



Universitat de les
Illes Balears

ESTUDIO MOLECULAR DE POBLACIONES DE
PSEUDOMONAS AMBIENTALES

TESIS DOCTORAL

DAVID SÁNCHEZ BERMÚDEZ

DIRECTORA:

ELENA GARCÍA-VALDÉS PUKKITS

Departamento de Biología

Universitat de les Illes Balears

Palma de Mallorca, Septiembre 2013

ESTUDIO MOLECULAR DE POBLACIONES DE

PSEUDOMONAS AMBIENTALES

Tesis Doctoral presentada por David Sánchez Bermúdez para optar al título de Doctor en el programa Microbiología Ambiental y Biotecnología, de la Universitat de les Illes Balears, bajo la dirección de la Dra. Elena García-Valdés Pukkits.

Vº Bº Director de la Tesis

El doctorando

DRA. ELENA GARCÍA-VALDÉS PUKKITS

DAVID SÁNCHEZ BERMÚDEZ

Catedrática de Universidad
Universitat de les Illes Balears

PALMA DE MALLORCA, SEPTIEMBRE 2013

Index

Agradecimientos	IX
Resumen	1
Abstract	3
Introduction	5
I.1. The genus <i>Pseudomonas</i>	7
I.1.1. Definition	7
I.1.2. <i>Pseudomonas</i> genus history	7
I.1.3. Phenotypic characteristics of <i>Pseudomonas</i>	9
I.1.4. Genotypic characteristics of <i>Pseudomonas</i>	9
I.1.5. Ecology	11
I.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
I.3. Taxonomy of the genus <i>Pseudomonas</i>	16
I.4 The <i>rpoD</i> gene	21
I.4.1. Design and specificity test of the primer set PsEG30F/PsEG790R	21
I.4.2. Detection of <i>Pseudomonas</i> in environmental DNA	23
I.4.3. Analysis, comparison and selection of genes for phylogenetic studies of the genus <i>Pseudomonas</i>	24
I.5. Next-Generation Sequencing Technology (NGST)	26
I.5.1. Illumina HiSeq 2000 technology	26
I.5.2. Roche 454/GS FLX Sequencing technology	26
Objectives	30
Chapter 1: Population structure of environmental and clinical <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> isolates from the same geographical area	34
Abstract	36
1.1. Introduction	38
1.2. Material and Methods	39
1.2.1. <i>P. aeruginosa</i> isolates	39
1.2.2. Antibiotic resistance	39
1.2.3. DNA extraction, PCR amplification and DNA sequencing conditions	40
1.2.4. MultiLocus Sequence Typing	40
1.2.5. Phylogenetic reconstruction	40
1.2.6. Population structure	41
1.2.7. Genetic Diversity index	41
1.2.8. Clonality and recombination tests	41
1.3. Results	42
1.3.1. <i>P. aeruginosa</i> isolates	42
1.3.2. Antibiotic resistance pattern	42
1.3.3. MultiLocus Sequence typing	42
1.3.4. MLST genes phylogeny	47
1.3.5. Population structure	47

1.3.6. Genetic diversity index	51
1.3.7. Clonality and recombination tests	51
1.4. Discussion	51
1.5. Supplementary data	54

Chapter 2: Genome analysis of environmental and clinical *P. aeruginosa* isolates from Sequence Type ST-1146 58

Abstract	60
2.1. Introduction	62
2.2. Materials and Methods	64
2.2.1. <i>P. aeruginosa</i> isolates	64
2.2.2. <i>De novo</i> assembled genome analysis	64
2.2.3. Average Nucleotide Index (ANIb) and conserved DNA	64
2.2.4. Core and Pan-genome analysis	64
2.2.5. Gene prediction and clustering analysis	65
2.2.6. Genome mutational profiles	65
2.2.7. Polymorphic sites and nucleotide substitutions	65
2.2.8. Phylogenetic reconstructions	65
2.3. Results	66
2.3.1. Whole genome characteristics of isolates in ST-1146	66
2.3.2. Average Nucleotide Index (ANIb) and conserved DNA	66
2.3.3. Core and Pan-genome analysis	66
2.3.4. Gene comparisons with CD-HIT	70
2.3.5. Genome mutational profiles and allele comparisons	72
2.3.6. Nucleotide polymorphisms	76
2.3.7. Pathogenic factors	77
2.3.8. Phage related genes	81
2.4. Discussion	83
2.5. Supplementary data	89

Chapter 3: Assessment of the species diversity of *Pseudomonas* by culture-dependent and -independent methods in a water sample from the river Woluwe 101

Abstract	103
3.1. Introduction	105
3.2. Material and methods	106
3.2.1. Water Sampling	106
3.2.2. Total cell count by DAPI	107
3.2.3. Culture, isolation and identification of <i>Pseudomonas spp.</i>	107
3.2.4. Total DNA extraction and PCR conditions	107
3.2.5. Clone library	108
3.2.6. Sequence analysis of amplified genes	108
3.2.7. <i>rpoD</i> 454 Pyrosequencing	108
3.2.8. Post-run analysis of pyosequences	109
3.2.9. Statistical analysis	109
3.3. Results	110
3.3.1. Total cell number count	110
3.3.2. Culture-dependent analysis	110
3.3.3. Clone library analysis	111
3.3.4. Pyrosequencing of the environmental <i>rpoD</i> amplicon	112

3.3.5. Diversity indices	114
3.4. Discussion	115
3.5. Supplementary data	117
Chapter 4: Isolation and characterization of <i>Pseudomonas</i> from soil and intertidal seashore habitats. Description of new <i>Pseudomonas</i> species	120
Abstract	122
4.1. Introduction	124
4.2. Materials and Methods	125
4.2.1. Isolates	125
4.2.2. DNA extraction, PCR amplification and DNA sequencing conditions	126
4.2.3. Individual and concatenated trees	127
4.2.4. DNA-DNA hybridisation	127
4.2.5. Fatty acids analysis	127
4.2.6. Phenotypic tests	127
4.2.7. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry	128
4.3. Results and Discussion	128
4.3.1. Phylogenetic characterization of isolates from soil	128
4.3.2. Phylogenetic affiliation of the isolates	131
4.3.3. Taxonomic characterization of soil strain S12	134
4.3.4. Taxonomic characterization of soil strain S25	136
4.3.5. Taxonomic characterization of soil strains S11 and S58 ^T	138
4.3.6. Taxonomic characterization of seashore strains VGXO14 ^T and Vi1	143
4.4. Concluding remarks	149
4.4.1. Putative novel <i>Pseudomonas</i> species	149
4.4.2. Description of <i>Pseudomonas terricola</i> sp. nov.	149
4.4.3. Description of <i>Pseudomonas aestusnigri</i> sp. nov.	150
4.5. Supplementary data	151
Conclusions	156
References	160

Agradecimientos

Me siento aquí frente a una hoja en blanco a escribir la parte más fácil, pues tengo muy claro lo que quiero decir, y a la vez la más difícil de mi Tesis, pues no quiero dejarme a nadie en el tintero y deseo que mis agradecimientos sean justos y como se merecen. Y es que tengo tanto que agradecer... Hace ya cuatro años que empecé la Tesis, siete desde que pisé este laboratorio por primera vez, y por aquel entonces no pensé que llegaría este momento o lo veía tan lejano... Y aquí estoy, miles de experiencias después, buenas y malas, pero todas ellas trayéndome hasta este momento de final de Tesis. Momento que por una parte estaba deseando que llegase, para concluir una etapa, pero que por otra me da pena que se acabe, porque en su mayor parte lo he pasado muy bien y ha sido muy buena experiencia, no solo a nivel profesional si no también a nivel personal. Dicho esto, empecemos los agradecimientos, que la lista es larga.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora de Tesis, Elena García-Valdés, así como a Jorge Lalucat, ambos “jefes” a los que he de agradecer la oportunidad que me dieron en su momento abriéndome las puertas a este laboratorio, desde el momento que entré como alumno colaborador de mano de Jorge hasta el momento que Elena aceptó ser mi directora de Tesis. Gracias Elena por tu tiempo, pero sobre todo por haberte preocupado por mí más allá de lo profesional, lo cual ha sido muy importante para mí. Gracias Jorge por haber tenido siempre un momento para resolver mis dudas y tener siempre unas ganas contagiosas de ir más allá en el saber, así como una visión tan amplia de tantos temas. Gracias a ambos por el esfuerzo y trabajo puesto en esta Tesis y más en el sprint final.

Gracias también a los otros “jefes” del laboratorio, Rafa y Balbina, por haber tenido siempre vuestra puerta abierta para resolver cualquier duda y ayudarme en lo que os necesitase. Por supuesto, merece mención aparte otro “jefe”, Toni, por su ayuda en todos los temas “bioinformáticos”, gracias por haberme ayudado siempre de buen grado en todo y por tus discusiones científicas.

Also thanks to PhD. Sandra Matthijs and Mrs. Catherine Tricot from the Institut de Recherches Microbiologiques Jean-Marie Wiame (Bruselas) for agreeing to take me to their lab and enable my stay in Brussels during my Thesis. My stay in Brussels was a great experience not only professionally but also personally. I am convinced that the experience, being away from home, made me grow as a person. Thanks for making my stay easier and give me the opportunity to meet other beautiful country.

Me gustaría continuar mis agradecimientos a todas aquellas personas que durante estos años me han estado “aguantado” día tras días en el labo. En primer lugar a Marga, muchas gracias por haberme acogido y llevado de la mano desde mi época de alumno colaborador hasta el día de hoy haciéndome sentir parte de una gran familia; gracias por escucharme, preocuparte por mí, darme ánimos, ayudarme siempre con la mejor predisposición y paciencia y descubrirme “el mundo de la investigación”, contagiándome tus ganas y pasión por este trabajo, si no fuera por ti, no estaría aquí hoy. En segundo lugar a Magda, gracias por enseñarme tantas cosas durante todos estos años, por estar siempre dispuesta a escucharme, por ser mi guía con mucha paciencia y comprensión, por tus buenos consejos y ser otro hombro en el que llorar. Sé que debería extenderme más con vuestros agradecimientos, lo sé, pero también sé que no hay suficiente espacio en estas páginas para daros las suficientes gracias a ambas. Puedo decir sin lugar a dudas que sin vosotras no habría llegado hasta aquí y esta Tesis no habría sido posible, no sólo por lo que me habéis aportado profesionalmente sino también personalmente, muchísimas gracias.

Por otra parte, me gustaría agradecer sin que se enfaden por el orden, a Juana, por ser mi compi de experiencias, juntos hemos vivido el mismo camino prácticamente a la par, apoyándonos, ayudándonos, convirtiéndonos en confidentes, y lo más importante, en buenos amigos más allá de estas cuatro paredes. A Cris, mi compi de poyata, gracias por ser un hombro en el que llorar siempre que lo he necesitado, por escucharme y “adoptarme”, por ayudarme siempre, por tu paciencia, por todas esas conversaciones sobre cualquier cosa menos trabajo y todos esos momentos de risas haciendo mi día a día mucho más fácil, siempre te llevaré en mi “corazón”. A Claudia P., por enriquecerme personalmente enseñándome cosas de Colombia, por todos los momentos de risas y debates, en definitiva, por ser muy buena gente.

Me gustaría mencionar también a Arantxa, gracias, porque dos personas tan ingeniosas son mejor que una sola y así sus locuras se comprenden mutuamente y mejor, que suerte tienen en este laboratorio de habernos tenido a la vez. Gracias por todos los momentos de risas y desconexión. A Toni B. por ayudarme siempre que he necesitado que me echaras un cable, aunque me invadas mi sitio en cuanto me despisto, gracias por aportar otro cromosoma Y en este laboratorio, que si no, se me revelan todas en mi contra. He de agradecer también al “sector argentino” que aunque ya no están han sido importantes para mí: Mariana y Claudia S. Gracias a ambas también por enriquecerme enseñándome cosas de Argentina, y también por hacerme reír, se os echa de menos. A las nuevas incorporaciones, bueno ya no tan nuevas, que luego se me enfadan, pero tienen razón, pasa el tiempo y no llegaron ayer. A Bel, María y Cati, tres nuevas becarias de armas tomar con las que he podido reírme mucho, gracias por estar siempre dispuestas a aguantarme. Mucha suerte a las tres en vuestras respectivas tesis.

Puedo decir, a modo general a todos mis compañeros de trabajo, que en realidad he hecho grandes amigos, a los cuales agradezco el haber estado ahí, escuchándome, riéndonos con mis tonterías y comentarios, mostrando mucha paciencia cuando me he metido con ellos. Espero haberos hecho reír y que lo hayáis pasado tan bien conmigo como yo con vosotros, sois un equipo increíble y me siento muy afortunado de haber podido trabajar con todos vosotros, un equipo por el que a uno se le hace menos cuesta arriba ir a trabajar cada día, muchas gracias a todos, porque sin vosotros no lo habría conseguido.

Además, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han recorrido en algún momento mi paso por el labo; doctores: Joseph, Lady; practicums: Ana P., Andrés, Ana Cristina; post-docs: Mohamed, Farid. Todos ellos me han aportado algo en su momento, y se lo agradezco.

Y ya para terminar con la gente de mi día a día en el trabajo, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han colaborado de algún modo en esta Tesis. Los oficiales de laboratorio: Ángel, Xisco y Guillem, parte fundamental del funcionamiento de este laboratorio. De los “Serveis Cientificotécnicos”, a Trinidad y a Rosa, gracias a las dos por vuestra paciencia y buena disposición para ayudar a organizarme y pasar las muestras, facilitando mi trabajo y haciendo que llegase a terminarlo cuando era necesario. Gracias también a Toni Ramírez por su ayuda y buena disposición cuando le he necesitado como enlace con Son Dureta, y ahora Son Espases.

Por supuesto, merecen mención aparte todos mis amigos que han estado ahí, apoyándome, interesándose por mi tesis, escuchándome aunque no se enterasen de nada y estuviera siendo un pesado con mis quejas, lamentos, ideas. Gracias por levantarme el ánimo cuando lo he necesitado. A mis amigas de toda la vida del “cole”: Cris, Gloria, Fanny que después de tanto tiempo, y aunque nos veamos poco, aún siguen ahí, y es que hay un vínculo muy fuerte entre nosotros a pesar de los diferentes caminos que hemos tomado. A mis amigas del “insti”: Pol y Miriam, da igual el tiempo que pase o donde estemos, nuestra amistad también se mantiene en pie a lo largo del tiempo, gracias. En especial me gustaría agradecer a mis amigos de la “uni”, que me han “sufrido” más, que me han apoyado y acompañado en esta aventura, estando a mi lado, impidiendo que me cayera en momentos difíciles, gracias a: Inma, Raquel, Jaime, Antonia, Cris, Aina y Sebas. Gracias chicos, sois todos los mejores, quién nos iba a decir cuando empezamos la carrera que llegaríamos hasta aquí, y cuanto me alegro de que sea así.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia, a los que verdaderamente les debo el haber llegado hasta aquí. Ellos, que han estado cada día, aguantando mis cambios de humor, celebrando mis logros, perdonando mis ausencias, apoyándome, los que lo han dado todo y más para que pudiera conseguir mis objetivos. A los que les cuesta y no les importa no entender este estilo de vida, horarios, y en qué consiste mi trabajo, porque para ellos, todo eso da igual, lo primero ha sido siempre estar ahí para mí. Gracias a mis padres, mi hermano, mis abuelos, mi madrina, mi tata y mi primo favorito, gracias.

¡Muchas gracias a todos!

La elaboración de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca predoctoral para la formación de personal investigador de la Conselleria d'Interior, Direcció General de Recerca, Desenvolupament Tecnològic i Innovació del Govern de les Illes Balears (FPI09) y del Fondo Social Europeo (ESF).

