterales, betaproteobacterias, espiroquetas y epsilonproteobacterias (Figura 32).



Figura 32. Árbol filogenético de la proteína *metM*. Se muestran las cepas bacterianas, su taxonomía y los números de acceso de Genbank de los polipéptidos *metM* que tienen una identidad de aminoácidos >40% a *metM* de *B. diazoefficiens*. Las secuencias del mismo género bacteriano que tienen una homología >57% entre sí se agrupan en triángulos, reflejando el tamaño del triángulo el número de secuencias. Aquellos casos en que los genes *metM* se clonaron y se demostró experimentalmente que conferían producción de DMS dependiente de MeSH a *E. coli* se marcan con almohadilla. Se muestran las dos proteínas *metM* de *B. diazoefficiens* USDA 110 (*metM* y *metM*). Las secuencias utilizadas en el alineamiento de la Figura 30 están subrayadas. El árbol *neighbour-joining* se obtuvo utilizando el modelo de sustitución de aminoácidos Jones-Taylor-Thornton (JTT). Los valores de *bootstrap* $\geq 50\%$ (basados en 1.000 réplicas) se muestran en las ramificaciones. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por posición.

3.12. Funcionalidad de las proteínas homólogas a *metM*

El árbol filogenético de la Figura 32 muestra que el gen *metM* está presente en un número significativo de cepas específicas del género *Pseudomonas*. Con la finalidad de comprobar que las proteínas homólogas a *metM* de *Pseudomonas* de cepas de *Pseudomonas* tenían realmente la misma función, se ensayó la producción de DMS por parte de cepas de *Pseudomonas* que poseían proteínas homólogas a *metM* y de cepas que no contenían homólogos en su genoma. Las cepas *Pseudomonas* sp. GM41 y *P. fragi*, las cuales presentaban proteínas con un *metM* y *metM* de homología con el enzima *metM* de *B. diazoefficiens* respectivamente, mostraron tasas de producción de DMS similares a la de *metM* y ésta se vio aumentada por la adición de MeSH (Tabla 24). Sin embargo, aquellas *Pseudomonas* que no presentaban el gen *metM* en su genoma, como por ejemplo, *P. putida* y *P. psychrophila*, no produjeron niveles de DMS detectables (datos no mostrados). Así pues, en cada caso ensayado, la presencia del gen *metM* en *Pseudomonas* se correlacionó con cepas que producían DMS y dicha producción se vio aumentada por la adición de MeSH. Para verificar que las proteínas homólogas a *metM* de otros microorganismos también actuaban como metiltransferasas que catalizaban la conversión de MeSH a DMS, se eligieron miembros representativos de varios clades, concretamente, *B. diazoefficiens* USDA 110 y *Cyanothece* sp. ATCC 51142 y se estudió su producción de DMS a partir de medio mínimo obteniéndose 385,00 y 5,69 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹ respectivamente y al igual que en *Pseudomonas*, esta producción se vio incrementada por la adición de MeSH hasta obtener 596,79 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹ en el caso de

B.diazoeficiens USDA 110 y 7,53 pmol DMS·min⁻¹·mg proteína⁻¹ en el caso de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (Tabla 24).

Finalmente, para confirmar que el enzima era el responsable del fenotipo + de los microorganismos mencionados y verificar también la funcionalidad del gen en *M.tuberculosis* H37Rv, sus genes homólogos a se clonaron y expresaron en *E.coli*, incluyendo las dos copias de *B.diazoeficiens* USDA 110 (y) (Figura 32). Todos los clones de *E.coli* con los diferentes genes presentaron una actividad significativa (Tabla 24). Con este experimento quedó demostrado que el gen era capaz de conferir un fenotipo + por si solo (producción de DMS dependiente de MeSH).

3.13. Distribución ambiental del gen

La distribución ambiental del gen se estimó analizando bases de datos de metagenomas de un variado rango de ambientes según se describe en el apartado 3.7. de Materiales y Métodos. Los genes que codifican para proteínas ($E < e^{-30}$) estaban representados en la mayoría de metagenomas consultados, pero sorprendentemente se vieron abundancias relativas mucho mayores en ambientes terrestres, especialmente en metagenomas de suelo, donde por ejemplo se predijo que estaría presente en el 5-76% de las bacterias en el suelo de granja de Waseca (Figura 33).

Además, la abundancia relativa de se comparó con la de los genes DMSP liasas *ddd* y el gen DMSP desmetilasa *dmdA*, muchos de los cuales son prevalentes en ambientes marinos. En la Figura 33 se puede observar que los genes *dmdA* desmetilasa y *dddP* DMSP liasa son claramente muy abundantes en todos los metagenomas marinos, mientras que los otros genes *ddd* y también están presentes, pero son más escasos. La frecuencia de sería la misma que la del gen DMSP liasa *dddW* en la base de datos *Global Ocean Sampling* (GOS), es decir, estaría presente en ~0,1% de las bacterias. Sin embargo, los genes *ddd* y *dmdA* presentan unas frecuencias muy bajas en los metagenomas terrestres donde el gen es generalmente abundante, lo cual es lógico ya que el DMSP es una molécula producida por organismos marinos. Una excepción es el gen *dddP*, el cual parece relativamente abundante (~12% de las bacterias) en el metagenoma de suelo de Rothamsted (Figura 33).

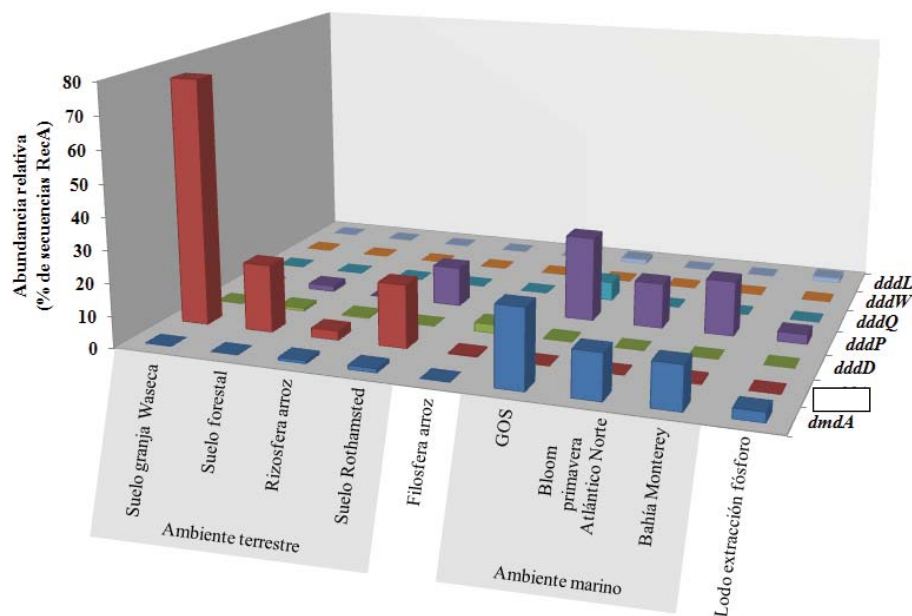


Figura 33. Comparación de los valores normalizados de las secuencias de las proteínas $dddL$, $dddW$, $dddQ$, $dddP$, $dddD$ y $dmdA$ en metagenomas de diferentes ambientes detallados en la Tabla 9 (apartado 33.7. de Materiales y Métodos). El número de *hits* únicos (Tabla 10) se normalizaron por el número de secuencias únicas RecA de los metagenomas y están representados como el porcentaje de secuencias RecA totales. Las bases de datos de proteínas se descargaron de las secuencias metagenómicas disponibles en CAMERA y MG-RAST. La lista de secuencias de búsqueda RecA se tomaron de Toulza y col. (2012).

3.14. Sintenia del gen

La sintenia del gen $dddL$ de *Pseudomonas* se llevó a cabo con el objetivo de ver qué genes lo flanqueaban, si estaban implicados en el metabolismo del azufre y si esta región está conservada entre las diferentes cepas de *Pseudomonas* que contienen $dddL$. Como se observa en la Figura 34, el gen $dddL$ en las diferentes especies del género *Pseudomonas* se localiza entre genes que no han sido caracterizados en ningún microorganismo y no tienen una conexión conocida con el metabolismo del azufre. Concretamente, en *P. fragi* A22, *P. fragi* B25 y *Pseudomonas* sp. Lz4W el gen $dddL$ está flanqueado por una histidina quinasa y una acetiltransferasa de la familia GNAT. En cambio, en *P. fluorescens* SS101, *P. fluorescens* NZ052 y *Pseudomonas* sp. R81 el gen $dddL$ se encuentra entre una

oxidoreductasa FAD-dependiente y una proteína hipotética, una lipopeptidasa A8 y una glutamasa A respectivamente. En *Pseudomonas* sp. GM41 el gen se encuentra flanqueado por una meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa FOLD y una endopeptidasa D-alanil-D-alanina, mientras que en *P.synxantha* BG33R el gen se encuentra entre una sacaropina deshidrogenasa y una glutamasa A. Por último, el gen de *Pseudomonas* sp. CBZ-4 se encuentra rodeado de proteínas hipotéticas.

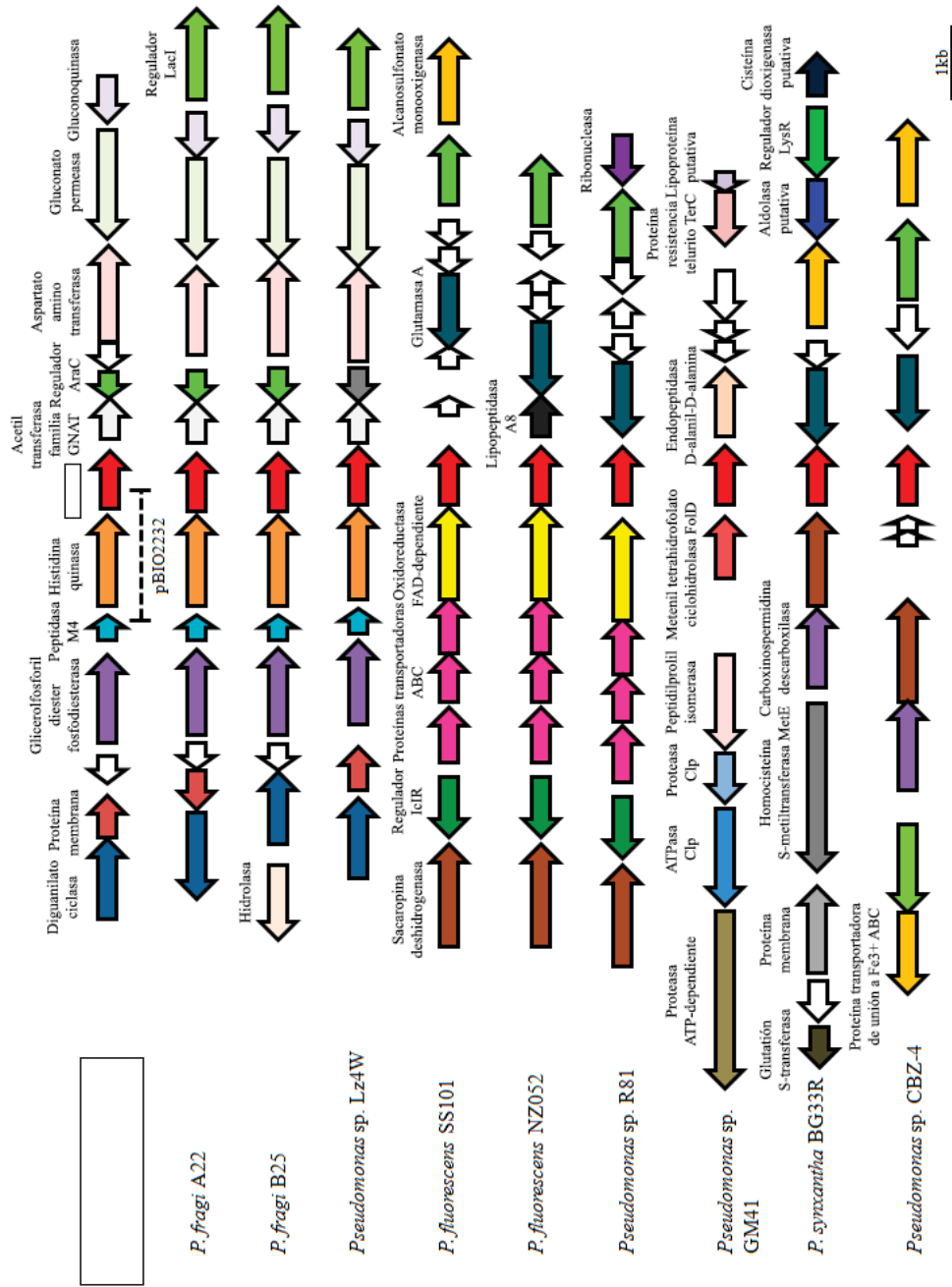


Figura 34. Esquema del gen *gltA* y los genes que lo flanquean en cepas de *Pseudomonas*. Las regiones del genoma de *P. fluorescens* Pf-0, *P. fragi* A22 (GCA_000250595), *P. fragi* B25 (PRJNA200017), *Pseudomonas* sp. Lz4W (PRJNA193784), *P. fluorescens* SS101 (PRJNA181712), *P. fluorescens* NZ052 (PRJNA200137), *Pseudomonas* sp. R81 (PRJNA176384), *Pseudomonas* sp. GM41 (PRJNA171667), *P. synxantha* BG33R (PRJNA167316) y *Pseudomonas* sp. CBZ-4 (PRJNA199902) muestran seis genes a cada lado de *gltA*. Los genes están codificados por color y las proteínas predichas están detalladas sobre las flechas. Los genes que codifican proteínas hipotéticas se representan con flechas blancas; los genes reguladores están coloreados en verde. La región de *gltA* clonada en pBIO2232 (vector pBIO1878 con la región promotora de *gltA* clonada) se marca con línea de puntos.

3.15. Inducción de la actividad

Con el fin de determinar qué compuestos eran capaces de inducir la actividad de *gltA* y poder plantear posibles roles de este enzima, se ensayaron compuestos relacionados con el metabolismo del azufre y producción de VOSCs, y también se ensayaron sustancias que inducen estrés oxidativo o condiciones de incubación (temperatura, luz, oxígeno, etc.) que podrían alterar la expresión de este enzima. Para ello, *P. fluorescens* Pf-0 se cultivó o/n a 28 °C en medio mínimo M9 en ausencia y presencia de DMSP 1 mM, MMPA 1 mM, DMSO 1 mM, DMS 0,5 mM o MeSH 0,5 mM, pero también con y sin H₂O₂ 1 mM, paraquat 300 µM, a 4 °C y a 28 °C, medio mínimo vs medio rico, condiciones limitantes de azufre (M9 sin MgSO₄), luz constante (~50 µE·m⁻²·s⁻¹) vs incubación en oscuridad y condiciones aeróbicas vs condiciones microaerofílicas. Estos cultivos se ajustaron a una DO₆₀₀=0,8 y se centrifugaron 300 µl, las células se lavaron 3 veces y se resuspendieron en viales con 300 µl de M9 con MeSH 0,5 mM. Los viales se incubaron a 28 °C durante 4 h antes de cuantificar el DMS producido en el *headspace* y determinar el contenido de proteínas. Sin embargo, la actividad *gltA* no aumentó significativamente por el pre-enriquecimiento en presencia de las moléculas inductoras potenciales ni en las condiciones ensayadas.

3.16. Ensayos de actividad β-galactosidasa para estudiar la transcripción del gen

Para estudiar bajo qué condiciones se estimula la transcripción del gen *gltA* se realizó una fusión transcripcional entre el promotor del gen *gltA* y el gen reportero *lacZ*. Para llevarla a cabo, se clonó la secuencia corriente arriba (*upstream*) que contenía el promotor predicho del gen *gltA*, en el plásmido con el gen reportero *lacZ* pBIO1878 (Tablas 5 y 6; Figura 34). El

constructo resultante, pBIO2232, se transformó en *S. cerevisiae* y los transformantes se cultivaron o/n bajo varias condiciones antes de ensayar la actividad β -galactosidasa (apartado 31 de Materiales y Métodos). Concretamente, *S. cerevisiae* se cultivó en presencia y ausencia DMSP 1 mM, MMPA 1 mM, metionina 1 mM, DMSO 1 mM, DMS 0,5 mM o MeSH 0,5 mM pero también de H₂O₂ 1 mM y de paraquat 300 μ M. También se estudió la influencia de la temperatura incubando los cultivos a 4 °C vs 28 °C, medio rico (LB) vs medio mínimo (M9), condiciones normales de azufre (M9) vs condiciones limitantes de azufre (M9 sin MgSO₄), condiciones de luz constante ($\sim 50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vs oscuridad y condiciones aeróbicas vs microaerofilia.

En estos estudios se observó que el gen *YJ566* presentaba una expresión de ~ 70 unidades Miller de actividad β -galactosidasa independientemente de la molécula inductora potencial (metionina, MMPA, DMS, MeSH, DMSP y DMSO) o la condición ambiental ensayada (temperatura, luz, concentración de oxígeno, estrés oxidativo, o fuente y disponibilidad de azufre y carbono). Por tanto, la transcripción del gen *YJ566* no parece ser que esté regulada por el reconocimiento y activación del promotor.

3.17. Estudios de crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* salvaje y la cepa mutante *YJ566*

Para intentar esclarecer el beneficio de producir DMS para la propia célula, se comparó el crecimiento de la cepa mutante *YJ566* con la de *S. cerevisiae* salvaje bajo diversas condiciones detalladas en los apartados que siguen a continuación. A no ser que se especifique lo contrario, el crecimiento se estimó midiendo la DO₆₀₀ de los cultivos a diferentes tiempos usando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).

3.17.1. Temperatura

A partir de un cultivo o/n de las cepas *S. cerevisiae* salvaje y *YJ566* en medio M9 a 28 °C se inocularon (2%) matraces con 500 ml de medio M9 fresco y éstos se incubaron a 0 °C y a 28 °C. A ambas temperaturas, tanto la cepa salvaje como la mutante presentaron los mismos perfiles de crecimiento durante los cinco días que duró el experimento. La producción de DMS en la cepa salvaje no influyó ni en la velocidad de crecimiento ni en los niveles de crecimiento alcanzados medidos como DO₆₀₀ (Figura 35).

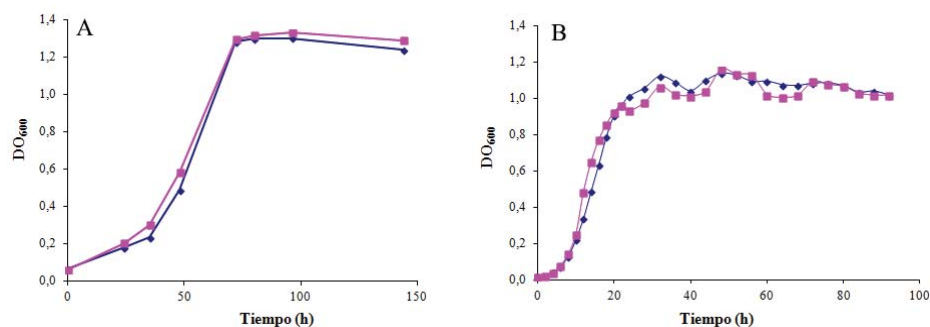


Figura 35. Curvas de crecimiento de la cepa salvaje y la cepa mutante J566 a 0 °C (A) y 28 °C (B) en medio M9. **Curva azul:** cepa

salvaje y la cepa mutante J566 a 0 °C salvaje; **Curva rosa:** cepa mutante J566.

3.17.2. Salinidad

A partir de un cultivo o/n de la cepa salvaje y la cepa mutante J566 en medio M9 a 28 °C se inocularon con un 2% matraces con 500 ml de medio M9 fresco suplementado con concentraciones de NaCl del 1-6% (p/v) y se incubaron a 28 °C durante 5 días. En este caso tampoco hubo diferencias significativas en el crecimiento de la cepa salvaje respecto a la mutante (Tabla 21).

Tabla 21. Crecimiento de la cepa salvaje y de la cepa mutante J566 con varias concentraciones de NaCl (1-6%). El crecimiento se expresa como DO₆₀₀ de los cultivos con sus correspondientes desviaciones estándar (n=2).

% NaCl	salvaje	J566
1	0,741 ± 0,110	0,713 ± 0,012
2	0,844 ± 0,115	0,902 ± 0,010
3	0,918 ± 0,006	0,877 ± 0,079
3,5	0,916 ± 0,027	1,035 ± 0,057
4	0,954 ± 0,028	0,770 ± 0,163
4,5	0,215 ± 0,071	0,385 ± 0,057
5	0,049 ± 0,004	0,051 ± 0,008
6	0,005 ± 0,001	0,007 ± 0,002

3.17.3. Inductores potenciales de la producción de DMS

A partir de un cultivo o/n de la cepa *salvaje* y la cepa mutante J566 en medio M9 a 28 °C se inocularon con un 2% matraces con 500 ml de medio M9 fresco suplementado con MMPA 2 mM, metionina 2 mM o MeSH 0,5 mM. Estos matraces se incubaron a 28 °C durante 5 días y en ninguna fase del crecimiento se observaron diferencias significativas entre las DO₆₀₀ de las dos cepas (Figura 36).

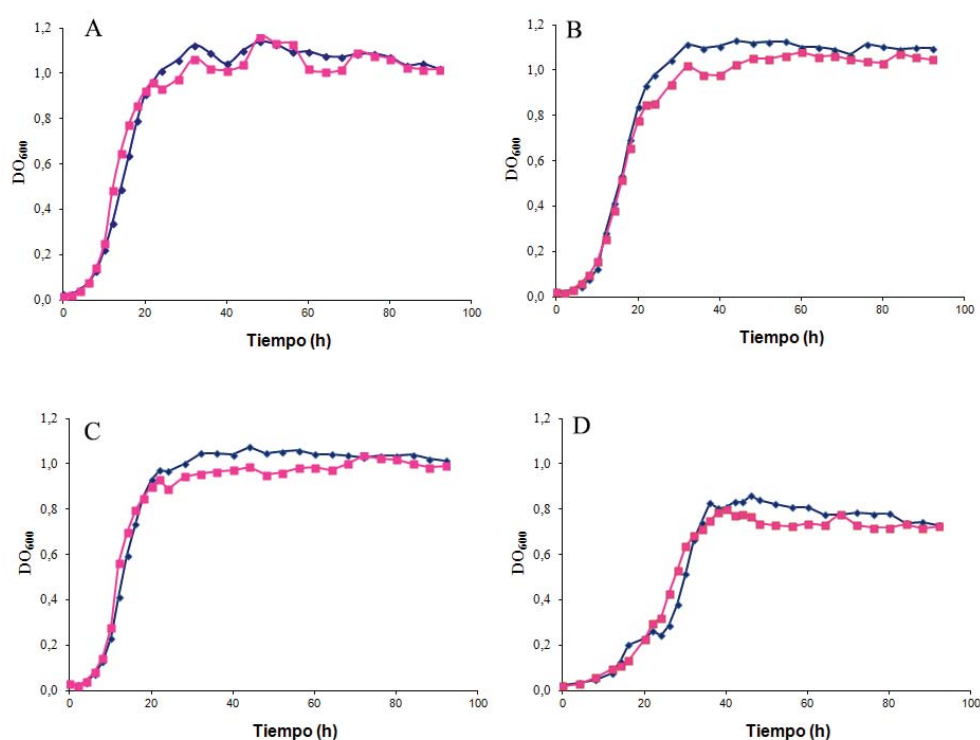


Figura 36. Curvas de crecimiento de la cepa *salvaje* y la cepa mutante J566 en medio M9 solo (A), suplementado con MMPA (B), metionina (C) o MeSH (D). **Curva azul:** cepa *salvaje*; **Curva rosa:** cepa mutante J566.

3.17.4. Estrés oxidativo

Para determinar la tolerancia de la cepa *salvaje* y la cepa mutante J566 a agentes que producen estrés oxidativo (H₂O₂ y paraquat) y ver si el DMS protegía a este tipo de estrés, ambas se cultivaron a 15 °C durante 24 h en Caldo Mueller Hinton (Oxoid) y se

ajustó la $DO_{600}=0,3$. Se humedeció un escobillón en los cultivos de cada cepa y se sembraron en superficie placas de Agar Mueller Hinton (Oxoid). Posteriormente, en cada placa se depositaron filtros estériles de 6 mm (Whatman) con 10 μ l de H_2O_2 100 mM o Paraquat (Sigma-Aldrich) 25 mM. Tras una incubación de 48 h a 15 °C se registraron los halos de inhibición de crecimiento de ambas cepas sin que hubiera diferencias significativas entre ellas (Tabla 22).

Tabla 22. Ensayos de inhibición en disco de la cepa *salvaje* y la cepa mutante J566 frente a agentes inductores de estrés oxidativo. Los halos de inhibición del crecimiento de las cepas *salvaje* y J566 se expresan en mm con sus respectivas desviaciones estándar (n=8).

	salvaje	J566
Control	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
H_2O_2 100 mM	10,25 \pm 0,46	9,25 \pm 0,71
Paraquat 25 mM	21,00 \pm 0,53	18,75 \pm 2,05

Por otra parte, para estudiar la tolerancia de la cepa *salvaje* y la cepa mutante J566 al H_2O_2 y al paraquat de forma más precisa, se llevaron a cabo ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) de acuerdo al apartado 8 de Materiales y Métodos utilizando concentraciones de H_2O_2 de entre 0,4-100 mM y paraquat de entre 0,1-25 mM. Después de incubar las placas microtiter a 15 °C durante 48 h se determinó que la CMI de H_2O_2 para ambas cepas era de 6,3 mM, mientras que la CMI de paraquat fue de 0,8 mM. Por tanto, al no haber diferencias en el crecimiento de la cepa *salvaje* y la cepa mutante J566 en presencia de moléculas inductoras de estrés oxidativo, no parece ser que la producción de DMSO tenga un papel protector frente al estrés oxidativo captando radicales libres de oxígeno.

3.18. Producción de DMSO por *Halobacterium salinarum* (J566)

En los estudios iniciales de los VOSCs producidos por *Halobacterium salinarum* se identificó el DMSO como uno de los productos sintetizados por esta bacteria antártica (apartado 3.1. de Resultados y Discusión). Para ver si la producción de DMSO se veía afectada en el mutante J566 y otorgarle un posible papel fisiológico al hecho de producir DMSO a partir del DMS, las cepas *salvaje* y mutante *Halobacterium salinarum* (J566) se cultivaron en TSA

inclinado en viales de cromatografía de gases de 20 ml durante 6 días a 15 °C, antes de estimar el DMSO producido mediante SPME-GC-MS (apartado 22 de Materiales y Métodos). Este análisis mostró que la cepa salvaje producía 7,4 veces más DMSO que el mutante J566. En los ensayos previos, no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas cuando fueron sometidas a estrés oxidativo, por lo que la producción de DMS en

no estaría relacionada con la formación de DMSO para captar radicales libres y proteger a la célula frente a dicho estrés.

Otra posibilidad sería que esta bacteria antártica sintetizara DMSO como agente crioprotector. Para comprobar esta hipótesis, la cepa salvaje y la cepa mutante J566 se cultivaron en TSB a 15 °C durante 24 h y los cultivos se ajustaron a una $DO_{600}=0,6$. A continuación se tomaron alícuotas de 1 ml de los mismos, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 min, los sobrenadantes se descartaron y los pellets se congelaron a -20 °C y a -80 °C respectivamente. Tras una semana se descongelaron, se resuspendieron en un volumen final de 1 ml con TSB y se hizo un recuento de células viables. No hubo diferencias significativas entre las tasas de supervivencia de la cepa salvaje y la mutante J566 (Tabla 23), por lo que se deduce que el principal mecanismo de crioprotección de sería la producción de EPS y, en menor medida, la síntesis de DMSO.

Tabla 23. Tasas de supervivencia de las cepas salvaje y mutante J566 después de congelar las células a -20 °C y a -80 °C. La tasa de supervivencia se expresa como el porcentaje de células viables respecto a las células no congeladas (n=10).

	Cepa salvaje	Cepa J566
-20 °C	86,45% ± 9,17	77,75% ± 9,93
-80 °C	93,33% ± 4,95	90,14% ± 5,63

Tabla 24. Producción de DMS y MeSH por parte de las cepas microbianas utilizadas en este trabajo. Las cepas se cultivaron en el medio mínimo apropiado con o sin los precursores de DMS DMSP, MMPA, metionina y MeSH tal y como se detalla en la columna 2. Los valores de la producción de DMS y MeSH son las medias de tres réplicas biológicas con su desviación estándar respectiva. ND; no detectado.

Resultados y Discusión

Cepa	Adición de suplemento al medio de cultivo	pmol DMS $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$	pmol MeSH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$
salvaje	Ninguno	7,65 ± 0,56	ND
	DMSP	6,99 ± 1,42	ND
	MMPA	23,91 ± 1,57	1035,69 ± 178,74
	Metionina	55,22 ± 5,00	1433,47 ± 326,01
	MeSH	34,42 ± 5,13	ND
<i>megL</i> (J565)	Ninguno	ND	ND
	MMPA	23,80 ± 6,36	1744,46 ± 401,06
	Metionina	ND	ND
	MeSH	51,55 ± 3,10	ND
<i>Emiliana huxleyi</i> CCMP374	Ninguno	1,4 ± 0,52	ND
<i>Rhizobium leguminosarum</i> J391	MeSH	ND	ND
J391 pBIO2219 (clon de la región de)	MeSH	57,72 ± 2,65	ND
J391 pBIO2220 (pBIO2219 mutado en)	MeSH	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> BL21	MeSH	ND	ND
<i>E.coli</i> BL21 pBIO2223 (gen de clonado solo)	MeSH	414,07 ± 88,06	ND
(J566)	Ninguno	ND	ND
	MMPA	ND	2078,68 ± 279,58
	Metionina	ND	4926,16 ± 685,68
	MeSH	ND	ND
<i>P.fragi</i> DSM 3456	Ninguno	12,95 ± 5,71	ND
	MeSH	21,77 ± 2,56	ND
<i>Pseudomonas</i> sp. GM41	Ninguno	2,61 ± 0,07	ND
	MeSH	35,09 ± 4,84	ND
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110	Ninguno	385,00 ± 38,17	ND
	MeSH	596,79 ± 32,82	ND
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	Ninguno	5,69 ± 0,23	ND
	MeSH	7,53 ± 0,07	ND
<i>E.coli</i> BL21 pBIO2224 (de <i>Pseudomonas</i> sp. GM41 clonado)	MeSH	198,24 ± 40,01	ND
<i>E.coli</i> BL21 pBIO2225 (de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 clonado)	MeSH	78,13 ± 6,76	ND
<i>E.coli</i> BL21 pBIO2227 (de <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 clonado)	MeSH	536,46 ± 52,96	ND
<i>E.coli</i> BL21 pBIO2229 (de <i>M.tuberculosis</i> H37Rv clonado)	MeSH	65,46 ± 2,55	ND
<i>E. coli</i> BL21 pBIO2231 (de <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142 clonado)	MeSH	46,59 ± 13,64	ND

3.19. DISCUSIÓN del capítulo de producción de dimetilsulfuro (DMS) por

La producción microbiana de dimetilsulfuro (DMS) tiene un impacto sobre la regulación del clima (Ayers & Gras, 1991; Vallina & Simó, 2007), el ciclo del azufre (Sievert y col., 2007) y la señalización en organismos superiores (DeBose & Nevitt, 2008). Se cree ampliamente que el osmolito marino dimetilsulfoniopropionato (DMSP) es en gran parte responsable de esta producción de DMS. En este trabajo se ha identificado una nueva ruta metabólica bacteriana que genera DMS a partir del compuesto volátil metanotiol (MeSH) en un proceso que no es dependiente de DMSP. El modelo propuesto para la nueva ruta metabólica descrita, se muestra en la Figura 37.

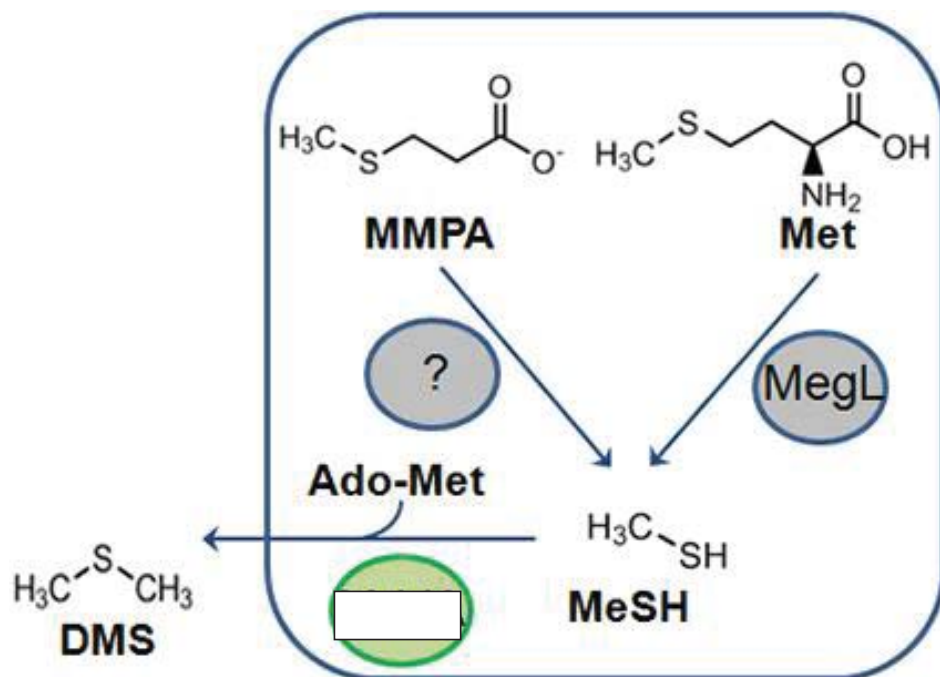


Figura 37. Modelo propuesto de la ruta de formación de DMS dependiente de MeSH en *Halobacterium salinarum*. En *Halobacterium salinarum*, el MMPA y la metionina son catabolizados por enzimas aún desconocidas y por el enzima MegL respectivamente, dando lugar ambos a MeSH. A su vez el enzima *MegL* (círculo verde), metila el MeSH y genera DMS utilizando S-adenosil-L-metionina (Ado-Met) como donador de grupos metilo.

produce DMS a partir de medio mínimo con sulfato de magnesio como única fuente de azufre. Los niveles de DMS producidos por *Emiliana huxleyi* (7,65 ± 0,56 pmol DMS · min⁻¹ · mg proteína⁻¹) son superiores a los observados en las cepas de *Emiliana huxleyi* ensayadas (1,4 ± 0,52 pmol DMS · min⁻¹ · mg proteína⁻¹), cuya importancia en la producción de DMS vía lisis del DMSP está bien establecida (Steinke y col., 1998).

no tan sólo no sintetiza DMSP, la síntesis del cual solamente ha sido observada en el fitoplancton, macroalgas, algunos corales y pocas angiospermas halotolerantes (Raina y col., 2013; Stefels, 2000), sino que ni tan siquiera lo cataboliza. El genoma de esta bacteria antártica no contiene ningún gen homólogo de *dmdA* ni de ningún gen *ddd*, todos ellos implicados en el catabolismo del DMSP vía desmetilación o rotura respectivamente (Curson y col., 2011; Moran y col., 2012). Por tanto, la síntesis de DMS por se produce por una vía independiente de DMSP. Concretamente, sintetiza DMS a partir de los productos de la desmetilación y la desmetiolización del DMSP, el MMPA y el MeSH respectivamente (Figura 37), (Curson y col., 2011; Moran y col., 2012). Ambos productos también se pueden formar a partir de la metionina; el MMPA a través de la vía de reciclaje de la metionina (Reisch y col., 2011) y el MeSH mediante su degradación por el enzima metionina gamma liasa (Tanaka y col., 1977).

Además, puede desmetiolar el MMPA generando MeSH (Figura 37). Sin embargo, su genoma no contiene homólogos a los genes *dmdBCD* (Curson y col., 2011; Moran y col., 2012) cuyos productos forman MeSH a partir del MMPA. Por tanto, será sumamente interesante identificar los genes que llevan a cabo la desmetiolización del MMPA en esta bacteria antártica en el futuro.

El gen clave implicado en esta ruta de producción de DMS dependiente de MeSH es el gen *Ste14p*. La proteína que codifica, *Ste14p*, contiene un dominio S-isoprenilcisteína metiltransferasa C-terminal conservado (COG2020). El hecho de que se trate de una metiltransferasa es consistente con la ruta predicha, en la que *Ste14p* catalizaría la metilación del MeSH para formar DMS. Las isoprenilcisteína metiltransferasas, como p.ej. *Ste14p* de

Saccharomyces cerevisiae, catalizan la metilación dependiente de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) del grupo carboxilo de las proteínas (Romano & Michaelis, 2001). Consistente con esto, la actividad *in vitro* de *Ste14p* requiere absolutamente de AdoMet como donador del grupo metilo para convertir el MeSH en DMS.

Los diversos programas informáticos han predicho que la proteína *Ste14p* es una proteína con 4-6 dominios transmembrana, al igual que la proteína *Ste14p*, la cual tiene 6 dominios transmembrana y se localiza en la membrana del retículo endoplasmático de *Saccharomyces cerevisiae* (Romano & Michaelis, 2001). Asimismo, tan sólo se obtuvo actividad ^{35}S en la fracción celular correspondiente a membranas. Sin embargo, la MET después del inmunomarcaje con el anticuerpo anti-*Ste14p* mostró la presencia del enzima principalmente en unas agrupaciones de finas fibras localizadas en distintos puntos del citoplasma. Además, cerca de las fibras se pudieron observar con frecuencia zonas de baja densidad de electrones que podrían corresponder a acumulaciones momentáneas del gas DMS en el citoplasma celular. Actualmente, numerosos estudios han demostrado tanto en organismos eucariotas como procariotas que muchos enzimas metabólicos forman amplias agrupaciones intracelulares (O'Connell y col., 2012; Petrovska y col., 2014). Estas concentraciones proteicas enzimáticas se pueden presentar en formas fibrilares, focos puntuales o localizarse en microcompartimentos (O'Connell y col., 2012). De todos modos, a pesar de las evidencias de que muchos enzimas metabólicos se ensamblan formando grandes agregados, todavía no está claro si la agregación es necesaria para la funcionalidad de los enzimas, o son puntos de reserva de los mismos sin actividad metabólica. Por ejemplo, Petrovska y col. (2014) han descrito unas agrupaciones fibrilares en levaduras correspondientes al enzima glutamina sintasa de apariencia similar a las de *Ste14p*. Los autores proponen que estas agrupaciones fibrilares corresponderían a un mecanismo de almacenamiento de este enzima (Petrovska y col., 2014). Así pues, podría ser que el enzima *Ste14p* lleve a cabo su actividad en la membrana interna y en determinadas circunstancias se almacene en el citoplasma en forma de agrupaciones fibrilares. Además, el hecho de que las fibras citoplasmáticas de *Ste14p* sean agregados de la proteína *Ste14p* explicaría su ausencia en el mutante *ste14p*⁻ (J566). Sin embargo, se requerirán futuros estudios para comprender la regulación de la actividad de *Ste14p* bajo diferentes condiciones y distintas fases de crecimiento y poderla relacionar con su localización celular.

Por otra parte, el gen *dddP* está altamente conservado en cepas específicas de *Pseudomonas* sp. Además, el gen *dddP* en las distintas cepas de *Pseudomonas* que lo contienen está posicionado entre genes que no han sido caracterizados en ningún organismo y que no tienen conexiones conocidas con el metabolismo del azufre.

Además de encontrarse en el género *Pseudomonas*, el gen *dddP* está ampliamente distribuido en bacterias de diversos grupos taxonómicos importantes y ampliamente estudiados como actinobacterias (*Mycobacterium*, *Gordonia* y *Rhodococcus*), rizobiales (*Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*) y cianobacterias (*Cyanothece* sp., *Pseudoanabaena* sp. y *Nodosilinea* sp.). Previamente se conocía que algunas micobacterias que contienen el gen *mddA* producen DMS, incluyendo *Mycobacterium bovis* BCG (McNerney y col., 2012), pero hasta el momento no se han descrito cepas de *Bradyrhizobium* procedentes de suelos o cianobacterias fijadoras de N₂ que produzcan DMS. En este trabajo se ha demostrado que *B.diazoefficiens* USDA 110 y *Cyanothece* sp. ATCC 51142 producen DMS cuando se incuban en medio mínimo y esta producción de DMS se ve aumentada por la adición de MeSH. Nuestro descubrimiento de que algunas cianobacterias son *+* podría explicar por qué la producción de DMS observada en lagos coincidía con las floraciones o *blooms* de cianobacterias (Zinder & Brock, 1978b). Además, los genes homólogos a *dddP* tanto de *B.diazoefficiens* USDA 110 como de *Cyanothece* sp. ATCC 51142 tampoco están ligados a genes conocidos del metabolismo del azufre. Finalmente, también existen proteínas homólogas a *dddP* en algunos planctomycetes, flavobacterias, espiroquetas, verrucomicrobios, rhodobacterias y β -, γ - y ϵ -proteobacterias.

En cuanto a su distribución ambiental, cabe decir que la proteína *dddP* está presente en la mayoría de metagenomas consultados, aunque sorprendentemente se observan abundancias relativas más elevadas en ambientes terrestres, particularmente en metagenomas de suelo. Sin embargo, en ambientes marinos, las proteínas DmdA y DddP son claramente mucho más abundantes que el resto, hecho que está de acuerdo con lo descrito por Moran y col. (2012). El gen *dddP* y otros genes *ddd* también están presentes en ambientes marinos, pero son escasos. Dado que *dddP* está presente en algunos ambientes marinos, la ruta *dddP* podría estar implicada en la producción de DMS dependiente de DMSP actuando indirectamente sobre los catabolitos de la desmetilación/desmetiolización del DMSP, MMPA y MeSH. En consonancia

con el hecho de que el DMSP es una molécula sintetizada por organismos marinos, las frecuencias de las proteínas Ddd o DmdA en metagenomas terrestres son muy bajas, donde es abundante.

Por otra parte, la transcripción del gen *ddd* no parece ser que esté regulada por el reconocimiento y activación del promotor, ya que presentaba una expresión de ~70 unidades Miller de actividad β -galactosidasa independientemente de las moléculas inductoras potenciales o condiciones ambientales ensayadas. En *M.tuberculosis* H37Rv, la transcripción de *ddd* se induce 4 veces por la adición del fármaco anti-tuberculoso tioridazina por razones desconocidas, aunque éste contiene un grupo sulfuro metilado (Dutta y col., 2010). Sin embargo, no hay otros experimentos que describan condiciones que afecten significativamente a la transcripción de *ddd* en *B.diazoefficiens* USDA 110 o *Cyanothece* sp. ATCC 51142.

En la producción de DMS a partir del DMSP, la regulación de los genes *ddd* y la actividad de las DMSP liasas varían entre las diferentes bacterias, pero hay tendencias que se rigen por el metabolismo bacteriano del DMSP (Curson y col., 2011). Es decir, las bacterias que utilizan el DMSP como fuente de carbono tienden a mostrar altos niveles de inducción del gen o genes *ddd* tanto por el DMSP como por sus catabolitos 3HP y acrilato (Curson y col., 2011). Por ejemplo, en *Marinomonas* sp. MWLY1 la producción de DMS es inducida por el DMSP, pero no por el acrilato o el 3HP. En *Halomonas* sp. y *Alcaligenes* sp. el fenotipo Ddd⁺ (DMS dependiente de DMSP), es inducido tanto en respuesta al DMSP como al acrilato y al 3HP. Finalmente, la expresión de los genes *dddP* y *dddQ* de *R.pomeroi* DSS-3 sólo se induce ligeramente por la presencia de DMSP. En cambio, la expresión del gen *dddW* de esta cepa se induce ~10 veces en presencia del DMSP (Curson y col., 2011). Sin embargo, las bacterias que no usan el DMSP como fuente de carbono como *Sulfitobacter* EE36, exhiben una expresión constitutiva del gen *ddd* (Curson y col., 2008) de modo similar a lo hallado para el gen *mddA*. En *Sulfitobacter* se ha propuesto que el DMS se genera como molécula de señalización (Curson y col., 2008). Esta es una posible explicación para la existencia de la vía *ddd* en *Sulfitobacter* y otras bacterias Ddd⁺, ya que está bien documentado que el DMS es un quimioatrayente (DeBose & Nevitt, 2008; Nevitt & Bonadonna, 2005; Steinke y

col., 2006) y en algunos ambientes puede jugar un papel considerable en la estructuración de las comunidades bacterianas (Raina y col., 2010).

Por otra parte, muchas bacterias heterótrofas, incluyendo *P.putida* DS1 (Endoh y col., 2003), oxidan el DMS a DMSO, y algunas acoplan esta reacción a la síntesis de ATP y a un aumento de la producción de biomasa (Boden y col., 2011; Green y col., 2011).

también produce DMSO, probablemente vía oxidación de DMS ya que la cepa salvaje produce 7,4 veces más DMSO que la cepa mutante J566. Sin embargo, el genoma de no contiene el gen *ddhA*, el cual codifica para una DMS deshidrogenasa que genera DMSO a partir del DMS en *Rhodovulum sulfidophilum* (McDevitt y col., 2002). Alternativamente, el DMSO podría generarse químicamente por la reacción del DMS con radicales libres de oxígeno, y consecuentemente su producción podría formar parte de una cascada antioxidante protectora frente al estrés oxidativo (Sunda y col., 2002).

No obstante, en es poco probable que la vía tenga un papel en la protección frente al estrés oxidativo o la producción de energía ya que el mutante (J566) no muestra un déficit de crecimiento respecto a la cepa salvaje en ninguna de las condiciones ensayadas, incluido el estrés oxidativo, y la expresión del gen tampoco se ve afectada por moléculas inductoras de estrés oxidativo.

Aunque el papel de la vía en bacterias sigue sin estar claro, es muy posible, dada la amplia distribución del gen en términos de taxonomía bacteriana y ecológicos, que esta ruta juegue un papel importante en el ciclo global del azufre biogénico. Además, la abundancia relativa de este gen en metagenomas terrestres, mayor que en los metagenomas marinos, indica que el DMS producido por fuentes no marinas podría jugar un papel más significativo en la producción global de DMS de lo que previamente se creía. Por tanto, los modelos actuales sobre la producción global de DMS deberían modificarse para tener en cuenta el DMS producido por rutas independientes de DMSP, especialmente en ambientes terrestres.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- 1.
2. produce un exopolisacárido
3. El EPS
4. El EPS
5. El EPS
6. produce dimetilsulfuro (DMS) a partir del metanotiol (MeSH) por una ruta independiente de DMSP mediante la acción del nuevo enzima codificado por el gen .
7. produce MeSH a partir de la metionina mediante el gen *megL* y a partir del MMPA mediante una ruta aún sin identificar.
8. El enzima es una metiltransferasa cuya actividad requiere la presencia de una molécula donadora de grupos metilo como AdoMet.
9. El enzima es una proteína con 4-6 dominios transmembrana según los programas bionfornáticos consultados. Su actividad metabólica se desarrolla a nivel de membrana, aunque los estudios iniciales de inmunolocalización por MET muestran la presencia del enzima en agregados fibrilares localizados en el citoplasma de .
10. La proteína está presente en una amplia variedad de importantes grupos taxonómicos incluyendo *Pseudomonas* sp., múltiples cepas de actinobacterias del género *Mycobacterium*, incluyendo a los patógenos *M.tuberculosis* y *M.avium*, *Gordonia* y *Rhodococcus*; miembros de los rizobiales incluyendo los fijadores de N₂

Conclusiones

Bradyrhizobium y *Mesorhizobium* y cianobacterias fijadoras de N₂ incluyendo *Cyanothece* sp., *Pseudoanabaena* sp., y *Nodosilinea* sp. También existen proteínas homólogas a en algunos planctomycetes, flavobacterias, gammaproteobacterias, verrucomicrobios, rhodobacterales, betaproteobacterias, espiroquetas y epsilonproteobacterias.

11. La proteína está presente en la mayoría de metagenomas consultados, aunque se observan abundancias relativas más elevadas en ambientes terrestres, particularmente en metagenomas de suelo.
12. La transcripción del gen no se ve afectada por las moléculas inductoras potenciales o condiciones ambientales ensayadas.
El gen no está ligado a otros genes del metabolismo del azufre en
14. El mutante no produce DMS a partir de las moléculas precursoras ni presenta agregados fibrilares en el citoplasma.
15. El mutante no exhibe déficit de crecimiento respecto a la cepa salvaje bajo ninguna de las condiciones ensayadas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J. M. & Lillford, J. P. (2008).** Food Materials Science, Principles and Practice. Springer, Berlin.
- Altschul, S. F. y col. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Alves, V. D. y col. (2011).** Characterization of biodegradable films of a new microbial polysaccharide produced using glicerol byproduct. *Carbohydr Pol* **78**, 1582-1590.
- Amato, P. (2013).** Energy Metabolism at Low-temperature and Frozen Conditions in Cold-adapted Microorganisms. In *Cold-adapted Microorganisms*. Yumoto, I. 1st edition. Caister Academic Press, Norfolk. 71-96.
- Andreae, M. O., Elbert, W. & de Mora, S. J. (1995).** Biogenic sulfur emissions and aerosols over the tropical South Atlantic: 3. Atmospheric dimethylsulfide, aerosols and cloud condensation nuclei. *J Geophys Res* **100**, 11335-11356.
- Anthony, E. E. (1931).** A note on capsule staining. *Science* **73**, 319–320.
- Antranikian, G., Vorgias, C.E. & Bertoldo, C. (2005).** Extreme environments as a source for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv Biochem Eng Biotech* **96**, 219-262.
- Arrhenius, S. (1889).** Über die reaktiongeschwindigkeit bei der inversion von rohrzucker durch säuren. *Z Physik Chem* **4**, 226-248.
- Ayers, G. P. & Gras, J. L. (1991).** Seasonal relationship between cloud condensation nuclei and aerosol methanesulphonate in marine air. *Nature* **353**, 834–835.
- Ayers, G. P., Cainey, J. M., Gillett, R. W. & Ivey, J. P. (1997).** Atmospheric sulphur and cloud condensation nuclei in marine air in the Southern Hemisphere. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **352**, 203–211.
- Aziz, R. K. y col. (2008).** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.
- Baba Hamed, S. & Belhadri, M. (2009).** Rheological properties of biopolymers drilling fluids. *J Pet Sci Eng* **67**, 84–90.
- Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (1993).** Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.

- Berger, F., Morellet, N., Menu, F. & Potier, P. (1996).** Cold-shock and cold-acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *J Bacteriol* **178**, 2999–3007.
- Beringer, J. E. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188–198.
- Beringer, J. E. & Hopwood, D. A. (1976).** Chromosomal recombination and mapping in *Rhizobium leguminosarum*. *Nature* **264**, 291–293.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–1523.
- Blumenkrantz, N., & Asboe Hansen, G. (1973).** New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem*, **54**, 484-489.
- Boden, R., Murrell, J. C. & Schäfer, H. (2011).** Dimethylsulfide is an energy source for the heterotrophic marine bacterium *Sagittula stellata*. *FEMS Microbiol Lett* **322**, 188–193.
- Bolhuis, H. y col. (2006).** The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC Genomics* **7**, 169
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.L. & Agnely, F. (2012).** Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *Int J Pharm* **436**, 359-378.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V, Nichols, D. S. & McMeekin, T. A. (1997).** Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3068–3078.
- Bozal, N., Tudela, E., Roselló-Móra, R., Lalucat, J. & Guinea, J. (1997).** *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov; isolated from Antarctic coastal environment. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 345-351.
- Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., Jiménez, F. & Guinea, J. (2002).** *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 195-205.
- Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E. & Guinea, J. (2003).** Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1093-1100.

- Bozal, N., Montes, M.J. & Mercadé, E. (2007).** *Pseudomonas guineae* sp. nov., a new psychrotolerant bacterium from Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2609-2612.
- Bozal, N., Montes, M.J., Miñana-Galbis, D., Manresa, A. & Mercadé, E. (2009).** A new psychrotolerant bacterium isolated from Antarctic coastal area: *Shewanella vesiculosa* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 336-340.
- Bradford, M.M. (1976).** A dye binding assay for protein. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brambilla, E., Hippe, H., Hagelstein, A., Tindall, B. J. & Stackebrandt, E. (2001).** 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles* **5**, 23-33.
- Brinkmeyer, R. y col., (2003).** Diversity and Structure of Bacterial Communities in Arctic versus Antarctic Pack Ice. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6610-6619.
- Bruni, V., Gugliandolo, C., Maugeri, T. & Allegra, A. (1999).** Psychrotrophic bacteria from a coastal station in the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica). *New Microbiol* **22**, 357-363.
- Caron, D. A. (1987).** Grazing of attached bacteria by heterotrophic microflagellates. *Microb Ecol* **13**, 203-218.
- Celik, G. Y., Aslim, B. & Beyatli, Y. (2008).** Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydr Polym* **73**, 178-182.
- Charlson, R. J., Lovelock, J. E., Andreae, M. O. & Warren, S. G. (1987).** Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* **326**, 655-661.
- Chun, J. & Rainey, F. A. (2014).** Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 316-324.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. & Swings, J. (2002).** Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1551-1588.
- Convey, P., Brandt, A. & Nicol, S. (2013).** Life in a cold environment. In *Antarctica: Global Science from a Frozen Continent*. Walton, D. W. H. Cambridge University Press, New York, 161-210.

- Corsaro, M. y col. (2004).** Influence of growth temperature on lipid and phosphate contents of surface polysaccharides from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. *J Bacteriol* **186**, 29-34.
- Curson, A. R. J., Rogers, R., Todd, J. D., Brearley, C. A. & Johnston, A. W. B. (2008).** Molecular genetic analysis of a dimethylsulfonylpropionate lyase that liberates the climate-changing gas dimethylsulfide in several marine alpha-proteobacteria and *Rhodobacter sphaeroides*. *Environ Microbiol* **10**, 757–767.
- Curson, A. R. J., Todd, J. D., Sullivan, M. J. & Johnston, A. W. B. (2011).** Catabolism of dimethylsulfonylpropionate: microorganisms, enzymes and genes. *Nat Rev Microbiol* **9**, 849–859.
- D’Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G. & Gerday, C. (2006).** Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* **7**, 385–389.
- DeBose, J. L. & Nevitt, G. A. (2008).** The use of odors at different spatial scales: comparing birds with fish. *J Chem Ecol* **34**, 867–881.
- Decho, A.W. (1990).** Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. In *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*. Barnes, M. Aberdeen University Press, Aberdeen, 73-153.
- Decho, A.W. & López, G. R. (1993).** Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnol Oceanogr* **38**, 1633-1645.
- Deming, J. W. (2002).** Psychrophiles and polar regions. *Curr Opin Microbio* **5**, 301–309.
- Deshiikan, S. R., & Papadopoulos, K. D. (1998).** Modified booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid Polym Sci* **276**, 117-124.
- DeVos, P. y col. (1989).** Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid: ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 35–49.
- Dickinson, E. (2009).** Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll* **23**, 1473-1482.
- Downie, J. A. y col. (1983).** Cloned nodulation genes of *Rhizobium leguminosarum* determine host-range specificity. *MGG Mol Gen Genet* **190**, 359–365.
- Drotar, A., Burton, G. A., Tavernier, J. E. & Fall, R. (1987).** Widespread Occurrence of Bacterial Thiol Methyltransferases and the Biogenic Emission of Methylated Sulfur Gases. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1626-1631.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**, 350-356.
- Dutta, N. K., Mehra, S. & Kaushal, D. (2010). A *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor network responds to cell-envelope damage by the promising anti-mycobacterial thioridazine. *PLoS One* **5**, e10069.
- Ellis, T. N. & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**, 81–94.
- Endoh, T. y col. (2003). Characterization and identification of genes essential for dimethyl sulfide utilization in *Pseudomonas putida* strain DS1. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 83–91.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.
- Feller, G. & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol* **1**, 200–208.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **76**, 1648–1652.
- Fontaine, F., Fuchs, R. T. & Storz, G. (2011). Membrane localization of small proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **286**, 32464–32474.
- Freitas, F. y col. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresour Technol* **100**, 859-865.
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol* **29**, 388-398.
- Frias, A., Manresa, A., de Oliveira, E., López-Iglesias, C. & Mercade, E. (2010). Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted antarctic bacteria. *Microb Ecol* **59**, 476–486 (erratum in *Microb Ecol* 2010, vol. 60, issue 2, page 476).
- Friedman, A. M., Long, S. R., Brown, S. E., Buikema, W. J. & Ausubel, F. M. (1982). Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* **18**, 289–296.

- Gerday, C. (2013).** Catalysis and Protein Folding in Psychrophiles. In *Cold-adapted Microorganisms*. Yumoto, I. 1st edition. Caister Academic Press, Norfolk. 137-157.
- Gevers, D. y col. (2005).** Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* **3**, 733–739.
- Ghosh, T. y col. (2009).** Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* **19**, 2–15
- González, J.M., Johnston, A.W.B., Vila-Costa, M. & Buchan, A. (2010).** Genetics and Molecular Features of Bacterial Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and Dimethylsulfide (DMS) Transformations. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. Springer Berlin Heidelberg. 1201-1211.
- Goris, J., Suzuki, K., De Vos, P., Nakase, T. & Kersters, K. (1998).** Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can J Microbiol* **44**, 1148–1153.
- Green, D. H., Shenoy, D. M., Hart, M. C. & Hatton, A. D. (2011).** Coupling of dimethylsulfide oxidation to biomass production by a marine *Flavobacterium*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 3137–3140.
- Gunson, J. R. y col. (2006).** Climate sensitivity to ocean dimethylsulphide emissions. *Geophys Res Lett* **33**, L07701.
- Gutiérrez, T., Mulloy, B., Bavington, C., Black, K., & Green, D. H. (2007a).** Partial purification and chemical characterization of a glycoprotein (putative hydrocolloid) emulsifier produced by a marine bacterium *Antarctobacter*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 1017-1026.
- Gutiérrez, T., Mulloy, B., Black, K., & Green, D. H. (2007b).** Glycoprotein emulsifiers from two marine *Halomonas* species: Chemical and physical characterization. *J Appl Microbiol* **103**, 1716-1727.
- Gutiérrez, T., Shimmield, T., Haidon, C., Black, K., & Green, D. H. (2008).** Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. strain TG12. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4867-4876.
- Gutiérrez, T., Leo, V. V., Walker, G. M., & Green, D. H. (2009).** Emulsifying properties of a glycoprotein extract produced by a marine *Flexibacter* species strain TG382. *Enzyme Microb Technol* **45**, 53-57.
- Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.

- Harrison, P. J., Waters, R. E. & Taylor, F. J. R. (1980).** A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J Phycol* **16**, 28–35.
- Hirsch, P. R. & Beringer, J. E. (1984).** A physical map of pPH1JI and pJB4JI. *Plasmid* **12**, 139–141.
- Hofmann, K. & Stoffel, W. (1993).** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**, 166.
- Hung, C. C., Santschi, P. H., & Gillow, J. B. (2005).** Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* biovar II. *Carbohydr Polym* **61**, 141-147.
- Iyer, A., Mody, K., & Jha, B. (2006).** Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme Microb Technol* **38**, 220-222.
- Johnston, A. W., Bibb, M. J. & Beringer, J. E. (1978).** Tryptophan genes in *Rhizobium* - their organization and their transfer to other bacterial genera. *Mol Gen Genet* **165**, 323–330.
- Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. (1994).** A Model Recognition Approach to the Prediction of All-Helical Membrane Protein Structure and Topology. *Biochemistry* **33**, 3038–3049.
- Junge, K., Eicken, H., Deming, J. W. (2004).** Bacterial activity at -2 to -20 °C in Arctic Wintertime sea ice. *Appl Environ Microbiol* **70**, 550-557.
- Juretic, D., Zoranic, L. & Zucic, D. (2002).** Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology. *J Chem Inf Comput Sci* **42**, 620-632.
- Kachlany, S. C. y col. (2001).** Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ Microbiol* **3**, 774-784.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. & Trollinger, D. (1988).** Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**, 191–197.
- Kettle, A. J. & Andreae, M. O. (2000).** Flux of dimethylsulfide from the oceans: A comparison of updated data sets and flux models. *J Geophys Res D Atmos* **105**, 26793–26808.
- Kiene, R. P. & Visscher, P. T. (1987).** Production and Fate of Methylated Sulfur Compounds from Methionine and Dimethylsulfoniopropionate in Anoxic Salt Marsh Sediments. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2426-2434.
- Kiene, R. P. & Bates, T. S. (1990).** Biological removal of dimethyl sulphide from sea water. *Nature* **345**, 702–705.

- Kiene, R. P. & Hines M. E. (1995).** Microbial formation of dimethyl sulfide in anoxic *Sphagnum* peat. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2720-2726.
- Kim, S.J. & Yim, J.H. (2007).** Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. *J Microbiol* **45**, 510-514.
- King, E.O., Ward, M.K. & Rainey, D.E. (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**, 301-307.
- Klassen, J. L. & Currie, C. R. (2012).** Gene fragmentation in bacterial draft genomes: extent, consequences and mitigation. *BMC Genomics* **13**, 14.
- Krembs, C., Eicken, H., Junge, K., & Deming, J. W. (2002).** High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: Implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep Sea Res Part I: Oceanogr Res Pap* **49**, 2163-2181.
- Kriss, A. E., Mitskevich, I. N., Rozanova, E. P. & Osnitskaia, L. K. (1976).** Microbiological studies of the Wanda Lake (Antarctica). *Mikrobiologiya* **45**, 1075–1081.
- Kulp, A. & Kuehn, M. J. (2010).** Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**, 163–184.
- Kumar, A. S., Mody, K. & Jha, B. (2007).** Bacterial exopolysaccharides-a perception. *J Basic Microbiol* **47**, 103–117.
- Lana, A. y col. (2011).** An updated climatology of surface dimethylsulfide concentrations and emission fluxes in the global ocean. *Global Biogeochem Cy* **25**, GB1004-1021.
- Lim, J., Thomas, T. & Cavicchioli, R. (2000).** Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococoides burtonii*. *J Mol Biol* **297**, 553–567.
- Liu, S.B. y col. (2013).** Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM20310. *Appl Environ Microbiol* **79**, 224-230.
- Loaec, M., Olier, R. & Guezennec, J. (1997).** Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Res* **31**, 1171–1179.
- Loaec, M., Olier, R. & Guezennec, J. (1998)** Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr Polym* **35**, 65–70.
- Lomans, B.P. y col. (1997).** Formation of dimethyl sulfide and methanethiol in anoxic freshwater sediments. *App Environ Microbiol* **63**, 4741-4747.

- Lovelock, J. E., Maggs, R. J. & Rasmussen, R. A. (1972). Atmospheric Dimethyl Sulphide and the Natural Sulphur Cycle. *Nature* **237**, 452–453.
- Ma, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2006). *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environ Microbiol* **8**, 455-465.
- Mancuso Nichols, C. A., Garon, S., Bowman, J. P., Raguénès, G., & Guézennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J Appl Microbiol* **96**, 1057-1066.
- Mancuso Nichols, C. A., Guezennec, J., & Bowman, J. P. (2005a). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: A review. *Mar Biotechnol* **7**, 253-271.
- Mancuso Nichols, C. A. y col. (2005b). Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb Ecol* **49**, 578-589.
- Mancuso Nichols, C. A., Bowman, J. P., & Guezennec, J. (2005c). Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3519-3523.
- Marx, J. G., Carpenter, S. D., & Deming, J. W. (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Can J Microbiol* **55**, 63-72.
- Matsumoto, Y. & Kuroyanagi, Y. (2010). Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* **21**, 715–726.
- Maugeri, T. L., Gugliandolo, C. & Bruni, V. (1996). Heterotrophic bacteria in the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica). *New Microbiol* **19**, 67–76.
- McDevitt, C. A., Hugenholtz, P., Hanson, G. R. & McEwan, A. G. (2002). Molecular analysis of dimethyl sulphide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*: its place in the dimethyl sulphoxide reductase family of microbial molybdopterin-containing enzymes. *Mol Microbiol* **44**, 1575–1587.
- McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405.

- McNerney, R., Mallard, K., Okolo, P. I. & Turner, C. (2012).** Production of volatile organic compounds by *Mycobacteria*. *FEMS Microbiol Lett* **328**, 150–156.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989).** Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159-167.
- Messing, J. (1979).** A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb DNA Tech Bull* **2**, 43-48.
- Minnikin, D. E., Collins, M. D. & Goodfellow, M. (1979).** Fatty Acid and Polar Lipid Composition in the Classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and Related Taxa. *J Appl Bacteriol* **47**, 87–95.
- Molin, G., Ternström, A. & Ursing, J. (1986).** *Pseudomonas lundensis*, a new bacterial species isolated from meat. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 339–342.
- Montes, M.J. y col. (1999).** Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **22**, 97-105.
- Montes, M.J., Mercadé, E., Bozal, N. & Guinea, J. (2004).** *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1521-1526.
- Montes, M.J., Bozal, N. & Mercadé, E. (2008).** *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from Antarctic environment *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1346-1349.
- Moran, J. J., House, C. H., Vrentas, J. M. & Freeman, K. H. (2008).** Methyl sulfide production by a novel carbon monoxide metabolism in *Methanosarcina acetivorans*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 540–542.
- Moran, M. A., Reisch, C. R., Kiene, R. P. & Whitman, W. B. (2012).** Genomic insights into bacterial DMSP transformations. *Ann Rev Mar Sci* **4**, 523–542.
- Morita, R. Y. (1975).** Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **39**, 144–167.
- Mulet, M., Lalucat, J. & García-Valdés, E. (2010).** DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* **12**, 1513-1530.
- Mullis, K. y col. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-173.
- Nevitt, G. A. & Bonadonna, F. (2005).** Sensitivity to dimethyl sulphide suggests a mechanism for olfactory navigation by seabirds. *Biol Lett* **1**, 303–305.

- Nevot, M., Deroncelé, V., Montes, M. J. & Mercade, E. (2008). Effect of incubation temperature on growth parameters of *Pseudoalteromonas antarctica* NF3 and its production of extracellular polymeric substances. *J Appl Microbiol* **105**, 255–263.
- Nguyen, V. T., Gidley, M. J. & Dykes, G. A. (2008). Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiol* **25**, 471–478.
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B.Jr. (1997). Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environ Technol* **31**, 1145-1158.
- Niemann, S., Puehler, A., Tichi, H.V., Simon, R. & Selbitschka, W. (1997). Evaluation of the resolving power of the three different fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J Appl Microbiol* **82**, 477-484.
- O'Connell, J. D., Zhao, A., Ellington, A. D. & Marcotte, E. M. (2012). Dynamic reorganization of metabolic enzymes into intracellular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 89–111.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. & Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biol Technol* **50**, 87–94.
- Osman, S. F., & Fett, W. F. (1989). Structure of an acidic exopolysaccharide of *Pseudomonas marginalis* HT041B. *J Bacteriol* **171**, 1760-1762.
- Pasquier, C. & Hamodrakas, S.J. (1999). An hierarchical artificial neural network system for the classification of transmembrane proteins. *Protein Eng* **12**, 631-634.
- Péterszegi, G., Fodil-Bourahla, I., Robert, A. M., & Robert, L. (2003). Pharmacological properties of fucose. applications in age-related modifications of connective tissues. *Biomed Pharmacother* **57**, 240-245.
- Petrovska, I. y col., (2014). Filament formation by metabolic enzymes is a specific adaptation to an advanced state of cellular starvation. *Elife* doi:10.7554/eLife.02409
- Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Bio.* **6**, 125–136.

- Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010).** Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Mar Drugs* **8**, 1779-1802.
- Qin, G., Zhu, L., Chen, X., Wang, P. G., & Zhang, Y. (2007).** Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Microbiol* **153**, 1566-1572.
- Quinn, P. K. & Bates, T. S. (2011).** The case against climate regulation via oceanic phytoplankton sulphur emissions. *Nature* **480**, 51–56.
- Raina, J.B., Dinsdale, E. A., Willis, B. L. & Bourne, D. G. (2010).** Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations? *Trends Microbiol* **18**, 101–108.
- Raina, J.B. y col. (2013).** DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. *Nature* **502**, 677–680.
- Ramasamy, D. y col. (2014).** A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 384–391.
- Read, R. R., & Costerton, J. W. (1987).** Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can J Microbiol* **33**, 1080-1090.
- Reddy, K. J., Haskell, J. B., Sherman, D. M. & Sherman, L. A. (1993).** Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *J Bacteriol* **175**, 1284–1292.
- Reddy G.S.N., Matsumoto, G.I., Schumann, P., Stackerbrandt, E. & Shivaji, S. (2004).** Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 713-719.
- Reddy, C.A. y col. (2007).** Methods for General and Molecular Biology. 3rd edition. ASM Press Washington, USA.
- Rehm B.H.A. (2009).** Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: applications and perspectives. Caister Academic Press, Norfolk.
- Rehm B.H.A. (2010).** Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol* **8**, 578-592.
- Reisch, C. R., Moran, M. A. & Whitman, W. B. (2011).** Bacterial catabolism of dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Front Microbiol* **2**, 172.

- Ricker, N., Qian, H. & Fulthorpe, R. R. (2012). The limitations of draft assemblies for understanding prokaryotic adaptation and evolution. *Genomics* **100**, 167–175.
- Rodríguez-Carmona, E. & Villaverde, A. (2010). Nanostructured bacterial materials for innovative medicines. *Trends Microbiol* **18**, 423–430.
- Romano, J. D. & Michaelis, S. (2001). Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ste14p, founding member of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase family. *Mol Biol Cell* **12**, 1957–1971.
- Roselló-Móra, R. (2009). La taxonomía del siglo XXII. *Actualidad SEM* **48**, 18-24.
- Rost, B., Yachdav, G. & Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **32**, W321–6.
- Rusch, D. B. y col. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol* **5**, e77.
- Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F. & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**, 441–448.
- Schleifer, K. H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* **32**, 533–542.
- Shivaji, S. y col. (1989). Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* **55**, 767–770.
- Sievert, S., Kiene, R. & Schulz-Vogt, H. (2007). The Sulfur Cycle. *Oceanography* **20**, 117–123.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **71**, 522–525.
- Singh, P., Hanada, Y., Singh, S. M. & Tsuda, S. (2014). Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **351**, 14-22.
- Snider, C., Jayasinghe, S., Hristova, K. & White, S. H. (2009). MPEx: a tool for exploring membrane proteins. *Protein Sci* **18**, 2624–2628.
- Spackman, D. H., Stein, W. H., & Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal Chem* **30**, 1190-1206.
- Spielmeier, A., Gebser, B. & Pohnert, G. (2011). Dimethylsulfide sources from microalgae: Improvement and application of a derivatization-based method for the

determination of dimethylsulfoniopropionate and other zwitterionic osmolytes in phytoplankton. *Mar Chem* **124**, 48–56.

Stackebrandt, E. y col. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043–1047.

Stefels, J. (2000). Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *J Sea Res* **43**, 183–197.

Steinke, M., Stefels, J. & Stamhuis, E. (2006). Dimethyl sulfide triggers search behavior in copepods. *Limnol Oceanogr* **51**, 1925–1930.

Steinke, M., Wolfe, G. V. & Kirst, G. O. (1998). Partial characterisation of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyase isoenzymes in six strains of *Emiliana huxleyi*. *Mar Ecol Prog Ser* **175**, 215–225.

Stets, E. G., Hines, M. E. & Kiene, R. P. (2004). Thiol methylation potential in anoxic, low-pH wetland sediments and its relationship with dimethylsulfide production and organic carbon cycling. *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 1–11.

Sudhamani, S. R., Tharanathan, R. N., & Prasad, M. S. (2004). Isolation and characterization of an extracellular polysaccharide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705. *Carbohydr Polym* **56**, 423–427.

Sunda, W., Kieber, D. J., Kiene, R. P. & Huntsman, S. (2002). An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature* **418**, 317–320.

Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3–9.

Taha, A. I. B. H. M. y col. (2013). Lipids in Cold-adapted Microorganisms. In *Cold-adapted Microorganisms*. Yumoto, I. 1st edition. Caister Academic Press, Norfolk. 189–214.

Takeuchi, A. y col. (2009). Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll-like receptor 4. *Int Immunopharmacol* **9**, 1562–1567.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596–1599.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.

Tanaka, H., Esaki, N. & Soda, K. (1977). Properties of L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas ovalis*. *Biochem* **16**, 100–106.

- Tindall, B. J. (1990).** Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Lett* **66**, 199–202.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W. & Kämpfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 249–266.
- Todd, J. D. y col. (2010).** Molecular dissection of bacterial acrylate catabolism-unexpected links with dimethylsulfoniopropionate catabolism and dimethyl sulfide production. *Environ Microbiol* **12**, 327–343.
- Todd, J. D. y col. (2011).** DddQ, a novel, cupin-containing, dimethylsulfoniopropionate lyase in marine roseobacters and in uncultured marine bacteria. *Environ Microbiol* **13**, 427–438.
- Todd, J. D., Kirkwood, M., Newton-Payne, S. & Johnston, A. W. B. (2012).** DddW, a third DMSP lyase in a model Roseobacter marine bacterium, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *ISME J* **6**, 223–226.
- Toole, D. A. & Siegel, D. A. (2004).** Light-driven cycling of dimethylsulfide (DMS) in the Sargasso Sea: Closing the loop. *Geophys Res Lett* **31**, L09308.
- Toulza, E., Tagliabue, A., Blain, S. & Piganeau, G. (2012).** Analysis of the global ocean sampling (GOS) project for trends in iron uptake by surface ocean microbes. *PLoS One* **7**, e30931.
- Vallina, S. M. & Simó, R. (2007).** Strong relationship between DMS and the solar radiation dose over the global surface ocean. *Science* **315**, 506–508.
- Vallina, S. M., Simó, R. & Manizza, M. (2007).** Weak response of oceanic dimethylsulfide to upper mixing shoaling induced by global warming. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **104**, 16004–16009.
- Vanhooren, P. T., & Vandamme, E. J. (1999).** L-fucose: Occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *J Chem Technol Biotechnol* **74**, 479-497.
- Violot, S. y col. (2005).** Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *J Mol Biol* **348**, 1211–1224.
- Vishniac, H. & Klinger, J. (1986).** Yeasts in the Antarctic deserts. In *Perspectives in Microbial Ecology. Proceedings of the 4th ISME*. Megusar, F. & Gantar, M. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana. 46-51.

- Wackett, L. P. y col. (1987).** Substrate analogues as mechanistic probes of methyl-S-coenzyme M reductase. *Biochemistry* **26**, 6012–6018.
- Waller, L. N., Fox, N., Fox, K. F., Fox, A., & Price, R. L. (2004).** Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Methods* **58**, 23-30.
- Walton, D.W. H. (2013).** Antarctica: Global Science from a Frozen Continent. 1st edition. Cambridge University Press, New York.
- Wayne, L.G. y col. (1987).** International Committee on Systematic Bacteriology, Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
- Wexler, M. y col. (2001).** The *Rhizobium leguminosarum* tonB gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. *Mol Microbiol* **41**, 801–816.
- Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. (2008).** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* **3**, 163–175.
- Wilson, K. (1987).** Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology* Ausubel, F.M. y col. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Wingender, J., Neu, T.R. & Flemming, H.C. (1999).** What are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Wingender, J., Neu, T.R. & Flemming, H.C. Springer Berlin Heidelberg, Berlin. 1-19.
- Wood, W. B. (1966).** Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol* **16**, 118–IN3.
- Woodhouse, M. T. y col. (2010).** Low sensitivity of cloud condensation nuclei to changes in the sea-air flux of dimethyl-sulphide. *Atmos Chem Phys* **10**, 7545-7559.
- Wuertz, S., Muller, E., Spaeth, R., Pfleiderer, P. & Flemming, H.C. (2000).** Detection of heavy metals in bacterial biofilms and microbial flocs with the fluorescent complexing agent Newport Green. *J Ind Microbiol Biotechnol* **24**, 116–123.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1998).** Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 813–819.

-
- Yarza, P. y col. (2008).** The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* **31**, 241–250.
- Yoshimune, K., Kawamoto, J. & Kurihara, T. (2013).** Proteins Involved in Cold Adaptation. In *Cold-adapted Microorganisms*. Yumoto, I. 1st edition. Caister Academic Press, Norfolk. 97-110.
- Young, J. P. W. y col. (2006).** The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**, R34.
- Yumoto, I. y col. (2001).** Assignment of *Pseudomonas* sp. strain E3 to *Pseudomonas psychrophila* sp. nov., a new facultatively psychrophilic bacterium. *Extremophiles* **5**, 343-349.
- Yumoto, I. & Yamazaki, K. (2013).** Ecology and Taxonomy of Psychrotolerant Bacteria in Artificial Cold Environments. In *Cold-adapted Microorganisms*. Yumoto, I. 1st edition. Caister Academic Press, Norfolk. 13-32.
- Zinder, S. H., Doemel, W. N. & Brock, T. D. (1977).** Production of volatile sulfur compounds during the decomposition of algal mats. *Appl Environ Microbiol* **34**, 859–860.
- Zinder, S. H. & Brock, T. D. (1978a).** Methane, carbon dioxide, and hydrogen sulfide production from the terminal methyl group of methionine by anaerobic lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 344–352.
- Zinder, S. H. & Brock, T. D. (1978b).** Production of methane and carbon dioxide from methane thiol and dimethyl sulphide by anaerobic lake sediments. *Nature* **273**, 226–228.

VII. PUBLICACIONES

VII. PUBLICACIONES

