



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Consecuencias de la amplificación clonal de
ISPpu12 en la capacidad de adaptación de
Pseudomonas stutzeri AN10 a condiciones de
estrés químico.

Lucía Mariel Olmos

Grado en Biología

Año académico 2013-14

DNI del alumno: Y1163988H

Trabajo tutorado por Dr. Rafael Bosch Zaragoza

Departamento de Microbiología

Se autoriza la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo: *Pseudomonas stutzeri* AN10, ISPpu12, ISPst9, evolución, adaptación, secuencias de inserción

a mis padres

Índice

Resumen	4
Capítulo 1. Introducción	5
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5
Degradación de hidrocarburos aromáticos por <i>P. stutzeri</i> AN10.....	6
Secuencias de inserción (ISs).....	7
Capítulo 2. Objetivos	10
Capítulo 3. Materiales y métodos	11
Cepas bacterianas	11
Análisis fisiológico comparativo	11
Análisis genómico comparativo	13
Capítulo 4. Resultados y discusión	15
Cuantificación de ISs y genes de interés	15
Análisis fisiológico comparativo	16
Capítulo 5. Conclusiones	25
Agradecimientos	26
Bibliografía	27

Resumen

IS*Ppu12* e IS*Pst9* son secuencias de inserción (IS) de la familia ISL3 que fueron descritas en la bacteria degradadora de naftaleno *Pseudomonas stutzeri* AN10. Trabajos previos del grupo de Microbiología de la UIB han revelado por una parte que la transposasa TnpA de IS*Ppu12* moviliza tanto IS*Ppu12* como IS*Pst9*, y por otra parte que durante el proceso de adaptación de la cepa AN10 al crecer a expensas de concentraciones crecientes de salicilato se produce una amplificación clonal de IS*Ppu12* y, por ende, de IS*Pst9*. Esto lleva a sugerir la siguiente hipótesis de partida: La movilización de las secuencias de Insección IS*Ppu12* y IS*Pst9* facilita la adaptación de la cepa AN10 a condiciones de estrés. Se disponía en el laboratorio dos derivados de la cepa AN10 (I24 y R10) nunca antes caracterizados, de los cuales el único dato conocido era que ambas habían sufrido una amplificación clonal de dichas ISs en su genoma de al menos 10 veces. En este trabajo se realiza el cálculo del número de copias de IS*Ppu12* y IS*Pst9* de los derivados demostrando que la amplificación fue de al menos 6 veces para IS*Pst9* y de mas 30 veces en IS*Ppu12*. Asimismo se realiza una caracterización genómica básica de dichas cepas y se las compara con la cepa original mostrando de esta manera que no se han perdido genes esenciales para la degradación de hidrocarburos durante el proceso de inserción. Se analiza posteriormente la eficacia biológica de las mismas al crecer tanto en presencia como ausencia salicilato, determinando así si los derivados con mayor número de copias de IS*Ppu12* se adaptan más fácilmente a las condiciones de estrés químico que la cepa salvaje. Se observó entonces que las cepas no presentaban variaciones en crecimiento al crecer en condiciones no estresantes pero si que lo hacía cuando se encontraban bajo estrés químico. Se detectó un comportamiento dual de los derivados con respecto a la cepa salvaje: I24 y R10 presentaban mayor eficacia biológica a concentraciones relativamente bajas de salicilato (3mM, 6mM y 9mM) mientras que muy poca eficiencia biológica con respecto a AN10 cuando se encontraban a concentraciones de 12mM y 15mM de salicilato. Se intentó justificar este comportamiento tras analizar posibles inactivaciones de genes codificantes para transportadores de hidrocarburos aromáticos al medio extracelular. Ssin embargo dichos genes se encontraban conservados al 100% en las dos cepas. Debido a esto no se encuentra una respuesta obvia a este comportamiento peculiar de los derivados por lo que se deja abierta la posibilidad a futuras investigaciones sobre la adaptación de I24 y R10 a estrés químico.

Capítulo 1. Introducción

Pseudomonas stutzeri

Pseudomonas stutzeri es una bacteria ubicua con un alto grado de adaptabilidad fisiológica y genética. La especie fue descrita primeramente por Burri y Stutzer en 1895. Van Niel y Allen, en 1952 determinaron con exactitud sus rasgos fenotípicos diferenciales, participando con esta aportación en la primera designación de su nombre realizada por Lehman y Neumann (1896-1927). *Pseudomonas stutzeri* es un miembro del género *Pseudomonas* en sentido estricto. Esta especie fue incluida dentro del género *Pseudomonas* (filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria), formando parte del grupo I (Palleroni 1970). *Pseudomonas stutzeri* es una especie que fenotípicamente se encuentra bien definida y que está presente en un gran número de diferentes entornos naturales. Es una bacteria desnitrificante no fluorescente que se encuentra distribuída ampliamente en el medio ambiente, y que excepcionalmente puede ser aislada como un patógeno oportunista de los seres humanos. La especie ha ido ganando importancia en las últimas décadas debido a su intervención en procesos de interés ecológico, específicamente por su capacidad metabólica relacionada en gran parte con la degradación de compuestos xenóbicos molecularmente complejos e hidrocarburos aromáticos. (Lalucat *et al.*, 2006).

Los rasgos fenotípicos del género incluyen ser Gram negativa, catalasa y oxidasa positiva con un metabolismo estrictamente aeróbico. Las cepas de *P. stutzeri*, como la mayoría de las especies de *Pseudomonas*, pueden crecer en medio mineral mínimo, de constitución química definida, con iones amonio o nitrato y con una sola molécula orgánica como única fuente de carbono y energía, no requiriendo así factores de crecimiento adicionales. En este sentido, la metabolización de xenobióticos o sustratos antropogénicos como fuentes únicas de carbono y energía por las cepas especializadas de la especie merece especial atención ya que puede

proporcionar nuevo material de trabajo que resulte en un potencial uso para biorremediación. Es en esta última particularidad en la cual se centra este trabajo.

De entre todas las cepas de *P. stutzeri* que forman parte de la colección del laboratorio de microbiología de la Universidad de las Islas Baleares, *P. stutzeri* AN10 (CCUG 29243) es la cepa con la que se han realizado mayores investigaciones al respecto y es con la que se trabajará en este estudio. AN10 fue aislada a partir de sedimentos marinos contaminados por hidrocarburos del Mediterráneo occidental (García-Valdés *et al.*, 1988) y puede ser considerada una cepa modelo para la degradación aeróbica de naftaleno.

Degradación de hidrocarburos aromáticos por P. stutzeri AN10

La cepa se aisló por su capacidad de utilizar 2-metilnaftaleno pero, adicionalmente, se vio que era capaz de utilizar naftaleno y salicilato como fuentes exclusivas de carbono y energía (Rosselló-Mora *et al.*, 1994b). Según caracterizaciones bioquímicas y análisis genómico de AN10, la cepa puede degradar naftaleno, salicilato y benzoato (Rosselló-Mora *et al.*, 1994b; Brunet-Galmés *et al.*, 2012). El naftaleno es el hidrocarburo aromático policíclico condensado más simple, y es abundante en los suelos. El naftaleno se cataboliza a través de dihidrodiol-cis-naftaleno, salicilaldehído y salicilato (Bosch *et al.*, 1999a). Este último se convierte en catecol, que luego se degrada por las vías de escisión meta (Bosch *et al.*, 1999b; 2000) u orto (Kulakov *et al.*, 2000), generando intermedios del ciclo del TCA; o en gentisato, que se degrada por una vía diferente hacia intermediarios del ciclo del TCA (Fuenmayor *et al.*, 1998).

Los genes que codifican las enzimas requeridas para el catabolismo de naftaleno en *P. stutzeri* AN10 no se encuentran codificadas en plásmidos como el caso del plásmido NAH7 (Connors y Barnsley, 1982; You *et al.*, 1986) sino que están ubicados en su cromosoma (Rosselló-Mora *et al.*, 1994a; Bosch *et al.*, 1999a). La vía de degradación del naftaleno en *P. stutzeri* AN10 está organizada en cuatro operones: *nahABFCED* que codifica para los genes que intervienen en la transformación del naftaleno en salicilato, también llamado ruta alta (figura 1) (Bosch *et al.*, 1999a);

nahGTHINLOMKJ que incluye los genes de la conversión de salicilato en intermediarios del ciclo de krebs denominado ruta baja (figura 2) (Bosch *et al.*, 2000); *nahR* que codifica para un gen regulador cuyo producto genico parece actuar como activador transcripcional de todos los promotores implicados en la degradación del naftaleno (Bosch *et al.*, 2000); y NahW, que es una segunda salicilato hidroxilasa transcripcionalmente activada por NahR (Bosch *et al.*, 1999b) y que es esencial para mantener alta la tolerancia a salicilato de la cepa AN10 (Lanfranconi *et al.*, 2009)

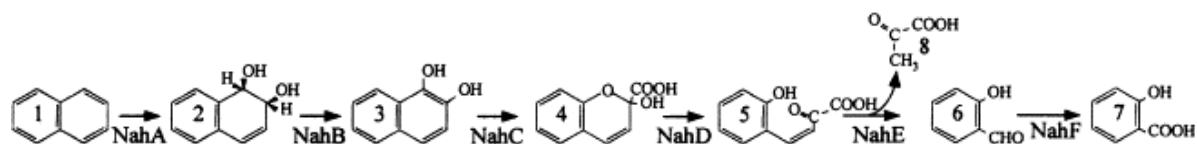


Fig. 1 Vía alta de degradación de naftaleno (naftaleno a salicilato) NAH de *P. stutzeri* AN10. Los metabolitos son: naftaleno(1), cis-naftaleno dihidrodiol(2), 1,2-dihidroxi-naftaleno (3), 2-hydroxychromene-2-carboxilato de metilo(4), cis-o-hydroxibenzalpiruvato(5), salicilaldehído(6), salicilato (7), y piruvato (8). Las enzimas y proteínas son: NahA, naftaleno dioxigenasa reductasa; NahB, naftaleno cis-dihidrodiol deshidrogenasa; NahC, 1,2-dioxigenasa dihidroxinaftaleno; NahD, 2-hydroxychromene-2-carboxilato deshidrogenasa; NahE, aldolasa 1,2-dihidroxi-benzilpiruvato y NahF, salicilaldehído deshidrogenasa (extraído de Bosch *et al.*, 1999a).

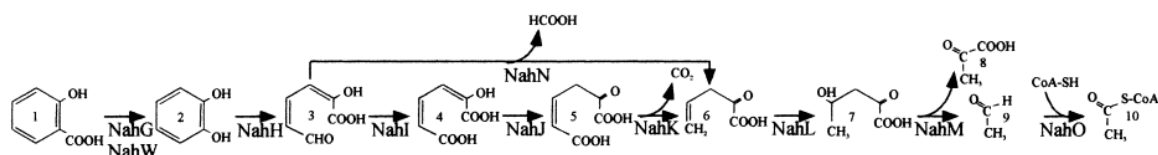


Fig. 2 Vía baja de degradación de naftaleno (de salicilato a piruvato y acetil-CoA) de *P. stutzeri* AN10. Los metabolitos son: salicilato(1), catecol(2), 2-hidroxi-3-oxo-6-oxoheptano-2,4-dienoal(3), 2-hidroxi-3-oxo-6-oxoheptano-2,4-dienoal(4), 2-oxo-3-oxo-6-oxoheptano-2,4-dienoal(5), 2-oxo-4-hidroxi-5-oxoheptano-2,4-dienoal(6), 4-hidroxi-2-oxovalerato(7), piruvato(8), acetilaldehído(9), y acetil-CoA (10). Las enzimas y proteínas son: NahG, salicilato hidroxilasa; NahH, catecol 2,3 dioxigenasa; NahI, hydroxy-3-oxoheptano-2,4-dienoal deshidrogenasa; NahJ, isomerasa 4 oxalocrotonate; NahK, descarboxilasa de 4 oxalocrotonate; NahL, Hidratasa 2-oxo-4-enoato; NahM, 2-oxo-4-hidroxi-5-oxoheptanoato aldolasa; NahN, hidrolasa semialdehído hydroxy-3-oxoheptano; NahO, acetilaldehído deshidrogenasa; NahR, proteína reguladora; NahW, salicilato hidroxilasa; TnpA, proteína transposasa. (extraído de Bosch *et al.*, 2000)

Secuencias de inserción (ISs)

El análisis genómico de *P. stutzeri* AN10 reveló la presencia de al menos 44 genes posibles de codificar para transposas pertenecientes a 10 familias diferentes de secuencias de inserción (ISs) (Brunet-Galmés *et al.*, 2012). Las ISs, también llamadas transposones simples (Mahillon y Chandler 1998), son pequeñas secuencias de DNA móviles que pueden cambiar su posición en el genoma. La

presencia de elementos genéticos móviles puede estar relacionada con la plasticidad genómica de la bacteria y adaptación a diferentes nichos ecológicos. Las ISs presentan secuencias invertidas en los extremos y codifican para enzimas transposasas, las cuales median el salto posicional. Adicionalmente, también pueden contener otros genes codificantes.

Las ISs pueden desempeñar roles importantes en cuanto a la expresión génica. En este sentido, pueden insertarse delante de un gen y activar su expresión, ya sea vía promotores contenidos en las ISs que promueven la transcripción del genes vecinos (Glansdorff *et al.*, 1981) o bien por la formación de promotores híbridos luego de la inserción (Siguier *et al.*, 2014).

Estudios retrospectivos indican que los elementos genéticos móviles juegan un papel importante en la adaptación rápida a los nuevos compuestos xenobióticos y esto ayuda a la construcción de vías catabólicas (Top y Springael, 2003).

La transposición en bacterias se encuentra regulada y se mantiene a niveles bajos debido a su posible efecto perjudicial en las funciones celulares, como el caso de los producidos en los procesos mutacionales o inactivación de genes (Nagy *et al.*, 2004). Esta inactivación de genes por ISs puede cumplir un papel importante en la modulación de la expresión génica. Se ha visto que los sistemas de regulación de la transposición dependen del estado fisiológico en que se encuentra la célula, siendo condiciones de estrés o situaciones de inanición ejemplos de estimuladores de la frecuencia de transposición (Ilves *et al.*, 2001).

ISPpu12 y ISPst9 son dos ISs presentes en *P. stutzeri* AN10 que pertenecen a la familia ISL3. Ambas ISs codifican para transposasas independientes pero con homología entre ellas muy estrecha. En este sentido, trabajos previos del grupo de Microbiología de la UIB han revelado por una parte que la transposición de ISPst9 puede estar mediada por la transposasa TnpA codificada en ISPpu12, principalmente al establecer interacción conjugativa con otro microorganismo (Christie-Oleza *et al.*, 2009; 2010). Además, se ha demostrado en *P. stutzeri* AN10 que la inactivación del gen *nahH* por ISPst9 fue esencial para poder degradar derivados clorados del salicilato y que la exición precisa de esta IS permitía recuperar la actividad del gen previamente inactivado (Christie-Oleza *et al.*, 2008).

Finalmente, un experimento de larga duración en la que se adaptó a *P. stutzeri* AN10 a crecer a concentraciones de salicilato de hasta 36 mM reveló que, en los clones finales del experimento, ambas ISs habían incrementado su número en el genoma de la cepa (Martín-Cardona, 2009)

Todos estos resultados sugirieron la siguiente hipótesis de partida: La presencia de varias copias de *ISPpu12* y *ISPst9* facilita la adaptación de la cepa AN10 a condiciones de estrés. Para ello, los investigadores del laboratorio de Microbiología de la UIB generaron derivados de AN10 ricos en copias de ambas ISs al someter a la cepa a continuas conjugaciones con *E. coli*. Dos derivados fueron seleccionados: I24 y R10. Se estimó a partir de hibridación con sondas específicas que ambos derivados presentaban más de 10 copias de ambas ISs. El presente trabajo de final de grado plantea primeramente la cuantificación de dichas ISs y posteriormente la comparación fisiológica y genómica de dichas cepas con respecto a la cepa salvaje, para así poder dilucidar si la presencia de un gran número de copias de las ISs de la familia *ISL3* facilita la adaptación de *P. stutzeri* a condiciones de estrés químico.

Capítulo 2. Objetivos

El siguiente trabajo de fin de grado realizado durante el transcurso del corriente año intenta profundizar en la adaptación fisiológica de *Pseudomas stutzeri* AN10 a concentraciones crecientes de salicilato. Mas concretamente presenta los siguientes objetivos:

1. Cuantificar el número de ISs (principalmente *ISPpu12* e *ISPst9*) presentes en los derivados I24 y R10.
2. Analizar genéticamente las similitudes y diferencias entre ambos derivados y la cepa salvaje, verificando la presencia, estado y nº de copias de los genes del catabolismo del naftaleno y sus metabolitos intermediarios.
3. Analizar fisiologicamente que no existen diferencias entre las cepas de estudio a condiciones no estresantes (crecimiento en LB, succinato).
4. Evaluar la eficacia biológica y respuesta adaptativa de la cepa AN10 y sus derivados frente a naftaleno, y frente a concentraciones crecientes de salicilato (condiciones de estrés químico).

Capítulo 3. Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Pseudomonas stutzeri AN10 es una cepa bacteriana degradadora de naftaleno aislada en sedimentos marinos del Mediterráneo Occidental (García-Valdés *et al.*, 1988). Las cepas de *P. stutzeri* I24 y R10 son derivados de AN10 de la colección de cepas del laboratorio de Microbiología que presentan, atendiendo a experimentos de hibridación con sondas específicas, más de 10 copias de las ISs *ISPst9* e *ISPpu12*.

Análisis fisiológico comparativo

Los experimentos de crecimiento se iniciaron siempre a partir de cultivos puros de las cepas de estudio en LB líquido incubados en agitación (180r.p.m) a 30°C durante 24hs. A partir de ellos se inocularon (1:60 vol:vol) Erlenmeyers de 100ml que contenían 30ml de medio Luria–Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001) o medio mineral basal (MMB) (Aragno y Schlegel, 1981), este último suplementado con la fuente de carbono correspondiente a las siguientes concentraciones: succinato, 0.5%; naftaleno, 3 mM; salicilato, 3-15 mM. Todas las cepas se hicieron crecer en agitación (180 r.p.m.) a 30°C. El crecimiento bacteriano se siguió por Absorbancia (600 nm) con un espectrofotómetro LKB Ultrospec III (GE Healthcare) (figura 3).

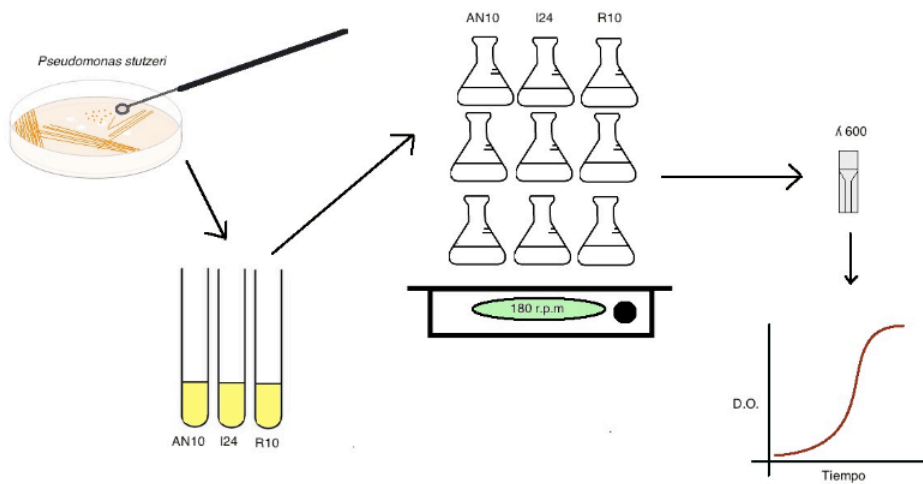


Fig. 3 Diseño experimental para la caracterización fisiológica comparativa

El análisis del crecimiento bacteriano se estandarizó con los siguientes tres parámetros (Zwietering *et al.*, 1990; Lanfranconi *et al.*, 2009): El tiempo de latencia (λ), que es el tiempo que tarda el cultivo bacteriano en iniciar la fase de crecimiento exponencial tras su inoculación en el medio de cultivo; la tasa de duplicación (μ), que es la tasa de división por unidad de tiempo durante la fase exponencial; y la absorbancia máxima ($A_{600 \text{ max}}$) que es el valor de lectura máximo obtenido a la longitud de onda de 600 nm durante el seguimiento del crecimiento celular (figura 4).

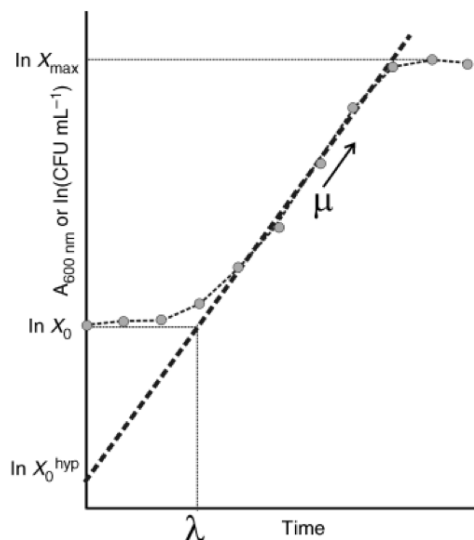


Fig. 4 Representación esquemática del crecimiento bacteriano (extraído de Lanfranconi *et al.*, 2009)

Análisis genómico comparativo

Para realizar el análisis genómico comparativo se partió de archivos de 8 millones de lecturas emparejadas de cada cepa (I24, R10 y AN10) obtenidas previamente por miembros del laboratorio de Microbiología de la UIB utilizando tecnología de secuenciación masiva Illumina.

Para todos los archivos de lecturas se analizó primeramente la calidad con el programa *FASTQC* (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). A continuación se utilizó el programa *SICKLE* (Joshi y Fass, 2011) para la realización del cribado por calidad. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: índice de calidad Phread ≥ 30 (máximo de un error en 1000 nucleótidos); longitud de fragmentos secuenciados de 100pb y exclusión de lecturas con nucleótidos no determinados (n).

De las lecturas cribadas por calidad se generaron subconjuntos de lecturas (0.25, 0.5, 1 y 2 millones de lecturas emparejadas) con el objetivo de establecer el mínimo necesario para obtener el mejor ensamblaje posible, atendiendo a parámetros convencionales tales como N50, tamaño del genoma y tamaño del contig mayor.

El ensamblaje *de Novo* y el mapeo contra el genoma original de la cepa AN10 (Brunet-Galmés *et al.*, 2012) se realizó con el paquete de software *NEWBLER* (454 Life Sciences). La anotación de los genomas ensamblados se realizó con el programa *PROKKA* (<http://www.vicbioinformatics.com/prokka-1.9.tar.gz>)

La presencia de genes en los genomas de las cepas derivadas de AN10 así como la cuantificación del número de copias de cada gen se realizó utilizando los programas *MEGABLAST* del paquete informático *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990) y *MAPPER* del paquete *NEWBLER* haciendo reclutamiento de lecturas de cada genoma contra un archivo multifasta conteniendo todos los genes identificados previamente en el genoma de la cepa AN10 (Brunet-Galmés *et al.*, 2012), así como un subconjunto de genes seleccionados para su estudio en mayor profundidad. Para estandarizar el resultado, el número de lecturas reclutadas por cada gen se corrigió por la longitud total del mismo, así como por el número conocido de copias en el genoma original. Los genes utilizados como referencia en el presente trabajo, el número de copias en

la cepa original, y el tamaño de los mismos fueron los siguientes: ADNr 16S, 4 copias, 1539pb; ADNr 23S, 4 copias, 20901pb; *gyrB*, 1 copia, 2415pb; *rpoD*, 1 copia, 1854pb; *dnaA*, 1 copia, 1119pb; *recA*, 1 copia, 1044pb. Finalmente, el programa *CD-hit* (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit/>) se utilizó para comparar el proteoma de las cepas de estudio con el de la cepa original y determinar si en el proceso de amplificación de secuencias de inserción se había truncado algún gen de interés para el presente estudio (p.e. genes catabólicos).

Capítulo 4. Resultados y discusión

Cuantificación de ISs y genes de interés

En primer lugar se realizó un análisis global por *MEGABLAST* para determinar si el genoma de las cepas derivadas había perdido algún gen o fragmento génico en el proceso de amplificación de las ISs. Los resultados indicaron que el genoma de las cepas derivadas de AN10 presentaba todos los 4374 genes previamente identificados en la cepa original (Resultado no mostrado).

A continuación se realizó un análisis más detallado con los genes catabólicos involucrados en la degradación de naftaleno y salicilato, así como con las diferentes ISs identificadas en el genoma de AN10. Tal como se puede ver en la tabla 1, todos los genes involucrados en la vía degradativa del naftaleno estaban presentes en copia única, lo que sugería que ambos derivados de AN10 mantienen intacto su potencial catabólico. Las únicas diferencias considerables se encontraron en tres de las 44 ISs previamente identificadas en el genoma de AN10. Así, y tal como se muestra en la tabla 1, el número de lecturas reclutados por las transposasas de *ISPpu12* y *ISPst9* en I24 es 53 y 6 veces superior al reclutado en AN10. Un resultado similar se observó con R10, sugiriendo que *ISPpu12* se encontraba en 32 copias, *ISPst9* en 11 copias y adicionalmente 5 amplificaciones en una transposasa que podría estar implicada directamente en la catálisis de salicilato. Adicionalmente, se observa una serie de transposasas descritas en la tabla 1 que también fueron amplificadas en igual número en ambos derivados, tres de ellas del tipo DDE.

Tabla 1. Cuantificación del número de copias de genes seleccionados por hibridación de secuencias en de I24 y R10, en comparación con la base de datos de la cepa original.

		AN10	I24	R10
Genes catabólicos	<i>nahG</i>	1,02 ± 0,01	1,06 ± 0,01	1,07 ± 0,01
	<i>nahW</i>	1,1 ± 0,01	1,16 ± 0,04	1,19 ± 0,10
	<i>nahAc</i>	1,15 ± 0,02	1,37 ± 0,05	1,28 ± 0,01
	<i>nahB</i>	1,44 ± 0,02	1,38 ± 0,05	1,64 ± 0,03
ISs	<i>ISPpu12</i>	0,84 ± 0,01	53,69 ± 0,39	32,13 ± 0,27
	<i>ISPst9</i>	1,85 ± 0,14	6,92 ± 0,01	11,68 ± 0,24
	Tnp 18	0,77 ± 0,01	0,64 ± 0,08	5,59 ± 0,03
	Tnp 23	1,30 ± 0,08	3,20 ± 0,17	3,76 ± 0,36
	Tnp 20*	1,29 ± 0,04	2,85 ± 0,39	3,20 ± 0,30
	Tnp 22*	1,29 ± 0,13	2,46 ± 0,54	2,85 ± 0,26
	Tnp 5*	1,09 ± 0,01	2,15 ± 0,10	2,08 ± 0,11

* Transposasas tipo DDE

Análisis fisiológico comparativo

La alteración genómica del número de copias de ISs mostrado anteriormente podría repercutir, como se ha expuesto en la introducción, en un impacto en la expresión génica, ya sea por activación o inactivación de genes vía promotor, por redistribución en la posición de genes o bien por inactivación genes por inserciones dentro de ellos. Dado esto, se sometió primeramente a las cepas a condiciones no estresantes de cultivo (crecimiento en LB y en MMB suplementado con succinato como fuente única de carbono y energía) para determinar si la alteración en el número de ISs causaría diferencias fisiológicas en las cepas.

El resultado obtenido tras realizar un seguimiento del comportamiento de las cepas en medio LB (tabla 2, figura 5) fue que todas las cepas presentaban un comportamiento similar, con tasa de duplicaciones del orden de $0,45 \pm 0,03$ duplicaciones por hora, tiempos de latencia de $1,77 \pm 0,3$ horas y alcanzando A600 máximas de $1,11 \pm 0,2$ unidades.

Con respecto al crecimiento en MMB suplementado con succinato al 0,5% como fuente única de carbono y energía, tampoco se advirtieron diferencias relevantes en el crecimiento comparativo de AN10 y sus derivados (tabla 2, figura 5). La tasa de crecimiento fue de $0,355 \pm 0,03$ duplicaciones por hora, el tiempo de latencia de $2,05 \pm 0,14$ horas y la A600 máxima alcanzó valores de $1,061 \pm 0,09$ unidades.

Este resultado infiere que las características fisiológicas fundamentales de los derivados no han sido alteradas. Se concluye que, al menos por lo percibido hasta el momento, los genes implicados en las funciones primordiales de las bacterias se encontraban en igual condiciones que en la original de la cual derivan. Asimismo el hecho de observar que las cepas son aptas para crecer en MMB suplementado con succinato como fuente exclusiva de carbono hace suponer que tanto I24 como R10 no presentan ninguna auxotrofia provocada por la movilización de las ISs. Es decir que las cepas son capaces de crecer en medio mínimo pudiendo sintetizar por si mismas todos los requerimientos nutricionales tales como vitaminas, aminoácidos, nucleótidos, etc.

Tabla 2. Valores de tasa de crecimiento (μ , h⁻¹), tiempo de latencia (λ , h) y densidad óptima alcanzada A600 máxima (O.D. max) en el crecimiento de AN10 y sus derivados I24 y R10 bajo condiciones no estresantes.

Parámetro		AN10	I24	R10
LB	μ	$0,463 \pm 0,01$	$0,438 \pm 0,02$	$0,451 \pm 0,01$
Succinato		$0,344 \pm 0,03$	$0,356 \pm 0,02$	$0,365 \pm 0,01$
Naftaleno		$0,316 \pm 0,03$	$0,298 \pm 0,05$	$0,318 \pm 0,03$
LB	λ	$1,87 \pm 0,07$	$1,90 \pm 0,01$	$1,66 \pm 0,04$
Succinato		$2,05 \pm 0,08$	$2,07 \pm 0,04$	$2,04 \pm 0,04$
Naftaleno		$3,3 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,01$
LB	A₆₀₀ max	$1,161 \pm 0,05$	$1,004 \pm 0,06$	$1,157 \pm 0,08$
Succinato		$1,044 \pm 0,03$	$1,054 \pm 0,03$	$1,086 \pm 0,04$
Naftaleno		$0,441 \pm 0,02$	$0,435 \pm 0,02$	$0,436 \pm 0,03$

*Los valores son medias y desviación estándar de tres experimentos.

A continuación, se analizó el crecimiento de las tres cepas en MMB suplementado con naftaleno como fuente única de carbono y energía. Es sabido que AN10 es un degradador de naftaleno por excelencia y que dicho compuesto no ha mostrado ser tóxico para la misma (Lanfranconi *et al.*, 2009). Si los genes implicados en el metabolismo elemental de la bacteria no se han modificado, la fisiología de los derivados no tendría que verse afectada. El análisis genético reveló que ambas salicilato hidroxilasas, NahG y NahW, estaban presentes en igual número de copias que en la cepa original (tabla 1) por lo que se esperaba que todas ellas mostraran resultados semejantes al crecer en naftaleno. Tal como se esperaba, las tres cepas crecieron en naftaleno de forma análoga (tabla 2, figura 5), lo que sugiere que para las poblaciones analizadas (AN10, I24 y R10) el naftaleno no supone ningún estrés, siendo la fisiología en cuanto a la degradación de naftaleno la misma para todas ellas .

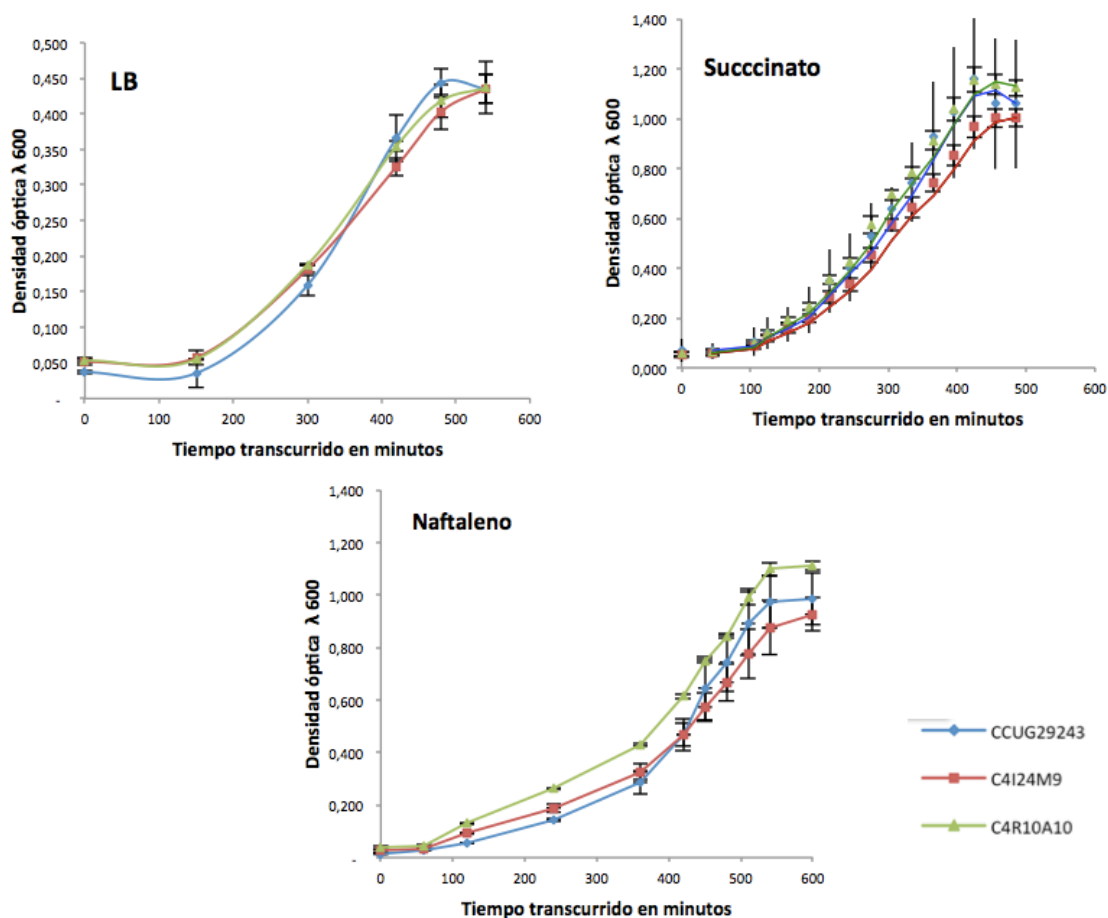


Fig. 5 Curva de crecimiento de AN10 y sus derivados I24 y R10 bajo condiciones no estresantes

A continuación, y una vez comprobado que las dos cepas derivadas presentaban el mismo comportamiento fisiológico que la cepa parental en ausencia de condiciones de estrés, se cultivaron las bacterias a concentraciones crecientes de salicilato para observar la capacidad de adaptación que presentaban las cepas con respecto a AN10. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 3.

Tabla 3 Valores de tasa de crecimiento (μ), tiempo de latencia (λ) y Densidad óptima alcanzada ($A_{600 \text{ max}}$) en el crecimiento de AN10 y sus derivado I24 y R10 bajo condiciones estresantes.

mM		AN10	I24	R10
3	μ	0,09 \pm 0,1	0,096 \pm 0,01	0,106 \pm 0,11
6		0,083 \pm 0,01	0,089 \pm 0,01	0,097 \pm 0,01
9		0,069 \pm 0,07	0,084 \pm 0,11	0,071 \pm 0,08
12		0,096 \pm 0,1	0,054 \pm 0,04	0,0553 \pm 0,02
15		0,049 \pm 0,01	0,017* \pm 0,01	0,035 \pm 0,05
3	λ	9,33 \pm 1,54	5,11 \pm 0,30	4,06 \pm 1,65
6		22,79 \pm 6,94	12,70 \pm 6,54	7,49 \pm 1,21
9		59,47 \pm 11,35	40,30 \pm 23,6	45,58 \pm 7,11
12		113,45 \pm 9,44	161,7 \pm 63,6	127,49 \pm 6,92
15		120,18 \pm 9,44	260,5 \pm 79,24	174,71 \pm 64,5
3	$A_{600 \text{ max}}$	0,304 \pm 0,05	0,356 \pm 0,03	0,42 \pm 0,01
6		0,493 \pm 0,04	0,523 \pm 0,07	0,594 \pm 0,003
9		0,7835 \pm 0,04	0,8627 \pm 0,04	0,958 \pm 0,071
12		1,021 \pm 0,09	1,14 \pm 0,018	1,128 \pm 0,175
15		1,106 \pm 0,06	0,166** \pm 0,07	1,09 \pm 0,209

*tasa calculada sin estar en fase exponencial máxima. **Valores máximos obtenidos que no alcanzaron la fase estacionaria.

Desde la perspectiva de la utilización de salicilato como fuente exclusiva de carbono y energía, se pone en manifiesto el fenómeno observado por Celia Martín-Cardona en su trabajo doctoral (2009) que propone que el salicilato, a bajas concentraciones, opera como factor limitante del crecimiento total alcanzado. Como se observa en la

tabla 3 y en la figura 6, la A600 máxima es, en todas las cepas, directamente proporcional a la concentración de salicilato utilizado.

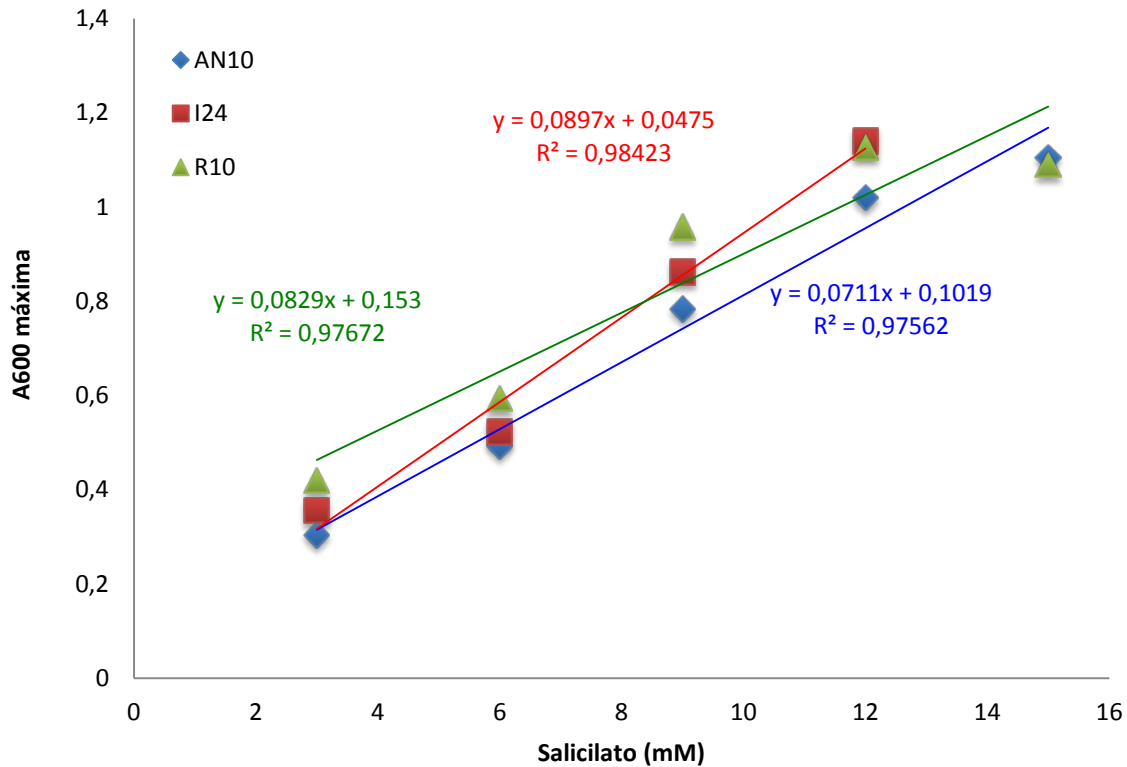


Fig. 6 A600 máxima obtenido en los cultivos de *P. stutzeri* AN10, una vez alcanzada la fase estacionaria, en función de la concentración de salicilato en el medio.

Con respecto al tiempo de duplicación (tabla 3), se observa que, por lo general, cuando empieza a detectar la fase exponencial de crecimiento la población evoluciona de forma similar, independientemente del número de secuencias de ISs.

El parámetro más diferencial de las curvas de crecimiento es el correspondiente con el tiempo de duración de la fase de latencia. Tal y como se muestra en la tabla 3 y en la figura 7 se observó, en todas las cepas, que a medida que aumenta la concentración de salicilato aumenta de manera proporcional el tiempo necesario para que el cultivo entre en fase exponencial de crecimiento. Dado que el inóculo inicial era el mismo para cada cultivo estos datos sugieren que el tiempo que requiere cada cultivo para espectrofotométricamente encontrarse en fase exponencial de crecimiento está directamente relacionado con el número de células

presentes en el inóculo inicial que tienen la capacidad innata de sobrevivir en dichas condiciones de cultivo.

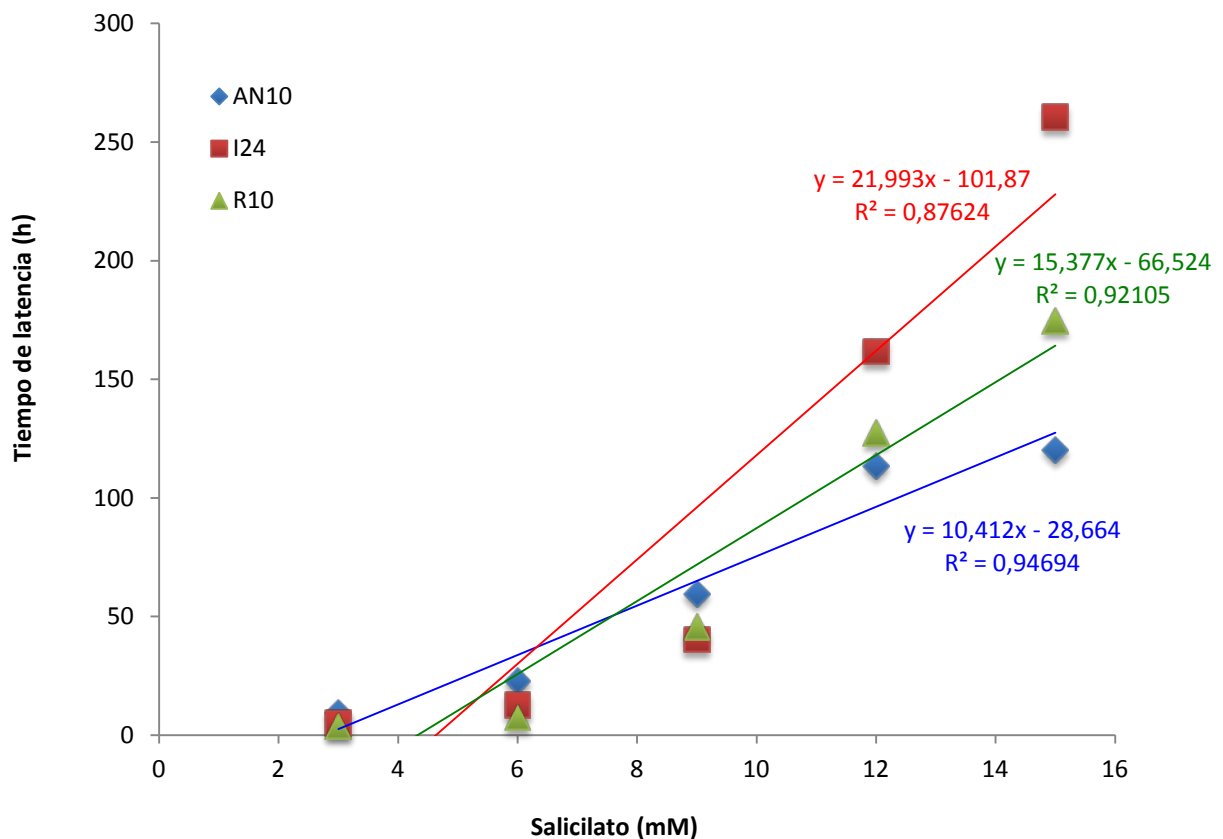


Fig. 7 Tiempo de latencia obtenido en las tres cepas a distintas concentraciones de salicilato.

Por último, se observó un comportamiento dual al exponer las cepas a condiciones crecientes salicilato como estrés químico (tabla 3, figura 7). Se observó que a concentraciones de 3, 6 y 9 mM los derivados I24 y R10 mostraban un crecimiento superior con menores tiempos de latencia y mayores A600 máximas alcanzadas. Este resultado avala la tesis que las ISs favorecen el uso de salicilato, al menos a bajas concentraciones (límite de 9 mM), como fuente única de carbono y energía. Sin embargo a concentraciones de 12 y 15 mM la cepa original AN10 mostraba un crecimiento con un tiempo de latencia menor.

Desde la perspectiva del análisis fisiológico, y dado que la acumulación de salicilato ha sido asociado a toxicidad (Lanfranconi *et al.*, 2009) y que no hemos encontrado diferencias en enzimas clave como las salicilato hidroxilasas NahG y NahW (tabla 1),

pensamos que el posible efecto tóxico que estuviesen sufriendo los derivados a concentraciones altas de salicilato (superiores a 9 mM) podría radicar en la posesión de alguna deficiencia en el bombeo/extrusión de salicilato al medio. Por este motivo se planteó entonces una búsqueda de aquellos genes implicados en el transporte de salicilato al exterior (p.e. transportadores, bombas de flujo o estabilizadores de membrana). Las proteínas implicadas en la degradación de hidrocarburos aromáticos por AN10, como pueden ser transportadores, bombas de flujo o estabilizadores de membrana no se han caracterizado del todo pero hasta el se han propuesto los siguientes candidatos (Brunet-Galmes, comunicación personal): 1) El operón que forma el sistema de transporte MexAB-OprM ;2) un gen anotado como transportador de hidrocarburos aromáticos, que se encuentra muy próximo a nahD; 3) tres genes anotados como transportadores de benzoato, que flanquean el operón catBCA y 4) un operón de resistencia al tolueno.

Se especuló que podría deberse a alguna ruptura de genes involucrados en el transporte de hidrocarburos tóxicos en la célula o enzimas vinculadas con la activación de estos mecanismos tras el salto de las ISs. Por este motivo se realizó una comparación de las proteínas presentes en AN10 con las identificadas mediante el programa *Prokka* (<http://www.vicbioinformatics.com/prokka-1.9.tar.gz>) en las cepas derivadas. El análisis, realizado con el programa CD-Hit, reveló que todas las secuencias aminoacídicas de las proteínas analizadas estaban conservadas al 100% en toda su longitud por lo que se descartó la interrupción de sus CDSs por ISs (tabla4).

Adicionalmente se planteó la hipótesis que estas secuencias de inserción podrían haber interrumpido la actividad de algún promotor de estos genes habiéndose justo cadena arriba de algún gen implicado en la degradación.

Para clarificar este aspecto, se buscó entonces la ubicación de estas secuencias codificantes para transportadores en los derivados de AN10 y se analizó la sintenia de los genes colindantes, para intentar detectar procesos de integración de ISs. Sin embargo, en todos los casos analizados, la sintenia de los derivados fue idéntica a la presente en la cepa AN10 (Figura 8), descartándose la inactivación de posibles regiones promotoras por ISs.

Tabla 4. Genes implicados en el transporte de hidrocarburos aromáticos al medio externo.

ID	pb	Producto	ID % I24	ID % R10	I (aa) I24	I (aa) R10
<i>AFM31578.1</i>	379	Multidrug/solvent RND membrane fusion protein	100%	100%	379	379
<i>AFM31579.1</i>	1044	Multidrug/solvent RND transporter TtgB	100%	100%	1044	1044
<i>AFM31580.1</i>	473	Outer membrane protein OprM	100%	100%	473	473
<i>AFM32583.1</i>	401	Aromatic hydrocarbon degradation membrane protein	100%	100%	399	399
<i>AFM33079.1</i>	447	Benzoate MFS transporter BenK	100%	100%	447	447
<i>AFM33083.1</i>	325	Benzoate transport protein	100%	100%	411	411
<i>AFM33084.1</i>	419	Benzoate-specific porin	100%	100%	419	419
<i>AFM34534.1</i>	79	Toluene-tolerance protein	100%	100%	79	79
<i>AFM34535.1</i>	163	Hypothetical protein	100%	100%	163	163
<i>AFM34536.1</i>	104	Toluene-tolerance protein	100%	100%	104	104
<i>AFM34537.1</i>	215	Toluene-tolerance protein	100%	100%	215	215
<i>AFM34538.1</i>	152	Hypothetical protein	100%	100%	152	152
<i>AFM34539.1</i>	265	Toluene tolerance ABC efflux transporter, permease	100%	100%	265	265
<i>AFM34540.1</i>	271	Toluene tolerance ABC efflux transporter, ATP-binding protein	100%	100%	271	271

*I (longitud de la proteína en aminoácidos), ID % (porcentaje de identidad respecto a AN10).

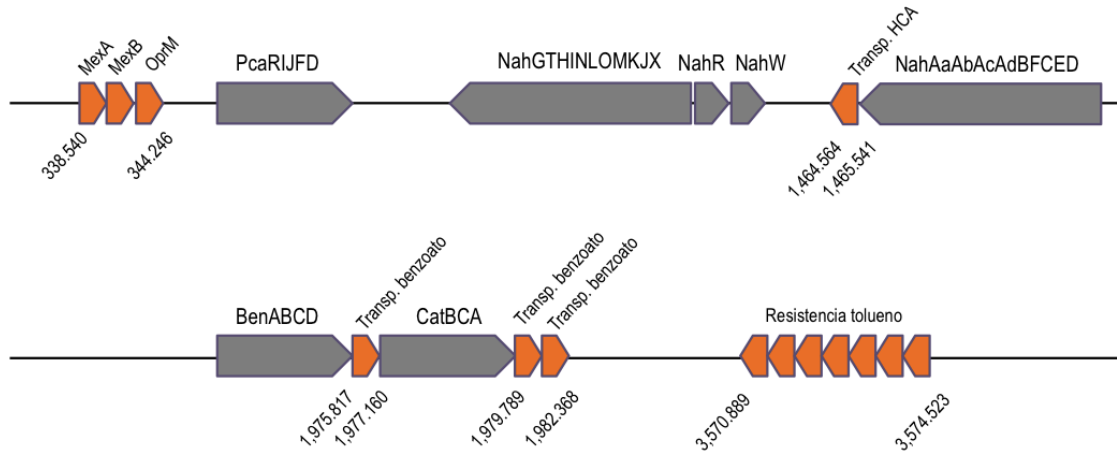


Fig. 8 Esquema de los transportadores de membrana de *P. stutzeri* AN10

Capítulo 5. Conclusiones

- i. Desde el punto de vista genómico, los derivados de *P. stutzeri* AN10, cepas I24 y R10, son prácticamente idénticas a la cepa parental. Así, mantienen intactos, con sintenia perfecta y en idéntico número de copias, todos los genes esenciales y los genes involucrados en el metabolismo de hidrocarburos aromáticos, transportadores incluidos. Las únicas diferencias encontradas han sido las amplificaciones clonales de diversas secuencias de inserción: IS*Ppu12* ha sido amplificada 54 veces en I24 y 32 veces en R10; IS*Pst9* ha sido amplificada 7 veces en I24 y 11 veces R10; y Tnp18 fue amplificado 6 veces tan solo en la cepa R10.
- ii. En las condiciones no estresantes de crecimiento analizadas (LB y MMB con succinato o naftaleno como fuente única de carbono y energía), las cepas I24 y R10 tienen un comportamiento fisiológico idéntico a su cepa parental, *P. stutzeri* AN10. En este sentido, la amplificación clonal de las ISs no ha generado la aparición de auxotrofías por inactivación génica ni alteraciones genéticas que redunden en una mayor o menor eficacia biológica en estas condiciones no estresantes de crecimiento.
- iii. El análisis de la cinética de crecimiento a expensas de bajas concentraciones de salicilato (hasta 9 mM) como fuente única de carbono y energía ha demostrado que los derivados I24 y R10 han presentado una mayor eficacia biológica, atendiendo a los parámetros de crecimiento evaluados. A pesar de ello, la eficacia biológica de la cepa AN10 a sido superior, a concentraciones de salicilato mayores de 9 mM, que la presentada por las cepas derivadas. A pesar de que la única diferencia encontrada entre la cepa parental y las derivadas es la amplificación clonal de ISs, este comportamiento dual no permite clarificar hasta que punto la amplificación clonar de las ISs facilita la adaptación de *P. stutzeri* a condiciones de stress.

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutor Rafael Bosch por su guía durante el transcurso del trabajo así como su paciencia y dedicación en la lectura crítica del manuscrito. Por segundo, a Isabel Brunet-Galmés y María Más-Lladó por su asesoramiento técnico en el trabajo experimental. Por último, a Balbina Nogalez por sus conversaciones constructivas y sugerencias en el desarrollo del proyecto.

Bibliografía

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410

Aragno M, Schlegel H. (1981) The hydrogen-oxidizing bacteria. The prokaryotes Springer Berlin Heidelberg 865-893.

Bolognese F, di Lecce C, Galli E, Barbieri P. (1999) Activation and inactivation of *Pseudomonas stutzeri* methylbenzene catabolism pathways mediated by a transposable element. *Appl Environmental Microbiology* **65**:1876-1882.

Bosch R, Garcia-Valdes E, Moore E. (1999a) Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* **236**:149-157

Bosch R, García-Valdés E, Moore E. (2000) Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* **245**:65-74

Bosch R, Moore E, García Valdés E, Pieper D. (1999b) NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J Bacteriol* **181**: 2315-2322

Brunet-Galmés I, Busquets A, Peña A, Gomila M, Nogales B, García-Valdés E, Lalucat J, Bennasar A, Bosch R. (2012) Complete genome sequence of the naphthalene-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* AN10 (CCUG 29243). *J Bacteriol* **194**:6642-6643

Burri R, Stutzer A. (1895) Ueber Nitrat zerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust Zentbl Bakteriol Parasitenkd Abt II **1**:257-265, 350-364, 392-398, 422-432

Christie-Oleza J, Nogales B, Lalucat J, Bosch R. (2010) TnpR encoded by an *ISPpu12* isoform regulates transposition of two different ISL3-like insertion sequences in *Pseudomonas stutzeri* after conjugative interaction. *J Bacteriol* **192**:1423-1432

Christie-Oleza J, Nogales B, Martín-Cardona C, Lanfranconi M, Albertí S, Lalucat J, Bosch R. (2008) *ISPst9*, an ISL3-like insertion sequence from *Pseudomonas stutzeri* AN10 involved in catabolic gene inactivation. *Int Microbiol* **11**:101-110

- Christie-Oleza J, Lanfranconi M, Nogales B, Lalucat J, Bosch R.** (2009) Conjugative interaction induces transposition of *ISPst9* in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J Bacteriol* **191**:1239-1247
- Connors M, Barnsley E.** (1982) Naphthalene plasmids in pseudomonads. *J Bacteriol* **149**:1096-1101
- Fuenmayor S, Wild M, Boyes A, Williams P.** (1998) A gene encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp strain U2. *J Bacteriol* **180**:2522-30
- García-Valdés E, Cozar E, Rotger R, Lalucat J, Ursing J.** (1988) New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* **54**:2478-2485
- Glansdorff N, Charlier D, Zafarullah M.** (1981) Activation of gene expression by IS2 and IS3. *Cold spring Harb Symp Quant Biol* **45**:153-156
- Ilves H, Horak R, Kivisaar M.** (2001) Involvement of σ^2 in starvation induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652. *J Bacteriol* **183**:5445-5448
- Joshi NA, Fass JN** (2011) Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 129) [Software] Disponible en: <https://github.com/najoshi/sickle>
- Kulakov L, Allen C, Lipscomb D, Larkin M.** (2000) Cloning and characterization of a novel cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene (*narB*) from *Rhodococcus* sp NCIMB12038. *FEMS Microbiol Lett* **182**:327-31
- Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni N.** (2006) Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:510-547
- Lanfranconi M, Christie-Oleza J, Martín-Cardona C, Suárez-Suárez L, Lalucat J, Nogales B, Bosch R.** (2009) Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *FEMS Microbiol Lett* **300**:265-72
- Lehman K, Neumann R.** (1896-1927) Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1st (1896), 2nd (1899), 3rd (1904), 5th (1912), 6th (1920), and 7th (1927) ed J F Lehman, München, Germany
- Mahillon J, Chandler M.** (1998) Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:725-74
- Martín-Cardona Celia** (2009) Versatilidad genético-fisiológica en poblaciones de *Pseudomonas stutzeri* AN10 sometidas a estrés químico por salicilato. Tesis doctoral Departamento de Microbiología Universidad de las Islas Baleares, España
- Nagy Z, Chandler M.** (2004) Regulation of transposition in bacteria *Res Microbiol* **155**:387-398

Palleroni N, Doudoroff M, Stanier R, Solanes R, Mandel M. (1970) Taxonomy of the aerobic pseudomonads: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. J Gen Microbiol **60**:215-231

Rosselló-Mora R, Lalucat J, Dot W, Kämpfer P. (1994a) Biochemical and chemotaxonomic characterization of *Pseudomonas stutzeri* genomovars. J Appl Bacteriol **76**: 226-233

Rosselló-Mora R, Lalucat J, García-Valdés E. (1994b) Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. Appl Environ Microbiol **60**: 966-972

Siguié P, Gourbeyre E, Chandler M. (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. FEMS Microbiol Rev

Top EM, Springael D. (2003) The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. Curr Opin Biotechnol **14**(3):262-9

Van Niel C, Allen M. (1952) A note on *Pseudomonas stutzeri*. J Bacteriol **64**:413-422

You I, Gunsalus I. (1986) Regulation of the *nah* and *sal* operons of plasmid NAH7: evidence for a new function in *nahR*. Biochem Biophys Res Commun **141**(3):986-92

Zwietering M, Jongenburger I, Rombouts F, Van't Riet K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve Applied and environmental microbiology. **56**(6): 1875-1881