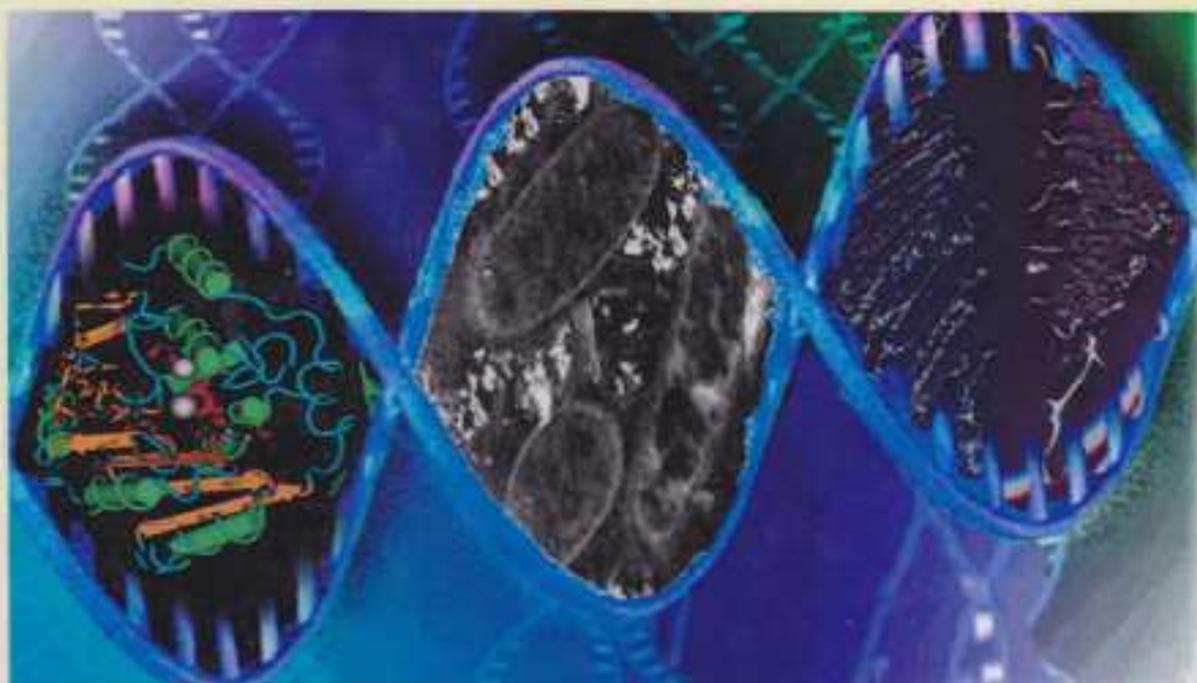
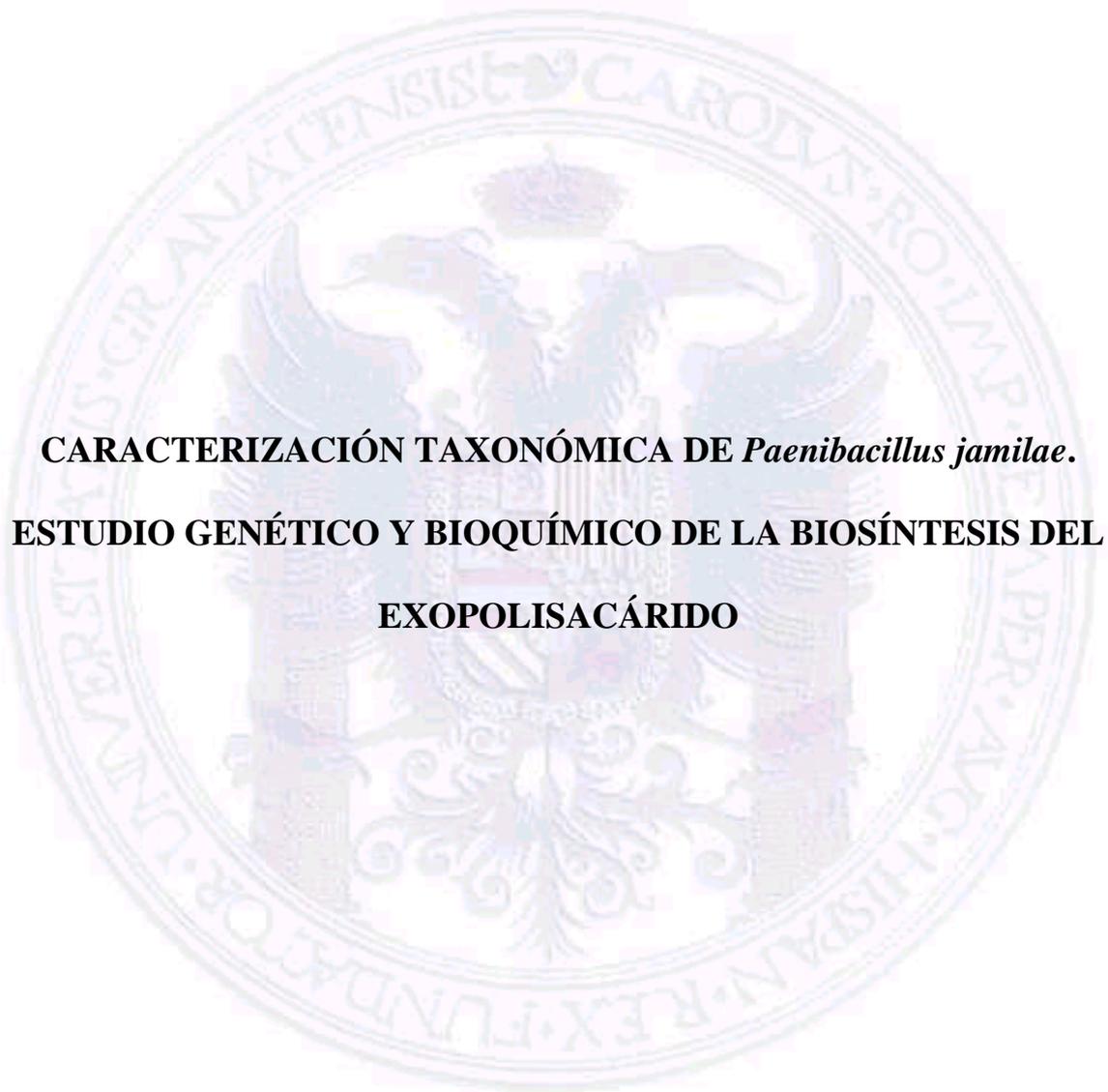


CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE
Paenibacillus jamilae.
ESTUDIO GENÉTICO Y BIOQUÍMICO DE LA
BIOSÍNTESIS DEL EXOPOLISACÁRIDO



MARGARITA AGUILERA GÓMEZ
TESIS DOCTORAL
GRANADA, 2002

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE *Paenibacillus jamilae*.
ESTUDIO GENÉTICO Y BIOQUÍMICO DE LA BIOSÍNTESIS DEL
EXOPOLISACÁRIDO

MARGARITA AGUILERA GÓMEZ

TESIS DOCTORAL
2002

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Margarita Aguilera Gómez
D.L.: GR 364-2013
ISBN: 978-84-9028-335-6

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

**CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE *Paenibacillus jamilae*.
ESTUDIO GENÉTICO Y BIOQUÍMICO DE LA BIOSÍNTESIS DEL
EXOPOLISACÁRIDO**

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia
Dña. Margarita Aguilera Gómez para aspirar al Grado de Doctora

Granada 2002

Fdo: Dña. Margarita Aguilera Gómez

Vº Bº DE LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

Dr.D. Alberto Ramos Cormenzana
Catedrático del Dpto. de Microbiología
de la Facultad de Farmacia de Granada.

Dra. Dña. Mercedes Monteoliva Sánchez
Profesor Titular del Dpto. de
Microbiología de la Facultad de
Farmacia de Granada

Dr. D. Antonio Suárez García
Profesor Titular del
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
de la Facultad de Farmacia de Granada

ÍNDICE

ÍNDICE

PARTE I: ANTECEDENTES E HIPÓTESIS	1
Capítulo 1. Introducción a la tesis.	2
1. 1. – Proyecto de tesis doctoral.....	3
1. 2. – Tesis doctoral. Presentación y diseño.....	5
Capítulo 2. Biorremediación de alpechín y alpeorujó, residuos contaminantes del proceso de obtención del aceite de oliva.....	7
2.1. - Alpechín y alpeorujó.....	9
2.2. - El problema del alpechín y alpeorujó.....	11
2.3. - Depuración y aprovechamiento del alpechín.....	12
2.4. - Nuevas perspectivas de biodegradación.....	18
PARTE II: OBJETIVOS	21
Capítulo 3. Justificación y planteamiento de objetivos.....	25
PARTE III: REALIZACIÓN DE OBJETIVOS	29
PARTE III.1. <u>ESTUDIO TAXONÓMICO DE CEPAS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.</u>	
Capítulo 4. Descripción taxonómica de <i>Paenibacillus jamilae</i>.....	33
4. 1. – Resumen.....	34
4. 2. – Introducción.....	35
4.2.1. – Taxonomía microbiana. Generalidades.....	35
4.2.1.1. Taxonomía numérica.....	37
4.2.1.2. Taxonomía molecular.....	38
4.2.1.3. Taxonomía del género <i>Bacillus</i>	43
4. 3. – Objetivos.....	46

ÍNDICE

4. 4. – Material y métodos.....	49
4.4.1.- Cultivos bacterianos y técnicas microbiológicas.....	49
4.4.2.- Medios de cultivo.....	50
4.4.3. – Pruebas de identificación fenotípica.....	51
4.4.3.1.– Pruebas morfológicas.....	51
4.4.3.2. – Pruebas fisiológicas.....	52
4.4.3.3. – Pruebas bioquímicas.....	53
4.4.4. – Taxonomía numérica.....	54
4.4.5. – Descripción taxonómica molecular.....	55
4.4.5.1. - Extracción de DNA.....	56
4.4.5.2. – Determinación de G+C.....	58
4.4.5.3. – Secuenciación y análisis del gen del RNAr 16S.....	59
4.4.5.4. – Hibridación DNA-DNA.....	62
4. 5. – Resultados.....	69
4.5.1.- Resultados de las pruebas fenotípicas.....	69
4.5.1.1.- Clasificación fenotípica básica.....	69
4.5.1.2.- Ensayos de solubilidad.....	70
4.5.1.3.- Morfología bacteriana.....	71
4.5.1.4.- Pruebas fenotípicas generales.....	72
4.5.1.5.- Dendrograma de Taxonomía numérica.....	75
4.5.2.- Resultados de las pruebas genotípicas.....	76
4.5.2.1.- Composición de Bases G+C.....	76
4.5.2.2.- Determinación del gen que codifica para el RNA ribosómico 16S.....	76
4.5.2.3.- Hibridación DNA-DNA.....	82
4. 6. – Discusión.....	84
4. 7. – Conclusiones.....	91

PARTE III.2: ESTUDIO MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS DE EPS EN ***Paenibacillus jamilae*.**

Capítulo 5. Estudio genético de la biosíntesis de EPS de <i>Paenibacillus jamilae</i>.....	94
5. 1. – Resumen.....	96
5. 2. – Introducción.....	97
5.2.1. - Exopolisacáridos microbianos (EPS).....	97
5.2.2. – Estructura de los exopolisacáridos.....	99

ÍNDICE

5.2.3. – Biosíntesis de exopolisacáridos.....	99
5.2.4. – Genes de biosíntesis de exopolisacáridos.....	102
5. 3. – Objetivos.....	104
5. 4. - Material y métodos.....	106
5.4.1.- Localización e identificación genética del operon de biosíntesis del EPS.....	106
5.4.2.- Análisis y caracterización de la secuencia nucleotídica del operón.....	107
5. 5. – Resultados.....	114
5.5.1.- Localización e Identificación Genética del Operón de Biosíntesis del Exopolisacárido.....	114
5.5.1.1.- Búsqueda en Base de datos de los operones EPS Bibliografía.....	114
5.5.1.2.- Alineamiento inicial de los genes implicados en la síntesis de EPSs y Diseño de oligonucleótidos degenerados universales.....	120
5.5.1.3.- Amplificación con las parejas de oligonucleótidos degenerados diseñados.....	122
5.5.1.4.- Clonación, secuenciación de los amplicones obtenidos y comparación de las secuencias con las bases de datos.....	123
5.5.1.5.- Secuenciación completa de los genes de EPS.....	125
5.5.2.-Análisis de la Secuencia Nucleotídica del Operón de Síntesis del EPS.....	127
5.5.2.1.- Análisis bioinformático del operón.....	128
5. 6. – Discusión.....	149
5. 7. – Conclusiones.....	157
Capítulo 6. Análisis funcional del operón de biosíntesis de EPS de <i>Paenibacillus jamilae</i>.....	159
6. 1. – Resumen.....	161
6. 2. – Introducción.....	162
6.2.1. - Función natural de los EPS.....	164
6.2.2. – Relación estructura química-función.....	164
6.2.3. – Aplicaciones de los EPS.....	168
6.2.4.- Relación organización genética-función.....	169
6. 3. – Objetivos.....	172
6. 4. – Material y métodos.....	173
6.4.1. Calculo de valores teóricos de PM, pI e hidrofobicidad de las proteínas.....	173
6.4.2. Análisis filogenético de las proteínas.....	174
6.4.3. Disrupción de genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido.....	179
6.4.4. Análisis funcional de las proteínas.....	181
6. 5. – Resultados.....	183

ÍNDICE

6.5.1. - Valores de PM, pI e hidrofobicidad de las glicosiltransferasas.....	183
6.5.2. - Filogenia de las proteínas glicosiltransferasas.....	185
6.5.3. - Disrupción de genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido.....	188
6.5.4. - Análisis funcional de las proteínas codificadas por cada ORF, mediante clonación en vectores fusionados con el gen <i>lacZ</i>	189
6. 6. – Discusión.....	195
6. 7. – Conclusiones.....	199

Capítulo 7. Análisis transcripcional del operón de biosíntesis de EPS de *Paenibacillus jamilae*.....201

7. 1. – Resumen.....	204
7. 2. – Introducción.....	205
7. 3. – Objetivos.....	206
7. 4. – Material y métodos.....	207
7. 5. – Resultados.....	212
7.5.1.- Localización de las zonas promotoras dentro del operón.....	213
7.5.2.- Zonas reguladoras. Comparación de las secuencias adyacentes al promotor en 3' con las secuencias de otros promotores internos de genes de biosíntesis de EPS.....	214
7.5.3.- Determinación de los sitios de inicio del promotor.....	217
7.6. – Discusión.....	218
7.7. – Conclusiones.....	221

PARTE IV: DISCUSIÓN FINAL.....223

Capítulo 8. Discusión final

PARTE V: CONCLUSIONES.....225

Capítulo 9. Conclusiones finales

PARTE VI: BIBLIOGRAFÍA.....229

Capítulo 10. Bibliografía

RESUMEN

El presente estudio se ha realizado con el objetivo de caracterizar bacterias con capacidad de subsistir y desarrollarse en los residuos tóxicos procedentes de la industria del aceite de oliva, como son el alpechín y alpeorujo. La obtención de aceite de oliva es un proceso de gran interés económico en nuestro país y como alternativa biorremediadora a los residuos originados en dicho proceso, se seleccionaron cepas bacterianas con capacidad de producir recursos de interés biotecnológico como son los biopolímeros de tipo polisacárido.

La caracterización taxonómica polifásica de estas bacterias nos ha llevado a la descripción de una nueva especie dentro del género *Paenibacillus* denominada *Paenibacillus jamilae* (“jamilá” nombre árabe con el que se significaba “el agua que corre de las aceitunas”). En dicha especie podemos distinguir dos fenotipos característicos en función del grado de solubilidad en agua de los exopolisacáridos producidos.

Dado el gran interés de los biopolímeros solubles en agua, nuestro estudio se ha centrado en la localización, identificación y caracterización del operón de biosíntesis del exopolisacárido producido por *Paenibacillus jamilae*. Dicha especie es productora

de biopolímero soluble en agua, que en estudios previos se ha analizado a nivel de composición química y actividad biológica.

Los genes que codifican para las enzimas implicadas en la síntesis, así como la polimerización y exportación del EPS están situados en el cromosoma bacteriano en una misma unidad policistónica. Las especificidades de las glicosiltransferasas, enzimas esenciales para la transferencia de los azúcares activados, que constituirán las unidades repetitivas en la estructura química del biopolímero (oligosacárido), son galactosiltransferasa, glucosiltransferasa y manosiltransferasa, junto a una epimerasa probable que versatiliza la disponibilidad de substrato. Todas ellas están codificadas por la región central del operón. Se les ha realizado un análisis bioinformático, asignándole funciones por homologías de secuencias con las ya descritas en las bases de datos y posteriormente corroboradas con un análisis enzimático funcional. Los resultados obtenidos están en concordancia con la composición química cualitativa del polisacárido.

El análisis transcripcional realizado nos ha permitido localizar una unidad transcripcional esencial completa, la presencia de promotores fuertes internos y zonas reguladoras delante de las enzimas responsables del inicio de la síntesis del polímero y un terminador transcripcional en el extremo 3' de una

región genética que codifica una enzima que libera el oligosacárido de la molécula soporte o aceptora en la transferencia de moléculas activas de azúcares, la cual es necesaria durante todo el proceso de síntesis del biopolímero. Predecimos con nuestro estudio, que los flancos 5' y 3' codifican para enzimas y moléculas necesarias para la polimerización, transporte o exportación del EPS y su para la regulación de su propia expresión.

Con los resultados de este trabajo se establecen los conocimientos teóricos y experimentales necesarios para un futuro planteamiento de mejora biotecnológica de cepas bacterianas mediante ingeniería de polisacáridos, para la biorremediación de alpechín y alpeorujo.

PARTE I: ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

Capítulo 1. Introducción a la tesis doctoral.

Capítulo 1. Introducción a la tesis doctoral.

1. 1. – Proyecto de tesis doctoral.

1. 2. – Tesis doctoral. Presentación y diseño.

1. 1. – Proyecto de tesis doctoral.

El tema del proyecto provisional de la tesis fue la caracterización taxonómica y estudio genético molecular de cepas bacterianas con interés biotecnológico. Las áreas de conocimiento básicas en las que se enmarca son la microbiología y la bioquímica y biología molecular. Las palabras claves o descriptores que identifican este estudio son: biorremediación, alpechín y alpeorujó, taxonomía molecular, exopolisacáridos, genes-operón, mejora biotecnológica y potencial industrial.

Esta tesis doctoral ha abarcado parte de los estudios de carácter básico realizados para el desarrollo de los objetivos de dos proyectos de I+D+I (Investigación, Desarrollo e Innovación) del plan nacional en el área utilización de recursos naturales.

Los proyectos de investigación I+D+I en los que está fundamentado este trabajo, se identifican también por las palabras clave que están relacionadas con el tema, tecnologías empleadas y aplicaciones del propio proyecto. Describimos de forma breve las características de cada uno de los proyectos, que son a su vez complementarios, para tener una visión panorámica de la contribución puntual de este estudio a un objetivo general común, que es el aprovechamiento de subproductos nocivos originados en la extracción del aceite de oliva.

- Proyecto I+D+I 1:

1. **Título:** “Producción de biopolímeros microbianos como alternativa al aprovechamiento de los residuos originados en el proceso de elaboración del aceite de oliva”.
2. **Proyecto Estratégico-Movilizador Sobre “Aceite de Oliva”.**

3. **Identificación por palabras clave:** Alpechín, aceite de oliva, biopolímeros, exopolisacáridos, subproductos, fermentadores y microorganismos.

4. **Resumen.** En este proyecto se propone utilizar microorganismos productores de biopolímeros, especialmente polisacáridos extracelulares, en la biorremediación de sustancias residuales de la industria derivada de la obtención del aceite de oliva. Así mismo, se estudiarán los polisacáridos obtenidos y sus posibilidades para una posible aplicación industrial. También se pretende caracterizar taxonómicamente, a nivel molecular, la mejor de las cepas seleccionadas, especialmente la que sea utilizada para inocularla a nivel de biorreactor. Se realizará la caracterización y determinación de genes presuntamente implicados en el proceso de biosíntesis y se analizará su expresión genética. Se determinará la toxicidad resultante de los efluentes del proceso de biorremediación.

- Proyecto I+D+I 2:

1. **Título:** “Mejora del proceso de producción de un nuevo exopolisacárido por *Paenibacillus jamilae* a partir de alpechín y alpeorujo”

2. **Programa nacional de recursos naturales.**

3. **Identificación por palabras clave:** alpechín, alpeorujo, biopolímeros, biorremediación, exopolisacáridos microbianos.

4. **Resumen.** El objetivo principal del presente proyecto es aplicar microorganismos productores de biopolímeros (exopolisacáridos), en particular la especie *Paenibacillus jamilae*, o ésta con asociaciones de otras bacterias, a la biorremediación de sustancias residuales de la industria derivada de la obtención del aceite de oliva, tales como alpechín y alpeorujo. Se realizará una mejora biotecnológica de la producción de biopolímero. Se evaluarán las posibilidades de aplicación a nivel industrial (alimentación y biomedicina)

Ambos proyectos presentan una integración multidisciplinar de interés puesto que conecta aspectos técnicos con estudios básicos en los que se aborda el tratamiento de productos residuales. La biorremediación del alpechín, alpeorujo y otros residuos derivados de la producción del aceite de oliva está considerada como prioritaria en

nuestro país, bajo el punto de vista de la contaminación del medio ambiente. La utilidad derivada de los resultados del proyecto parece obvia y de potencial aplicación en las empresas alimentarias y agrícolas colaboradoras.

1. 2. – Tesis doctoral. Presentación y diseño:

Esta tesis doctoral consta de cinco partes:

PARTE I: ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

PARTE II: PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS

PARTE III: DESARROLLO DE OBJETIVOS

Parte III.1. Estudio taxonómico de cepas con interés biotecnológico.

Parte III.2: Estudio molecular de la biosíntesis de EPS en *Paenibacillus jamilae*.

PARTE IV: DISCUSIÓN FINAL

PARTE V: CONCLUSIONES FINALES

En la primera parte presentamos este estudio y describimos el planteamiento de un problema de contaminación medioambiental de interés regional y nacional que genera la necesidad de continuos estudios científicos para obtener una solución.

En la segunda parte justificamos el planteamiento de los objetivos específicos para contribuir al cumplimiento de un objetivo general.

La tercera parte presenta el núcleo del estudio, el desarrollo de los objetivos y su contribución al conocimiento, estableciendo hipótesis que serán las bases científicas de posteriores estudios. Está subdividida en dos partes bien diferenciadas, con sus respectivos capítulos desglosados en varias partes: un resumen, una introducción del tema en cuestión, material y métodos, resultados, discusión y conclusiones parciales. La parte III.1 presenta un estudio taxonómico polifásico en el que describimos una nueva especie bacteriana, que crece al 100% (v/v) de alpechín y produce un nuevo exopolisacárido. La parte III.2 desarrolla un estudio genético y bioquímico de la biosíntesis de exopolisacárido.

Con ambos estudios establecemos las bases de conocimiento para una mejora biotecnológica de microorganismos, que contribuya en último término a la

biorremediación de los residuos del aceite de oliva, además establecemos nuevos campos de acción según los resultados obtenidos, que se describen y resumen en la cuarta y quinta parte, respectivamente.

Capítulo 2. Biorremediación de alpechín y alpeorujó

Capítulo 2. Biorremediación de alpechín y alpeorujo.

2.1. - Alpechín y alpeorujo

2.2. - El problema del alpechín y alpeorujo

2.3. - Depuración y aprovechamiento del alpechín

2.4. - Nuevas perspectivas de biodegradación

2.1. - Alpechín y alpeorujo

La aceituna está compuesta aproximadamente de un 25% de aceite, 25% de sólidos y un 50% de agua. La extracción del aceite es básicamente un proceso de separación sólido-líquido en el que se obtiene una fase sólida denominada orujo y una fase líquida o mosto que se separa en una oleosa (aceite) y otra acuosa (alpechín). Dependiendo del sistema el orden de obtención de las fases varía: en el sistema continuo de tres fases se obtienen directamente tres y en el de dos fases se obtienen sólo dos ya que la acuosa se incorpora a la sólida dando lugar a un nuevo tipo de residuo que se ha denominado alpeorujo. En el proceso se utiliza agua para lavar las aceitunas, favorecer la extracción del aceite, enfriar la maquinaria y arrastrar solutos acuosos del aceite. Esta agua se incorporan a la fase acuosa de la aceituna constituyendo las aguas residuales de las almazaras o alpechín. Las definiciones de dichos residuos son:

- **Alpechín:** Líquido oscuro y fétido que sale de las aceitunas cuando están apiladas antes de la molienda, y cuando, al extraer el aceite, se las exprime con auxilio del agua hirviendo.

- **Alpeorujo:** Es el nombre que se da a los residuos procedentes de los nuevos procesos de extracción de aceite de oliva en dos fases. Es un residuo pastoso, la mezcla de alpechín y orujo, el cual se compone principalmente de residuos sólidos de la molturación de aceite, algo de aceite retenido (2-4%) y agua (50-60%).

La capacidad de extracción de aceite de los residuos, alpeorujo y alpechín, subproductos en los distintos modos de extracción en dos y tres fases, respectivamente, queda reflejado en la siguiente tabla, resumen de un estudio realizado por Amirante *et al.*, 1993.

**Composición química/ Características fisicoquímicas
Tabla de los principales componentes del alpechín:**

	Extracción en dos fases	Extracción en tres fases
Capacidad de extracción de aceite	86% a	85% a
<i>Orujo</i>		
Cantidad (kg/100kg de olivas)	72.5 a	50.7 b
Humedad (%)	57.5 a	52.7 b
Aceite (%)	3.16 a	3.18 a
Aceite (% materia seca)	7.44 a	6.68 a
Aceite (kg/100kg de olivas)	2.28 a	1.60 b
Orujo seco(kg/100kg de olivas)	30.7 a	23.9 b
<i>Alpechín</i>		
Cantidad (litros/100kg de olivas)	8.30 a	97.2 b
Aceite (g/litro)	13.4 a	12.6 a
Aceite (kg/100kg de olivas)	0.14 a	1.20 b
Residuo seco (kg/100kg de olivas)	1.20 b	8.3 b
Aceite en los subproductos (kg/100kg de olivas)	2.42 a	2.80 a
Los valores seguidos de letras idénticas indican que no son estadísticamente diferentes a P< 0.05.		
Estudio realizado por Amirante P., Di Renzo G.C., Di Giovacchino L., Bianchi B., Catalano P., 1993, <i>Olivae</i> n°48, 43.		

Otros componentes orgánicos de los residuos, de interés para procesos de biorremediación mediante microorganismos resistentes a los componentes tóxicos, son los azúcares, que constituyen de un 2 aun 8% de la materia orgánica. (García *et al.*,1990; Ragazzi y Veronese 1967; Carola *et al.*,1975).

2.2. - El problema del alpechín y alpeorujo

La problemática del **alpechín** deriva de sus múltiples efectos adversos sobre el medioambiente, que han ido en aumento con el acelerado proceso de industrialización, los problemas se deben a su elevada composición de componentes tóxicos.

Una solución sería diluirlo adecuadamente para eliminar dichos efectos, lo cual es de difícil aplicación por la carestía de agua. Una de las soluciones propuestas fue el vertido en balsas de evaporación, pero la capacidad de retención de las mismas era insuficiente (Rodrigo Román en 1990), además de su impacto ambiental negativo.

La administración, en nuestro país, en 1994, creía haber encontrado los cauces para una correcta solución a la problemática planteada por la contaminación del alpechín, con el establecimiento de la producción del aceite de oliva por el sistema de dos fases (Agencia del Medio Ambiente, 1995), mediante el cual, ciertamente, deja de formarse alpechín. Sin embargo, se ha comprobado que tal tipo de solución no es todo lo acertada que parecía, al generarse un nuevo tipo de residuo, al que los científicos hemos denominado como “**alpeorujo**”, y que lamentablemente plantea nuevos problemas, como son la elevada concentración de los componentes tóxicos, y de forma preferente a los extractores-orujeros, a pesar de las nuevas propuestas como la reutilización de residuos por métodos de cogeneración.

Así, hablar de los residuos derivados de la obtención del aceite de oliva es referirse a residuos de un elevado índice de contaminación, donde el alpechín y el alpeorujo constituyen los más difíciles de reciclar.

Destacamos su composición en polifenoles y fenoles simples (que suponen en alpechín entre el 0,5-1% de la materia orgánica), ya que se le atribuyen efectos nocivos medioambientales e influencia negativa sobre procesos biodepurativos. Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular y simples están presentes en ambos residuos pero a distintas concentraciones y son los principales responsables del poder fitotóxico,

antibacteriano y contaminante. Martínez-Nieto et al. en 1992 realizaron una amplia revisión de los que han sido identificados por diversos autores.

La coloración de estos residuos, según estudios de Ragazzi et al. en 1967 y posteriores de Sáiz-Jimenez et al. en 1986, es debida a un polímero macromolecular constituido por fenoles libres y polimerizados que forman una matriz similar a la lignina en la que se engloban polisacáridos, monosacáridos, proteínas, lípidos, metales y polifenoles como flavonoides, antocianos y oleuropeína.

Las vías de solución se han ido modificando, ya que las tradicionales no han tenido el impacto deseado (Rodrigo Román, 1990), así ha sido considerado el alpechín un producto de uso potencial para su aprovechamiento (Fiestas 1953; Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995).

2.3. - Depuración y aprovechamiento del alpechín

La trayectoria investigadora en las líneas de depuración y biorremediación o aprovechamiento o ambas utilizadas conjuntamente, ha sido extensa y la mayoría de las propuestas han sido objeto de revisión por varios autores (Janer del Valle, 1980; Amirante, 1990; Fiestas y Borja, 1992, Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995).

- Depuración.

A continuación se mencionan las principales técnicas de tratamiento que se han ensayado como posible solución al efecto contaminante del alpechín, las cuales involucran métodos fisicoquímicos, químicos y biológicos.

- Depuración por métodos fisicoquímicos.

Implican técnicas bastante eficaces, sin embargo su alto costo de instalación y mantenimiento, son impedimentos para su aplicación en el ámbito industrial.

Ultrafiltración y ósmosis inversa.- (Reimers Suárez 1983)

Evaporación forzada. (Martínez Nieto *et al.*, 1994).

Congelación. (Franziona *et al.*, 1986).

Evaporación natural. (Escolano Bueno, 1975)

- Depuración por métodos químicos.

Fiestas Ros de Ursinos (1977) ensayó el efecto de la adición de óxido de calcio y sales de aluminio y hierro, sobre las características del alpechín. Lo único que dio resultados, en principio aprovechables para la depuración, fue la adición de óxido de calcio. Aún así, este método tiene poco interés debido a la aparición de fangos, lo cual supone un nuevo problema de eliminación.

- Depuración por métodos biológicos.

El tratamiento biológico de un agua residual tiene por objeto eliminar la materia orgánica que ésta contiene mediante la acción de diferentes grupos de microorganismos que metabolizan una parte de aquella e inducen a procesos de coagulación que facilitan su separación (Metcalf y Eddy, 1977).

Entre estos métodos encontramos:

Depuración anaerobia.-

El residuo requiere un pretratamiento para eliminar compuestos tóxicos o bien diluirlo hasta que no sea tóxico para las bacterias, que realizarán la biodepuración anaerobia (Toerien *et al.*, 1969; Fiestas *et al.*, 1982; Borja *et al.*, 1993).

Depuración aerobia.-

Los microorganismos que intervienen en los procesos biológicos pueden ser bacterias, hongos, algas y protozoos. Cualquier materia orgánica puede servir de alimento para los microorganismos y el tipo de alimento disponible será el factor determinante del organismo que prevalezca.

- Biorremediación.

En los últimos años y como resultado del desarrollo industrial, la amenaza que suponen los residuos de las industrias para el hombre y para el medio ambiente se ha hecho muy patente. Los vertidos del petróleo, los vertidos químicos, los residuos agroindustriales, los plaguicidas, los herbicidas y los metales pesados son sólo algunos de tales peligros.

La biotecnología constituye en la actualidad una herramienta tecnológica de la cual el hombre está haciendo uso como alternativa para la solución de los problemas ambientales. La aplicación de procesos biotecnológicos en el tratamiento parcial y de eliminación del alpechín, ha sido revisada por Ramos-Cormenzana et al. (1995), señalando que la solución a la problemática del alpechín no sólo debe considerar aspectos ambientales, sino el potencial económico que ésta posee por su composición, que lo hace aprovechable como sustrato para la obtención de productos de interés industrial y/o comercial. Habiendo sido propuestos los siguientes usos potenciales:

- (1) Bioremediación del alpechín para su empleo como fertilizante (Russell, 1994) (Cegarra *et al.*, 1996)
- (2) Su uso en la producción de proteínas unicelulares y biomasa para la industria de alimentos.
- (3) Su utilización como sustrato para el crecimiento de algas.
- (4) Producción de biopolímeros.
- (5) Su uso para la producción de bioenergía.
- (6) El empleo como una fuente de productos biofarmacéuticos.

En la actualidad algunas de estas aplicaciones biotecnológicas están siendo desarrolladas en un nivel experimental por nuestro grupo de investigación.

A continuación se describirán brevemente el potencial uso que ha orientado el avance del trabajo que presentamos:

Aunque el empleo del alpechín como fertilizante parece ser una alternativa viable, otros métodos de bioremediación deberían ser ensayados, debido a que este

proceso por sí solo, no sería suficiente para tratar la enorme cantidad de alpechín producido.

Producción de biomasa y proteínas unicelulares para la industria de alimentos.- Investigaciones realizadas por Fiestas Ros de Ursinos (1958), han demostrado que las levaduras *Torulopsis utilis* y *Candida utilis*, son capaces de crecer en alpechín y transformar los azúcares en proteínas insolubles con un rendimiento del 50%, los cuales son apropiados para la alimentación animal, no sólo por su contenido en aminoácidos esenciales, sino también por su elevada concentración en vitaminas del grupo B.

Se han empleado hongos como agentes fermentativos, ya que éstos metabolizan otros compuestos además de los azúcares, lo que en principio puede aumentar el rendimiento, al mismo tiempo que elimina una mayor proporción de sustancia orgánica, lo que mejora la calidad de los efluentes. Entre los hongos experimentados se encuentran: *Geotrichum candidum*, *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.* (Vaccharino *et al.*, 1986). Como subproducto se obtiene una biomasa de hongos con un contenido en proteínas del 30% de alta digestibilidad, utilizable para la alimentación de rumiantes.

Zervakis *et al.*, (1996), realizaron investigaciones dirigidas al estudio de la posibilidad de utilizar el alpechín para el cultivo de hongos comestibles del género *Pleorotus*, para lo cual se ensayaron tres especies: *P. eryngii*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*. Los resultados revelaron la capacidad de dichas especies para colonizar un substrato basado en pasta de orujo suplementado con alpechín en una concentración de 15 a 25% p/v, siendo incapaces de desarrollarse a mayores porcentajes.

Empleo como medio de crecimiento para algas.- En un estudio sobre la capacidad de la población microbiana de crecer y desarrollarse en el alpechín (Ramos-Cormenzana, 1986), se encontró que un gran espectro de microorganismos eran capaces de hacerlo; sugiriéndose que debido a las altas temperaturas prevalentes en el sur de España, estos residuos acuosos podrían emplearse como medio para el cultivo de algas, llegando a demostrarse con el cultivo de las especies *Dunaliella* o *Spirulina*, capaces de producir biomasa y β -caroteno (Ramos-Cormenzana, 1989).

Sánchez Villasclaras *et al.*, (1996), empleando alpechín a una concentración óptima de 10%, sin la adición de nitratos y con un nivel de aireación de 1 v/v min.; obtienen una biomasa de microalgas (*Chorella pyrenoidosa*), con un contenido en proteína bruta del 20 %, y en lípidos de un 21,5 %, con relación a la biomasa seca. En la fracción lipídica de la biomasa, el porcentaje de ácidos grasos polinsaturados está entre el 20% y el 25%. Siendo esta biomasa utilizable para la producción de distintos productos químicos tales como proteínas, lípidos, pigmentos y otras biomoléculas.

Producción de biopolímeros a partir de alpechín.- Uno de los biopolímeros de gran interés y aplicación industrial en los últimos años son los polisacáridos extracelulares producidos por microorganismos. En la actualidad se están realizando investigaciones con la finalidad de emplear residuos agrícolas como sustratos industriales en los procesos de fermentación para así disminuir los costos de producción. El alpechín teniendo en cuenta su composición química y sus propiedades fisicoquímicas, reúne cualidades que lo han hecho sujeto de investigación como sustrato para procesos de producción de exopolisacáridos.

El alpechín se ha empleado con satisfacción como sustrato orgánico de buena calidad para la producción de pululano por fermentación en experimentos preliminares realizados por Israilides *et al.*,(1994) en el Instituto Tecnológico de Productos Agrícolas de Atenas.

Investigaciones realizadas por el grupo de trabajo del profesor Ramos-Cormenzana, han obtenido resultados prometedores: una relativa alta conversión de alpechín a polisacárido xantano y pululano. La concentración óptima para el crecimiento y producción de pululano por *Aureobasidium pullulans* fue 70% (vol/vol), proporcionando niveles de producción de 3 g/l (Quevedo-Sarmiento *et al.*,1991).

El uso de alpechín como sustrato para la producción por microorganismos halófilos moderados ha sido también investigado en los laboratorios del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de La Universidad de Granada. Buenos

resultados fueron obtenidos trabajando con *Halomonas eurihalina*, una bacteria halófila moderada descrita por Quesada *et al.*,(1993), que produce un polisacárido extracelular, con propiedades físicas y químicas de interés para múltiples aplicaciones industriales.

En los últimos años se han realizado investigaciones en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada sobre la posibilidad de producir el polisacárido extracelular xantano empleando alpechín como substrato, con cultivos de la cepa de *Xantomonas campestris* NRRL-B-1459-S4LII. Los resultados han demostrado la capacidad de dicha cepa de crecer y producir xantano en un medio con un 30-50% vol/vol de alpechín, como única fuente de nutrientes, alcanzando niveles de producción de 4 g/l de xantano, siendo resultados prometedores tanto en los niveles de producción, como en cuanto a las propiedades reológicas (López-López, 1996).

En la actualidad la contaminación ambiental y el agotamiento de fuentes no renovables han aumentado el interés en los materiales biosintéticos como los polihidroxicanoatos (PHAs). Se considera a los PHAs como los poliésteres similares al propileno y polietileno, originando por lo tanto un gran interés en la explotación comercial de este material biodegradable (Anderson y Dawes, 1990). En estudios realizados sobre el efecto del alpechín sobre el crecimiento de la especie *Azotobacter chroococcum*, fue observado que este residuo estimula la producción de PHB por el microorganismo (García-Barrionuevo, 1992).

Gonzalez-López *et al.*,(1996), describieron la producción de homo y copolímeros de PHAs por la bacteria *Azotobacter chroococcum* cepa H23, cuando crece en medios de cultivo adicionados con alpechín. La cepa de *A. chroococcum* crecida en un medio-NH⁴ suplementado con alpechín forma PHAs en un 50% del peso seco celular después de 24 horas. Los resultados muestran que el alpechín mantiene el crecimiento de la cepa H23 y también que este residuo puede ser utilizado como fuente de carbono. La producción de PHAs utilizando alpechín parece prometedora, ya que el empleo de substratos baratos para la obtención de PHAs es esencial si los bioplásticos llegan a ser productos competitivos. Así mismo, en últimos estudios realizados por nuestro grupo de investigación se han obtenido resultados prometedores en la producción de PHAs como

plásticos biodegradables a partir de alpechín empleando cepas transformadas de *Pseudomonas putida* (García, 1999).

Métodos mixtos:

Combinan métodos de depuración y biorremediación, estos métodos han sido revisados por diversos autores, INDELPA, S.A (1989), González *et al.*,1994, Quesada Lucas (1989), Israeides (1990); Hamdi *et al.*,1992; Fiestas y Borja 1990.

2.4. - Nuevas perspectivas de biodegradación

Actualmente se baraja la posibilidad de optimizar un método que incluya la biodegradación o depuración y la biorremediación, lo cual sólo es posible con la utilización de comunidades microbianas que contengan equipos enzimáticos compatibles y cuya acción sea complementaria y efectiva para disminuir la toxicidad del residuo a la vez que es aprovechable para la producción de un nuevo recurso.

Los estudios de utilización individualizada de microorganismos para biorremediar o biodegradar residuos orgánicos cuya composición es muy variada y variable dependiendo de muchos factores, como es el caso del alpechín y alpeorujó (Martínez et al. 1986; Ramos-Cormenzana, 1986; Moreno et al. 1990; Fiestas y Borja, 1990), están siendo complementados por estudios globales de comunidades o agrupaciones microbianas naturales, aisladas del propio residuo o artificiales, modificados genéticamente, con actividades bioquímicas específicas que actúan sobre diferentes compuestos recalcitrantes de tipo fenólico (Ramos.J:L 2000)

Para analizar la variabilidad de las comunidades microbianas de otros residuos sólidos orgánicos (Haruta *et al.*,2002), se están empleando actualmente, técnicas moleculares con gran eficiencia, por ejemplo DG-DGGE (Siglas inglesas de Doble Gradiente-Electroforesis en gel con Gradiente Desnaturalizante) (Muyzer 1999), con la que se puede estimar las especies bacterianas presentes y analizar la secuencia

nucleotídica si hay una buena resolución de bandas, así pues es una técnica que permite hacer un análisis cualitativo y cuantitativo. FISH (Hibridación In Situ con Fluorescencia) es una técnica cuantitativa, que permite mediante la utilización de varias sondas específicas de generos, grupos o especies, detectar in situ la presencia de los mismos (Amann et al. 1990; Alm et al. 1996).

Las comunidades microbianas presentes en alpechín y alpeorujó son diferentes principalmente a nivel cuantitativo. Estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación (Aguilera *et al.*,2002), han demostrado que en alpechín y alpeorujó se pueden utilizar herramientas moleculares potentes, por ejemplo T-RFLP (Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción terminales) y SSCP (Polimorfismo conformacional de hebras simples), que tienen una gran capacidad resolutive y con aplicaciones directas en ecología microbiana, para buscar una comunidad óptima para su biodegradación.

La utilización de estas técnicas moleculares se pueden dirigir hacia la búsqueda de microorganismos que se desarrollen y que contengan genes específicos de una ruta enzimática necesaria para biodegradar el residuo en cuestión, en el caso del alpechín y alpeorujó, aquellas enzimas que metabolicen compuestos fenólicos (Descarboxilasas de Acidos fenólicos (Barthelmebs et al. 2001); enzimas implicadas en las rutas de degradación del protocatecuato (PCA), intermediario común de degradación de los ácidos fenólicos, por ejemplo dioxigenasas esenciales descritas en diferentes microorganismos (*Pseudomonas sp.* (Overhage *et al.*,1999); *Sphingomonas paucimobilis* (Nishikawa et al. 1998); Actinomicetos (Hammann y Kutzner, 1998); *Acinetobacter* (Gerischer, *et al.*,1995; Segura, *et al.*,1999), implicadas en el catabolismo aromático.

PARTE II: OBJETIVOS

Capítulo 3. Objetivos

Uno de los mayores problemas de contaminación ambiental en el área mediterránea, y concretamente en la región andaluza, son la existencia en el medio ambiente de residuos recalcitrantes, subproductos de la obtención de aceite de oliva. Se han propuesto de forma continuada numerosas soluciones relacionadas con la biorremediación de tales supproductos (Fiestas, 1981; Israelidis 1990) y otras soluciones de carácter técnico, como la obtención de aceite de oliva mediante el sistema de dos fases (Alba, 1998), que evita la formación de alpechín pero origina un nuevo material de desecho, “alpeorujó” también contaminante. Actualmente se baraja la posibilidad de utilizar comunidades microbianas que posean un sistema enzimático específico natural o artificial con capacidad complementaria de biodegradar compuestos tóxicos como son los derivados fenólicos (Ramos J.L., *et al.*, 2000).

Nuestro grupo de investigación considera que una de las alternativas más acertada para paliar este problema, es la posibilidad de obtener nuevos recursos, mediante el reciclado, como por ejemplo son los biopolímeros obtenidos a partir de cepas microbianas capaces de desarrollarse en dichos residuos, tanto de tipo poli- β -hidroxialcanoato (Núñez-Muller *et al.*, 1995; Aguilera *et al.*, 1999), así como los exopolisacáridos microbianos (López y Ramos-Cormenzana 1996; Ramos-Cormenzana, 1997), intentando además conseguir que los efluentes no sean contaminantes (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995).

La composición química del alpechín, concretamente su elevada proporción de carbono y nitrógeno favorece su uso para la producción de EPS (López, *et al.*, 2001) por microorganismos.

Los polisacáridos de origen microbiano ofrecen varias ventajas en su aplicación frente a los obtenidos de algas y plantas, entre las que resaltamos la variabilidad de composición y propiedades, que consecuentemente amplía sus posibles aplicaciones, las cuales se derivan en su mayoría de su capacidad para modificar las propiedades de los sistemas acuosos (Sutherland, 1986), como por ejemplo la solubilidad, viscosidad pseudoplasticidad, capacidad de formación de biofilms y la capacidad captadora de iones metálicos. Otra ventaja de los polisacáridos microbianos es que su obtención no está expuesta a factores ambientales y en cuanto a cantidad y calidad es controlable influyendo sobre las condiciones del medio o por manipulación genética. Los avances en ingeniería de polisacáridos microbianos han sido espectaculares en estos últimos

años, sobretodo en aquellas especies bacterianas cuya producción de EPS tiene interés industrial como *Xanthomonas campestris* (Becker *et al.*,1998), bacterias del ácido láctico (De Vuyst *et al.* 2001) y agentes causales de enfermedades (Kolman *et al.*,1997).

Trabajos previos al presente estudio han demostrado la producción de nuevos exopolisacáridos en altas cantidades, por un conjunto de cepas bacterianas no caracterizadas taxonómicamente, todas ellas seleccionadas por su capacidad de utilizar el alpechín como única fuente de carbono y energía (Guerra, 1999).

Partiendo así de cepas bacterianas que reunían dos premisas necesarias para biorremediar el residuo, desarrollo viable en el alpechín y producción de un recurso útil, EPS, en este trabajo nos hemos planteado varios objetivos con la finalidad de caracterizarlas y de estudiarlas a nivel molecular para en un futuro explotar las posibilidades de un control genético sobre la cantidad y calidad de sus EPSs.

Teniendo en cuenta las argumentaciones precedentes, los objetivos fundamentales que planteamos fueron los siguientes:

Objetivo general:

Con la presente tesis doctoral se pretende establecer las bases de conocimiento adecuadas para realizar una mejora biotecnológica de cepas microbianas productoras de exopolisacárido y capaces de crecer sobre alpechín y alpeorujo, subproductos de la extracción de aceite de oliva.

Objetivos específicos:

- I. - Caracterización taxonómica de cepas bacterianas con interés biotecnológico, seleccionadas por ser capaces de crecer al 100% de alpechín y producir un nuevo exopolisacárido.

- II. – Caracterización molecular del operón responsable de la biosíntesis de exopolisacárido de una de las cepas descritas por su óptima producción del biopolímero y por sus características especiales. Este objetivo está desarrollado en tres apartados:

II.A. - Estudio genético de la biosíntesis de exopolisacárido.

II.B. - Estudio funcional de las proteínas implicadas en la biosíntesis de exopolisacárido.

II.C. - Estudio transcripcional del operón de biosíntesis de exopolisacárido.

PARTE III: REALIZACIÓN DE OBJETIVOS

**PARTE III.1. ESTUDIO TAXONÓMICO DE
CEPAS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.**

Capítulo 4. Descripción Taxonómica de *Paenibacillus*
jamilae

Capítulo 4. Descripción Taxonómica de *Paenibacillus jamilae*.

4. 1. – Resumen

4. 2. – Introducción

4. 3. – Objetivos

4. 4. – Material y métodos

4. 5. – Resultados

4.5.1.- Resultados de las pruebas fenotípicas:

4.5.1.1.- Clasificación fenotípica básica

4.5.1.2.- Ensayos de solubilidad

4.5.1.3.- Morfología bacteriana

4.5.1.4.- Pruebas fenotípicas generales

4.5.1.5.- Producción de ácidos

4.5.1.6.- Dendrograma de Taxonomía numérica

4.5.2.- Resultados de las pruebas genotípicas:

4.5.2.1.- Composición de Bases G+C.

4.5.2.2.- Determinación del gen que codifica para el RNA ribosómico 16S.

4.5.2.3.- Hibridación entre las diez cepas y con la cepa más cercana filogenéticamente.

4. 6. – Discusión

4. 7. – Conclusiones

4. 1. – Resumen

En este capítulo se desarrolla el estudio taxonómico de diez cepas bacterianas que fueron seleccionadas en un trabajo de investigación previo (Guerra 1999), partiendo de un total de 60 cepas aisladas a partir de un compost de maíz tratado con alpechín, y sometidas posteriormente a presión selectiva de concentraciones crecientes de alpechín, y preseleccionadas por su capacidad de crecer al 100% del residuo y producir exopolisacáridos. Se seleccionaron cepas productoras de dos tipos distintos de exopolisacáridos, soluble e insoluble en agua, con productividades específicas diferentes. Las diez cepas fueron identificadas mediante pruebas fenotípicas y bioquímicas básicas que, de forma preliminar, las incluyó dentro del género *Bacillus*. Posteriormente se les realizó un estudio de taxonomía numérica, comparándolas con cepas de referencia. También se han realizado de forma paralela pruebas genéticas, que incluyen la determinación del contenido en bases nucleotídicas (G+C), la secuenciación del gen de RNA ribosómico 16S y la hibridación *DNA-DNA* entre las diez cepas y con la especies bacterianas de colección fenotípica y filogenéticamente más cercanas.

El análisis de los resultados de las pruebas fenotípicas contrastado con el de las pruebas genotípicas dio lugar a la descripción de una nueva especie bacteriana denominada *Paenibacillus jamilae*, con características específicas que la constituyen en una unidad taxonómica aislada del resto de las especies ya descritas dentro del género *Paenibacillus*.

4. 2. – Introducción

4.2.1.- Taxonomía microbiana. Generalidades.

4.2.1.1.- Taxonomía numérica

4.2.1.2.- Taxonomía molecular

4.2.1.2.a. – Contenido en G+C:

4.2.1.2.b. - Secuenciación RNAr 16S

4.2.1.2.c. - Hibridación DNA-DNA

4.2.1.3.- Taxonomía del Genero *Bacillus*

4.2.1.- Taxonomía microbiana. Generalidades.

La taxonomía comprende la clasificación, identificación y nomenclatura de los organismos, incluyendo las actividades implicadas en la construcción de sistemas clasificatorios que agrupan los seres vivos de acuerdo con criterios preestablecidos (Ramos-Cormenzana, 1979).

Por **Clasificación** entendemos la agrupación de los organismos de acuerdo con los caracteres y atributos que poseen. Las clasificaciones biológicas son de tipo jerárquico y se pueden representar en un árbol filogenético.

La **Identificación** es el proceso por el cual los organismos con determinadas y desconocidas afinidades taxonómicas se sitúan dentro de un grupo taxonómico preexistente.

Sistemática es la agrupación de organismos vivos de los que se puede facilitar el conocimiento de los mismos y de sus relaciones. La base de la taxonomía bacteriana es el “Taxon” o taxa en el que debe realizarse la mayor información posible. El establecimiento de un taxon determinado, debe implicar la existencia de unos caracteres afines en las especies agrupadas en aquel taxon en el que puede existir un rasgo fundamental. Y deben establecerse unas afinidades, porque de otro modo podría

darse el caso que quedara excluida una bacteria que careciera del rasgo fundamental, aunque todos los demás rasgos si fueran afines con el taxon.

El estudio que presentamos está basado en el manual de sistemática de Bergey (Sneath *et al.*, 1986), que está aceptada mundialmente y que se ha compendiado en publicaciones recientes.

Las clasificaciones bacterianas se basan en una serie de caracteres morfológicos, fisiológicos, antigénicos, ecológicos y genéticos. Por supuesto debe basarse en caracteres no adaptacionales y a ser posible filogenéticos, es decir, los miembros deben ir relacionados de acuerdo con la procedencia de un ancestro común, pudiendo considerarse como mayor inconveniente, el que se desconocían las vías de descendencia genética en la mayor parte de los casos, cuestión que se parece resolver ahora con las relaciones filogenéticas establecidas con la secuenciación del RNA ribosómico 16S.

La taxonomía da lugar al establecimiento de una jerarquía dentro de la diversidad de los organismos cuyos conceptos básicos son:

Especie Bacteriana que es el pilar fundamental del esquema taxonómico así como la unidad básica para entender la biodiversidad microbiana. No existe unanimidad entre los microbiólogos sobre cuales son las fronteras que circunscriben esta unidad taxonómica. Se está poniendo en entredicho la validez de las fronteras demarcadas por el comité de taxonomía bacteriana en 1987 (Wayne), argumentando, en la mayoría de los casos, que se trata de un concepto demasiado conservador y que subestima la diversidad real. Los conceptos universales son:

Concepto evolutivo de especie: Es el concepto con más carga teórica, y se basa en la definición de especie como una línea de desarrollo, donde se puede reconocer una trayectoria evolutiva.

Concepto fenético de especie: Es el concepto más pragmático y con menos carga teórica; se concibe la especie como una unidad basada en el grado de semejanza entre los organismos que lo conforman.

Concepto filogenético de especie: Se basa en el reconocimiento de grupos monofiléticos que se pueden definir por un número determinado de caracteres, en principio únicos y exclusivos del taxon.

Género: Grupo taxonómico de especies relacionadas.

Familia: En la clasificación biológica, nivel intermedio de la jerarquía taxonómica. Contiene varios géneros, cada uno con una o más especies. Es el taxón superior que se emplea de manera rutinaria en estudios taxonómicos de procariotas.

Dominio: Es el nivel más elevado de clasificación biológica. Según la propuesta de Carl Woese, los tres dominios de los seres vivos son Bacteria, Arquea y Eukarya (Woese *et al.*, 1990).

La taxonomía bacteriana moderna está basada en las relaciones filogenéticas, medidas de las similitudes entre las secuencias del RNA 16S ribosómico (Woese, 1987). Aunque por sí sola no permite una identificación certera de los taxones. Algunos autores utilizan el término de taxonomía polifásica para englobar la combinación de métodos fenotípicos y genotípicos (Colwell, 1970; Vandamme *et al.*, 1996).

4.2.1.1.- Taxonomía numérica

La idea de taxonomía numérica surge por la necesidad de darle igual valor a los caracteres fenotípicos comparados de diferentes microorganismos. La realidad es que no todos los caracteres son homólogos.

La taxonomía numérica es la evaluación numérica de la afinidad o semejanza entre las unidades taxonómicas comparadas; así como la ordenación de estas unidades en taxa, bajo la base de su afinidad. Para realizar este estudio se necesita:

- Disponer de los microorganismos que queremos comparar; que constituirán lo que denominamos Unidad Taxonómica Operativa (OTU: Operational Taxonomic Units).
- Estudio de la presencia o ausencia en los OTUs de un determinado número de caracteres; es decir, lo que llamamos el cálculo de similitud.
- Análisis de grupos: disponiéndose los OTUs en grupos de similitud con la correspondiente construcción de tablas y dendrogramas.

- Construcción de claves: se ordenan los caracteres de las categorías reconocidas para preparar las descripciones y encontrar los caracteres que deban ser más usados en la realización de claves diagnósticas. Trabajar en taxonomía puede implicar la existencia de caracteres o rasgos no comparables (NC).

La aplicación de la taxonomía numérica es especialmente útil cuando se trabaja con un número de bacterias elevado que se quieren situar relativamente a otras bacterias perfectamente conocidas y pertenecientes a cultivos tipo. Se realiza con programas informáticos en los que se implementan algoritmos específicos, de los que se obtiene la matriz de semejanza y se realiza posteriormente el análisis de grupos. Se selecciona arbitrariamente un nivel en la escala de los coeficientes de semejanza. La selección de un nivel alto nos dará sólo pequeños grupos y de esta manera se pueden construir el dendrograma.

4.2.1.2.- Taxonomía molecular

Con el mismo objetivo de identificar, clasificar y nombrar microorganismos se han ideado técnicas que permiten el análisis a nivel molecular, concretamente han evolucionado más las genéticas ya que actúan sobre un material resistente, invariable, de fácil manipulación y en el que reside toda la información necesaria para el desarrollo de un ser vivo.

4.2.1.2. a. – Contenido en G+C:

La composición de bases del DNA determinada por métodos físicos es sencilla. Se basa en la “temperatura de fusión” del DNA, es decir, en la temperatura a la cual se desnaturaliza por ruptura de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas, que está directamente relacionada con el contenido en G+C, ya que los puentes de hidrógeno entre pares GC son más fuertes que entre los pares AT, ya que son tres y dos puentes de hidrógeno, respectivamente los que se forman en cada caso. La separación de las cadenas va acompañada de un marcado incremento en la absorbancia

a 260 nm, el máximo de absorción del DNA, y esto puede medirse con facilidad en un espectrofotómetro. Cuando una muestra de DNA se va calentando gradualmente, la absorbancia se incrementa cuando se van rompiendo los puentes de hidrógeno, alcanzándose un tope a aquella temperatura a la cual todo el DNA ha pasado a ser unicatenario. El punto medio de subida, la temperatura de fusión (T_m), es una medida del contenido en G+C. Dicho contenido puede calcularse también por centrifugación en un gradiente de densidad ya que ésta depende del cociente (G+C):(A+T) (Johnson, 1985; Owen et al., 1985).

La pendiente de la curva en la transición térmica está directamente relacionado con la homogeneidad del contenido G+C de la población de moléculas de DNA.

El DNA como consecuencia inevitable de la manipulación por el cizallamiento se puede fragmentar, a pesar de ello las preparaciones de genoma bacteriano permanecen relativamente homogéneas de acuerdo con estos criterios, lo cual indica que el contenido medio en G+C varía poco en las diferentes partes del genoma. Las únicas excepciones importantes son las preparaciones obtenidas de organismos que contienen dos elementos genéticos de diferente contenido en G+C.

Ninguna preparación de DNA muestra una homogeneidad molecular absoluta, así el contenido en G+C será siempre un valor medio y representa el valor máximo de una curva de distribución normal.

- Implicaciones taxonómicas de la composición de bases del DNA

El promedio de composición de bases característico del DNA nuclear de los principales grupos de organismos son más variables en el reino protista (25-80 % molar de G+C) que en animales y plantas que se centran alrededor del 35 al 40 % molar de G+C.

Cada especie bacteriana posee un contenido medio en G+C característico, que puede considerarse una de sus propiedades más importantes. Las diferencias sustanciales en la composición de bases del DNA de dos organismos son reflejo de un

número elevado de diferencias individuales en las respectivas secuencias de bases de sus DNA. El margen tan amplio de valores característicos de los procariotas viene a indicar la enorme diversidad evolutiva de este grupo particular de seres vivos, sugiriendo, asimismo, su antigüedad en la escala de la evolución.

Las divergencias evolutivas no tienen por qué ser reflejo necesariamente de distintas composiciones de bases. Si dos organismos tienen una gran semejanza en la composición de bases de su DNA sólo podrá tomarse como base firme que indique su afinidad genética y evolutiva cuando, además, compartan un gran número de propiedades fenotípicas, o sea, que se asemejen en su constitución genética (por ejemplo dos cepas diferentes que pertenecen a la misma especie). En tal caso, la casi identidad de composición de bases del DNA sí que aporta una base firme para apoyar la semejanza genética y evolutiva.

En bacterias el promedio en bases que integran el DNA es una característica de gran importancia taxonómica, dado el margen tan amplio de valores que se dan en este grupo.

El margen dentro de cada género es en general bastante pequeño (raramente, la variación es mayor de un 10 ó 15 %), aunque existe el caso contrario que a pesar de una gran semejanza fenotípica, no muestran semejanza genética.

4.2.1.2. b. - Secuenciación del RNAr 16S

La secuencia del 16S RNAr es polinucleotídica de aproximadamente 1500 bases y que funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de procariotas, la secuencia de donde se puede extraer información evolutiva (el equivalente en eucariotas es el RNAr 18S). Contiene secuencias signatura, que son oligonucleótidos cortos de secuencia definida en los RNAr 16S ó 18S, característicos de organismos concretos o de grupos de organismos relacionados filogenéticamente. Contiene también regiones conservadas y regiones variables, que son elementos que sirven para establecer las relaciones parentales.

La metodología de la secuenciación puede ser directa o indirecta:

- Análisis de la secuencia RNAr 16S directa:

Los extractos crudos se someten a una reacción con transcriptasa inversa y el método de secuenciación de los dideoxinucleótidos.

- Amplificación de los genes del RNAr, es decir el trozo de DNA que codifica el RNAr 16S, usando como moldes de la PCR, cebadores o primers que son moléculas generalmente oligonucleótidos que se obtiene sintéticamente y son complementarios de secuencias conservadas en el RNA. La amplificación mediante la PCR, del DNA que codifica el RNAr requiere menos material celular que la secuenciación directa del RNAr y es más rápida y adecuada que el método directo cuando se realizan estudios a gran escala. El DNA amplificado es una cadena monohebra, por lo que se puede secuenciar directamente usando el método de secuenciación del dideoxido o método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Los arboles filogenéticos se obtienen a partir de las matrices de distancia, de la secuencia de RNA. Se alinean dos o más secuencias de RNAr y se calcula una distancia evolutiva (E_D) registrando en un ordenador el número de posiciones en la secuencia que ambos difieren, se introduce un factor de corrección estadística para compensar la posibilidad de que, a través de los diferentes cambios que puedan haberse producido, se obtenga de nuevo la secuencia inicial. La matriz de distancias evolutivas, generada a partir de la comparación de secuencia, se analiza luego mediante un programa informático diseñado para producir árboles filogenéticos a partir de las medidas de E_D . Esto equivale a examinar todas las posibilidades de ramificaciones para el conjunto de distancias comparadas, y disponer luego las longitudes de las ramificaciones para ajustar los datos de la mejor manera. La E_D que separa dos organismos es directamente proporcional a la longitud total de las ramas que los separan.

4.2.1.2. c. - Hibridación DNA-DNA

Mediante esta técnica se determina la similitud a nivel de especie entre dos cepas bacterianas, de ahí su gran importancia dentro de las técnicas de identificación bacteriana (Stackebrandt *et al.*, 1994).

La estructura y las propiedades fisicoquímicas propias del DNA han permitido el desarrollo de técnicas genéticas de gran utilidad en bacteriología. El DNA nativo es de doble hélice, se puede desnaturalizar térmicamente. Si una disolución se enfría rápidamente las cadenas permanecen separadas. En las disoluciones que se mantienen a una temperatura de 10 a 30° C por debajo de la T_m, tiene lugar una reasociación específica de cadenas complementarias, formándose moléculas de doble cadena. Siempre hay algo de apareamiento al azar, pero como un dúplex emparejado al azar contiene numerosos pares de bases que no forman doble cadena, la estabilidad térmica resulta baja y las cadenas se separan muy rápidamente a temperaturas próximas a la T_m, sólo permanecen aquellos dúplex entre cadenas con un elevado grado de complementariedad.

Al mezclar preparaciones de DNA procedentes de dos cepas bacterianas relacionadas se forman moléculas híbridas de DNA, lo que significa la base de un planteamiento totalmente nuevo para el estudio de la semejanza genética en las bacterias.

Los experimentos de reasociación DNA-DNA in vitro permiten evaluar el grado total de homología genética entre dos bacterias. También es posible la asociación entre DNA uncatenario y cadenas de RNA complementario, por lo que se puede también estudiar la reasociación análoga DNA-RNA. Si las moléculas de RNA contiene RNAt o RNAr, se puede evaluar la homología genética de dos bacterias con respecto a fragmentos específicos y relativamente pequeños del genoforo: aquellos que codifican las secuencias de bases de los RNA de transferencia o de los RNA ribosómicos.

El fundamento de los métodos para medir el grado de reasociación de ácidos nucleicos es la formación de dúplex entre dos muestras de DNA desnaturalizado, una de ella marcada bien con marcaje radiactivo o inmunoenzimático que será a su vez detectado por medición posterior de la radiactividad o por un lector de ELISA. Siempre se necesita una misma cepa de referencia. A esta hibridación se le da arbitrariamente el

valor de 100, la reasociación del DNA de referencia y otros DNA heterólogos se expresa como porcentaje del valor correspondiente a la reasociación del DNA homólogo.

Los factores que influyen en la formación de moléculas bicatenarias son los siguientes: temperatura, la fuerza iónica del diluyente y el tamaño medio de los fragmentos de DNA. Hay que ajustar o estandarizar estos factores, y después la reasociación viene influida únicamente por la concentración de DNA y el tiempo de incubación.

La temperatura es el factor de mayor importancia, debe de estar siempre por debajo de la Tm del DNA de referencia. Existen temperaturas restrictivas, 10 ó 15° C por debajo de la Tm, en las que solo las cadenas complementarias con un grado muy elevado de homología pueden formar dúplex estables.

Estudios preliminares de identificación básica, nos encuadraron las bacterias objeto de estudio dentro del género *Bacillus*, género de gran heterogeneidad genética, cuya taxonomía ha ido evolucionando con el avance de las técnicas genéticas. A continuación hacemos un resumen de esta evolución.

4.2.1.3.- Taxonomía del Genero *Bacillus*

Son eubacterias Gram-positivas formadoras de endosporas (Smith *et al.*, 1952). Las bacterias formadoras de endosporas se reproducen todas por fisión binaria transversal y , con escasas excepciones, tienen forma bacilar. La reacción de Gram es positiva si se determina sobre células en crecimiento exponencial; sin embargo, muchos formadores de esporas se convierten en gram-negativos rápidamente después de entrar en la fase estacionaria. La movilidad está extendida, y se efectúa por flagelos peritricos. Son aerobios o anaerobios facultativos. La morfología colonial es muy variable, presentando pigmentación en determinados medios. Exhiben una amplia diversidad de capacidades fisiológicas: psicrofilas-termófilas, la mayoría son mesófilas. También hay especies del género *Bacillus* acidófilos-alcalófilos y algunas cepas son halotolerantes y otras presentan requerimientos de sales.

Las bacterias formadoras de endosporas son quimioheterotróficas; el catabolismo de compuestos orgánicos tiene lugar por respiración aerobia , respiración anaerobia con nitrato o fermentación. Algunas, pero no todas, requieren factores de crecimiento. La mayoría de las especies están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y no necesariamente relacionadas con su hábitat natural por la distribución pasiva y persistencia de las endosporas.

La especie tipo es *Bacillus subtilis* (Cohn 1872, 174). El desarrollo de la genética de *Bacillus* con la demostración de la susceptibilidad de transformación de la especie *B.subtilis* (Spizizen. 1958) avanzó rápidamente, habiéndose secuenciado hasta el momento el genoma completo de *B.subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) con la participación de numerosos autores.

En la actualidad la situación de la taxonomía de *Bacillus* refleja una amplia diversidad en este género (Forsyth *et al.*, 1998).

El contenido de G+C del DNA del género *Bacillus* es 32-69% , varía en un intervalo mayor a un 30%, lo cual indica que el género es heterogeneo genéticamente. El menor porcentaje corresponde a la especie *B.cereus*, 32% y el mayor a *B.thermocatenulatus*, 69%.

Desde una perspectiva histórica, en la taxonomía del género *Bacillus* se describe una primera clasificación, basándose en criterios morfológicos, de movilidad y esporulación(Cohn, 1876). En la segunda clasificación, a través del Manual Bergey, Winslow *et al.*, en 1920 definieron la familia *Bacillaceae* como bacilos productores de endosporas, Gram positivos con flagelos peritricos y que poseían un sistema enzimático proteolítico, aerobios, la mayoría saprofitos, hidrolizaban la gelatina y formaban colonias rizoides.

Los trabajos de Smith, Gordon y Clark (Clark, 1937; Smith et Clark, 1937; Gordon, 1940 a y b; Smith *et al.*, 1946; Smith *et al.*, 1952), establecieron nuevas técnicas y pruebas para la identificación del género *Bacillus*, en los que se discutían las

diferencias entre mesófilos y termófilos, según exigencias nutricionales. Estos datos se encuentran recogidos en la 7ª edición del Manual Bergey (Breed *et al.*, 1957).

Posteriormente, (Gibson et Gordon, 1974), se relizaron distintas recopilaciones entre las que se describen los *Bacillus* psicrófilos (Larkin et Stockes, 1967), además se incluye un método numérico en la 8ª edición del Manual Bergey (Gibson et Gordon, 1974). En 1980, se aprueba la lista oficial de nomenclatura bacteriana, que incluye el género *Bacillus* y está publicada en el International Journal of Systematic Bacteriology (Skerman *et al.*, 1980).

La taxonomía numérica supuso un avance en la separación de especies del género *Bacillus*. En los años ochenta se realizó una reclasificación radical incluyendo la descripción de 32 especies nuevas. Los progresos en técnicas genéticas han permitido un reagrupamiento de 146 especies consideradas diferentes desde 1939 (descritas en las ocho ediciones del manual Bergey), en 22 especies en 1974, permitiendo además la descripción de especies nuevas.

Los estudios del RNA ribosómico 16S (Fox *et al.*, 1977, 1981; Stackebrandt *et al.*, 1987), confirman la heterogeneidad del género *Bacillus*. En la última edición del Manual Bergey (Sneath *et al.*, 1986) se describen 41 especies y algunas semiespecies inciertas. La subdivisión del genero se hace necesaria y se realiza atendiendo a los criterios basados en el 16SRNA (Fox *et al.*, 1992; Stackebrandt et Goebel, 1994). No obstante, no se pueden considerar como datos conclusivos los estudios del RNA ribosomal por sí solos (Clayton *et al.*, 1995).

Los avances informáticos y la técnica de determinación del RNAr 16S, de importancia reciente, han permitido que el género *Bacillus* se subdivide en numerosos géneros, haciendo una reestructuración de algunas especies ya descritas, del género *Bacillus* dentro de los nuevos géneros: *Bacillus*, *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993, Shida *et al.*, 1997 a, b); *Brevibacillus* y *Aneurinibacillus* (Shida *et al.*, 1996) , ambos están muy próximos filogenéticamente y el género *Alicyclobacillus* (Wisotzkey *et al.*, 1992), el género *Halobacillus* (Spring *et al.*, 1996), *Amphibacillus* y *Virgibacillus*

(Heyndrickx, M. *et al.*, 1998). *Gracilibacillus* y *Salibacillus* (Wainç *et al.*, 1999), *Coprobacillus* (Kageyama & Benno, 2000).

4.3. – Objetivos

Planteamiento y justificación de objetivos:

Se han estudiado diez cepas que fueron preseleccionadas en un trabajo previo (Guerra, 1999) a partir de un total de 60 cepas aisladas de un compost tratado con alpechín. Dichas cepas fueron sometidas a presión selectiva de crecimiento en concentraciones crecientes de alpechín.

La capacidad de crecer y de producir exopolisacárido al 100% (v/v) de alpechín constituyó la base de la selección de las cepas con interés biotecnológico para su caracterización como paso previo a otros análisis experimentales posteriores, tales como la genética del exopolisacárido, que se desarrolla en los siguientes capítulos de la presente memoria.

En la Figura 4.1 se muestra la capacidad que presentaron las diez cepas para crecer al 100% (v/v) de alpechín, así como su capacidad de producción de biopolímero polisacárido (EPS) y su productividad específica; pudiendo resaltar las cepas CP-38 y CP-50 por ser las de mayor productividad específica respecto al total de las cepas estudiadas.

Productividad específica de EPS a concentración de alpechín de 100% (v/v)

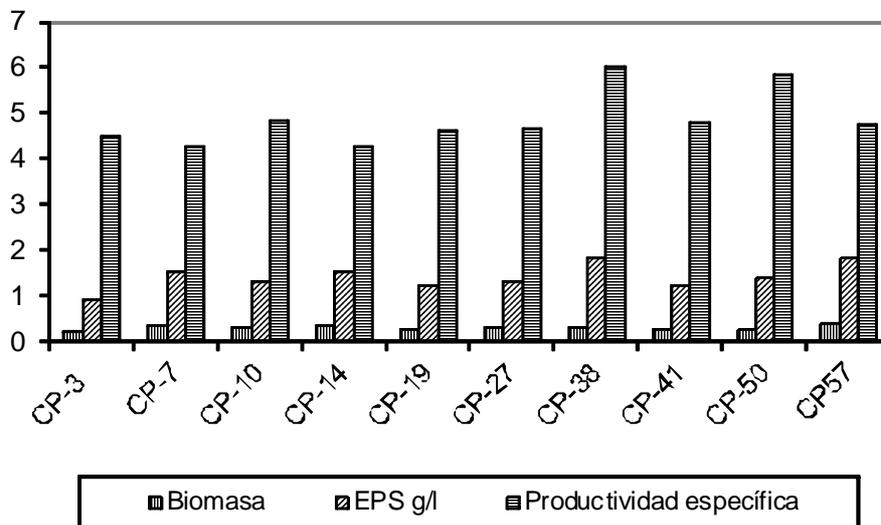


Figura 4.1. Producción y Productividad específica del EPS producido por las diez cepas crecidas a una concentración de alpechín del 100% (v/v).

Los resultados preliminares de caracterización taxonómica básica realizados en un trabajo previo (Guerra, 1999) encuadraron a las diez cepas dentro del género *Bacillus*.

El género *Bacillus* se considera muy heterogéneo genéticamente, hecho demostrado por su amplio intervalo en composición de bases, entre el 32% y el 69% moles de G+C. Los avances informáticos y la técnica de determinación del RNAr 16S, de actual importancia, permiten situar los microorganismos a nivel de género, tomando como referencia el mayor número de géneros descritos hasta el momento mediante un alineamiento local de secuencias (BLAST, Astschul *et al.*, 1997), lo que permite comparar una secuencia con las que hay depositadas en las bases de datos. Esto puede constituir un arma de doble filo y llevar a conclusiones rápidas y/o erróneas que requieren una revisión precisa, ya que el control de acceso y depósito de secuencias no está controlado de forma exhaustiva.

Los métodos de hibridación DNA-DNA son de relevancia taxonómica (Stackebrand, *et al.*, 1994), con ellos se ha llegado a establecer relaciones entre los

microorganismos a nivel de especie bacteriana (Priest *et al.*, 1981). La descripción de especies ha ido evolucionando a lo largo del tiempo desde la utilización de las características fenotípicas exclusivamente, a otros caracteres más estables, por ejemplo quimiotaxonómicos con la utilización de espectrometría de masas (Shute *et al.*, 1988), electroforesis de proteínas (Kerstens *et al.*, 1980) o patrones enzimáticos (Baptist *et al.*, 1978). Aunque los progresos realmente espectaculares en la clasificación de microorganismos se han producido con las metodologías basadas en técnicas genéticas.

La especie procariota está circunscrita por la combinación de un buen número de caracteres independientes, tanto fenotípicos como genotípicos. Siendo lo que entre microbiólogos se conoce como una especie polifásica, que es un sinónimo inadecuado del concepto fenético o politético de especie.

Por tanto, para la definición de una especie bacteriana nueva es necesario disponer, al menos, de un fenotipo identificativo del grupo de cepas en cuestión, del grado de similitud genómica interna y con cepas tipo de las especies más cercanas, así como disponer del grado de oscilación interno del porcentaje G+C. Al utilizar la secuencia del RNAr 16S podemos conocer la posición de los organismos en un esquema de relaciones genealógicas, así como identificar cuáles son los taxones más cercanos. La descripción ideal es aquella que se realiza con un número significativo de cepas, y en la que se aporta el mayor número de datos posibles, tanto fenotípicos como genotípicos, quedando patente que este grupo se trata de una unidad coherente, aislada del resto de organismos conocidos.

Basándonos en estas indicaciones y averiguaciones en constante desarrollo y cambio, sobre todo en el ámbito genético, hemos realizado un estudio polifásico, planteándonos el objetivo de **caracterizar taxonómicamente a nivel de especie** las cepas seleccionadas por nuestro grupo de trabajo como productoras de EPS a partir de alpechín, para lo cual abordamos secuencialmente los siguientes apartados:

1.- Estudio fenotípico de las cepas bacterianas seleccionadas objeto de estudio.

2.- Estudio taxonómico-numérico básico comparativo con los datos fenotípicos de 34 cepas de *Bacillus* descritas en el manual de Sistemática Bacteriana Bergey (Sneath et al. 1986).

3.- Determinación de la composición de bases del ADN de las cepas bacterianas objeto de estudio.

4.- Determinación de las distancias evolutivas filogenéticas con especies del grupo *Bacillus* a través de estudios del RNA ribosómico 16S .

5.- Hibridación DNA-DNA entre las cepas objeto de estudio y con las cepas más próximas según el estudio taxonómico numérico, la composición de bases y estudio filogenético.

4.4. – Material y Métodos

4.4.1. - Cultivos Bacterianos y Técnicas Microbiológicas

4.4.1.1. - Cepas Bacterianas y Plásmidos.

Las cepas bacterianas objeto de estudio, junto a cepas de colección están representadas a continuación.

Tabla 4.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa bacteriana	Características relevantes	Referencia/Origen
Cepa B.1	Cepa CP-3 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.2	Cepa CP-7 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.3	Cepa CP-10 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.4	Cepa CP-14 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.5	Cepa CP-19 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.6	Cepa CP-27 Aislada de compost	Guerra 1999

Cepa B.7	Cepa CP-38 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.8	Cepa CP-41 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.9	Cepa CP-50 Aislada de compost	Guerra 1999
Cepa B.10	Cepa CP-57 Aislada de compost	Guerra 1999
<i>Bacillus firmus</i>	Cepa de colección	CCM 2213T
<i>Bacillus lentus</i>	Cepa de colección	CCM 2214T,
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Cepa de colección	CCM 2116T
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Cepa de colección	CECT 153
<i>E.coli</i> XL1Blue	Cepa de colección	-
Plásmido		
pGEMT (Promega)	Con colas de dT para clonar directamente productos de PCR	-

4.4.2- Medios de cultivo

Todas las cepas fueron crecidas en medio de cultivo YM-líquido o YM-sólido (Difco) según procediera. Para ver diferentes morfologías coloniales se adicionó al mismo medio YM-sólido un 0,005% del colorante azul de toluidina (Sigma). Para extraer el DNA en las cepas B.1-B.10, se disminuyó la relación C/N con el objetivo de que disminuyera la mucosidad, fueron así crecidos en TSA (Difco) y TSB (Difco) suplementado con 0,5% (P/V) de glicina. El medio LB era preparado (Bacto-Triptona 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, si procedía *Bacto-Agar 15g (Difco)), para el cultivo de cepas de *E.coli* utilizadas como cepas receptoras de los plásmidos recombinantes. El medio SOC se utilizó para favorecer el crecimiento de las cepas de *E.coli* electroporadas.

Los medios de cultivo específicos para las pruebas bioquímicas se prepararon según se describen en el manual de Sistemática bacteriana Bergey (Sneath *et al.*, 1986b).

Los medios de cultivo de las bacterias utilizadas para realizar los Api (Biomeriux) se realizaron según las indicaciones de los manuales comerciales.

4.4.3. Pruebas de identificación fenotípica

4.4.3.1. - Pruebas morfológicas:

4.4.3.1.a.- Características de cultivo:

- Morfología colonial

Se observó de cada cepa el aspecto, el borde, la consistencia, la forma, el tamaño y la pigmentación de sus colonias tras crecer en medio sólido YM tras incubación a $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ durante 48h.

Ensayo de crecimiento en un medio YM con Azul de Toluidina. Una vez preparadas las placas YM-Azul de toluidina se siembran en masa las distintas cepas, desde un preinóculo de YM-líquido de 24h, que se cultivan a 30°C durante 48 h.

- Determinación de fenotipos coloniales productores de diferentes exopolisacáridos.

- Ensayo de disolución en agua y fenol

Una vez crecidas las distintas cepas sobre placa de YM-sólido, se toma con un asa una parte proporcional de cada cultivo y se pone en 1ml de mezcla agua:fenol, se agita vigorosamente mediante vórtex y se analiza el aspecto de las dos fases transcurridos uno minutos.

- Crecimiento en medio líquido

Se observó el tipo de crecimiento en medio YM líquido tras incubación a $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ durante 48h. Se observaron características tales como formación de velo en la superficie del medio, depósitos en el fondo, crecimiento homogéneo y turbidez.

4.4.3.1. b.- Estudio Microscópico:

La apariencia microscópica, se hizo sobre los cultivos jóvenes (18-24 h) crecido en medio YM líquido, con agitación de 150 r.p.m. para permitir una buena aireación, con incubación a $30^{\circ}\text{C}\pm 2$. Se realizaron la tinción de Gram, tinción de cápsulas, tinción de esporas y observación en fresco de todas las cepas.

- **La microscopía electrónica de transmisión** se utilizó para examinar la morfología celular de las cepas B.7 y B.3, diferentes en cuanto al fenotipo mucoso de sus colonias, su tamaño y el EPS que se tiñe específicamente con Rojo Rutenio.

Para dicho propósito el microorganismo se hizo crecer en el mismo medio de cultivo líquido descrito para el mantenimiento y conservación e incubada a 30°C durante 48 horas en agitación a 100 rpm. Los cultivos fueron remitidos al Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, donde se procesaron para su posterior observación por microscopía electrónica de transmisión. Se observaron, estudiaron y fotografiaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss 902 a 80 Kv.

4.4.3.2.-Pruebas fisiológicas:

- **Crecimiento a diferentes temperaturas.-** Se observó la viabilidad de los microorganismos diariamente y tras incubación a las temperaturas de 5, 10, 30, 40, 50, 55 y 65°C con una oscilación máxima de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Las lecturas de los cultivos se realizaron después de 3 días a 55°C o temperatura más alta, después de 5 días a $30-50^{\circ}\text{C}$, después de 14 días a 20°C y 25°C y después de 21 días a temperaturas menores de 20°C .

- **Crecimiento en anaerobiosis.-** Se realizó en tubos con medio sólido YM con un inóculo al que se le agregó el mismo medio en sobrefusión. Se observó el crecimiento y el desplazamiento del medio por el gas producido en el metabolismo de la bacteria.

- **Crecimiento a diferentes pH.**- Se determinó el crecimiento de cada cepa en medio YM líquido a los pH siguientes: 5, 5.7, 6, 6.8, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Los tubos fueron incubados durante 3 días con agitación de 150 r.p.m y 30±2°C.

- **Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl.**- Sobre el medio de crecimiento YM líquido se adicionaron las siguientes concentraciones de sal: 2, 5, 7 y 10 %. Se observó el crecimiento a los 10 días de incubación a 30±2°C.

4.4.3.3. - Pruebas Bioquímicas:

- Las pruebas bioquímicas fueron realizadas de acuerdo a Claus & Berkeley, 1986, incluimos la producción de catalasa, las pruebas de la oxidasa, Voges-Proskauer, formación de ácidos y gases a partir de diferentes carbohidratos, hidrólisis de la caseína (Skim-Milk^{DIFCO}), hidrólisis de la gelatina, hidrólisis del almidón. La utilización de citrato (Simmons), reducción de nitrato a nitrito, formación de Indol, rojo de Metilo. Los requerimientos de NaCl o KCl, y el crecimiento en presencia de un 10% de lisozima (Sigma).

Con estas pruebas realizamos un somero estudio de taxonomía numérica, comparando estos resultados con los de las distintas cepas de referencia del género *Bacillus* contenido en el Manual Bergey's, para valorar sus propias similitudes y disimilitudes entre las cepas de referencia.

Otras pruebas adicionales fueron realizadas a las cepas B.3 y B.7 para conocer si existían diferencias en la utilización y producción de gases a partir de sustratos como única fuente de carbono, que fueron realizadas con el sistema API 50CHB (Biomeriux) utilizando *P. polymyxa* como cepa control. Completamos este estudio diferencial con características contenidas en el sistema API 20E (Biomeriux).

4.4.4. Taxonomía numérica.

Comparamos algunos de los resultados de las pruebas de identificación fenotípica de las cepas objeto de estudio y 34 cepas de referencia del género *Bacillus* (Sneath, 1986), para obtener un primer resultado de similitudes orientador.

El análisis de los datos fue realizado utilizando el programa **Taxan 2.0** para Taxonomía numérica desarrollado por el Instituto de Biotecnología de Maryland, Estados Unidos. El coeficiente de correlación cofenética, fue obtenido de acuerdo a Sneath y Sokal (1973).

Procesamiento de los datos. Cada cepa estudiada, se refiere a una unidad taxonómica operacional (OTU), las características de los OTU fueron descritas como binarias en la naturaleza, la presencia o ausencia de un atributo es un ejemplo de dato binario. El coeficiente de correlación utilizado fue el de MICHENER y SOCAL, que incluye tanto las concordancias positivas como las negativas, S_{SM} (Sokal y Michener, 1958). Para el análisis de agrupación se utilizó la técnica de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Mean Average ó acoplamiento promedio binario contrapesado), (Sneath y Sokal, 1973).

Una matriz de distancia o similaridad puede ser agrupada e interpretada por el programa informático TAXAN. Las agrupaciones pueden ser interpretadas desde el dendrograma o el triángulo de similaridad producido en la agrupación.

Codificación de los datos. El número de OTUs son 44 y las pruebas realizadas y que han formado parte del análisis de taxonomía numérica son 33 en total, presentadas en la tablas 4.2 y 4.3; no hemos considerado otras que presentaban resultados idénticos para todas las cepas estudiadas porque indicaban caracteres no discriminatorios (Sneath y Sokal, 1973).

Tabla 4.2. Cepas de referencia utilizadas en taxonomía numérica

1.B.subtilis	10.B.circulans	19.B.lentus	28.B.polymyxa
2. B.acidocaldarius	11.B.coagulans	20.B.licheniformis	29.B.popilliae
3. B.alcalophilus	12.B.fastidiosus	21.B..macerans	30.B.pumilus
4.B.alvei	13.B.firmus	22.B.macquariensis	31.B.schlegelii
5.B.antracis	14.B.globisporus	23.B.marinus	32.B.sphaericus
6.B.azotoformans	15.B.insolitus	24.B.megaterium	33.B.stearotermophilus
7.B.badius	16.B.larvae	25.B.mycoides	34.B.turingiensis
8.B.brevis	17.B.laterosporus	26.B.pantothenticus	35. B.3
9.B.cereus	18.B.lentimorbus	27.B.pasteurii	36. B.9

Tabla 4.3. Características fenotípicas para taxonomía numérica*

*Diámetro de la célula > 1.0µm	*Utilización de Citrato
*Esporas redondas	*Reducción de nitrato a nitrito
*Esporangio hinchado	*Formación de Indol
*Catalasa	*Voges-Proskauer
*Cristales parasporales	*Crecimiento anaeróbico
*Requerimiento de NaCl o KCl	*Crecimiento en NaCl 2% 5% 7% 10%
*Formación de ácidos D-glucosa L-arabinosa D-xilosa D-manitol	*Crecimiento a 5°C 10°C 30°C 40°C 50°C 55°C 65°C
*Hidrólisis de: Caseína Gelatina Almidón	*Crecimiento a Ph 6.8 5.7
*Formación de gas de la glucosa	*Crecimiento en lisozima

4.4.5.- Descripción taxonómica molecular.

4.4.5.1.- Extracción de DNA:

Previa realización de las determinaciones genotípicas extrajimos DNA cromosómico de las bacterias según el método de Marmur, 1961.

Se extrajo DNA por este método a las cepas B1-B10, *B.circulans*, *B.firmus*, *Br.laterosporus*, *B.lentus*, *P.polymyxa*.

Este método fue modificado en el presente estudio para aplicarlo a bacterias Gram-positivas que además son productoras de EPS, se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

Partimos de 200 ml de cultivo en fase exponencial (D.O a 600nm = 0,5 - 1) crecido en TSB + Gly al 0,5%. Se centrifugó para obtener el sedimento de células a 9000rpm/15 minutos en una centrífuga Sorvall RC 5B utilizando frascos de 250 ml

(Sorvall). Se lavó con 20ml GTE pH 8.0 (Glucosa-Tris-EDTA) , este paso se puede repetir dos veces. Centrifugamos en las mismas condiciones anteriores, se añadieron 20 μ l de Lisozima (Sigma) de una concentración de 50 mg/ml y se incubó a 37°C / 2 horas, observar si se ha producido lisis (+ transparencia). Se añade SDS del 25% para conseguir una concentración final de 2,5% y se incubó a 60°C/ 10-15 minutos. Enfriamos en hielo y añadimos Perclorato Sódico 5M hasta conseguir una concentración final de 1M . Se añadió cloroformo / Alcohol Isoamílico en la Proporción 24:1 se agitó a 37°C durante 15 minutos, se dejó unos minutos para que se separasen las fases y se centrifugó a 7000 rpm/ 15 min, se recogió la fase superior y se precipitó el DNA añadiendo 0,1 volumen de Acetato Sódico 3M, pH 5.2 y 0,56 volúmenes de Isopropanol, se recogió el DNA precipitado con varilla de cristal y se resuspendió el DNA en 4ml de 0,1x SSC (Citrato sódico), se llevó a una concentración final de 1x SSC añadiendo SSC 20X y se incubó con RNAsa (Ribonucleasa-A) 60 μ g/ml a 60°C /2 horas, se añadió una punta de espátula de Proteinasa K o 50 μ l de de una concentración de 10 mg/ml, se añadió Cloroformo/Alcohol Isoamílico en la proporción 24:1. Se agitó a 37°C durante 15 minutos y se dejó unos minutos para que se separasen las fases y se centrifugó a 7000 rpm/ 15 min.

Se recogió la fase superior y se precipitó el DNA añadiendo 0,1 volumen de Acetato Sódico 3M, pH 5.2 y 0,56 volúmenes de Isopropanol. Se recogió el DNA precipitado con varilla de cristal, se resuspende en agua destilada 0,5 ml.

- Purificación del DNA

Para la técnica del G+C, o sea, para la determinación del contenido de Guaninas y Citosinas y para la técnica de hibridación se necesita un alto grado de pureza del DNA para lo cual aplicamos el siguiente protocolo.

Partimos de una disolución de DNA de 500 μ l . Añadimos 250 μ l de fenol y 250 μ l de la mezcla cloroformo:isoamílico en la proporción 24:1. Centrifugamos durante 5 min. a 13000 r.p.m. Se forman dos fases separadas por una interfase, que dependiendo de su limpieza se repite los pasos anteriores hasta conseguir una interfase limpia. Añadimos RNAsa (Ribonucleasa A–Sigma) (6 μ l de una concentración de 10 mg / ml -), e incubamos a 60°C durante 2 h. Añadimos Proteinasa K(Boeringer N°cat.84437023-

65) (6,5 μ l de una concentración de 10 mg/ml-), e incubamos a 37 °C durante 1 h. Añadimos 500 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico en la proporción 24:1. Centrifugamos a 13000 rpm durante 5 min. y recogemos el sobrenadante donde está disuelto el DNA. Precipitamos el DNA con 0,1 volumen de Acetato Sódico 3M , pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto purísimo. Se deja toda la noche a - 20°C y se centrifuga durante 15 min a 13000rpm, se tira el sobranadante y se lava con 500 μ l de etanol del 70 %. Descartar el etanol y dejar secar durante 20 minutos a 55 °C o bien en el desecador de vacío. Según la cantidad de precipitado de DNA se resuspende en 500, 100 ó 50 μ l de H₂O milliQ. Finalmente se cuantifica y se mide la pureza por espectrofotometría.

- Cuantificación y cálculo de la pureza del DNA.

La cuantificación de DNA y la determinación de la pureza del DNA genómico bacteriano extraído se calculó por Espectroscopía de Absorción. Mediante medida de D.O a 260 nm en el Biofotómetro de Eppendorf. Modelo, seleccionando la opción de ds-DNA, expresando sus unidades en μ g/ml. El índice D.O 260nm/D.O 280nm son indicativos de la pureza de los ácidos nucleicos, debe ser igual o superior a 1.8. La D.O a 325 nm es indicativa de las partículas en suspensión y de la suciedad de la cubeta. La D.O a 230 nm es indicativa de los contaminantes con enlaces peptídicos y grupos aromáticos como son el fenol y algunos residuos de las proteínas.

4.4.5.2.- Determinación del contenido en Bases Guaninas-Citosinas (mol % G+C). Técnica del G+C(Tm)

Se determinó la cantidad de Citosinas y Guaninas que hay en el DNA genómico por el método de Marmur y Doty, 1962.

Se determinaron los valores de G+C experimentales de las diez cepas B.1-B.10 y de cinco cepas bacterianas de referencia, que tienen un grado de similitud por taxonomía numérica superior al 70% y cuyo G+C teórico no varía en \pm 5 % del de las cepas B.7 y B.3. Incluyendo una cepa de referencia, *Escherichia coli* en cada

experimento para asegurar que todos los parámetros externos eran correctos. De cada cepa se realizan 4 ensayos y después se obtiene la media \pm desviación estándar.

Para el análisis espectrofotométrico se utilizó el equipo Spectrophotometer Lambda 3B, Recorder R 100 A- Perkin-Elmer, USA y las cubetas de cuarzo (Hellma 115F-QS) de 0,5 ml de volumen y con tapón hermético para evitar la evaporación de la muestra.

El DNA debía estar cuantificado; se tomó un volumen en μ l, que disuelto en un volumen final de 500 μ l de SSC al 1x (el tampón utilizado es 0,15 M de NaCl; 0,015 M de citrato de sodio) diera un valor de absorbancia de 1.000. Se ajustó el cero del espectrofotómetro con una disolución de SSC. La variación de temperatura se estableció en 1° C/ min. La velocidad con que registra los cambios de absorbancia se establece en 5mm/min. (SPD). El RNGE =1000 mV.

- Análisis de la curva de G+C y tratamiento de datos:

La curva debía cumplir unos requisitos de forma que asegurara que el proceso de desnaturalización se llevó a cabo correctamente. A modo de ejemplo ponemos la curva de desnaturalización del DNA de *Escherichia coli* cepa de referencia.

Para calcular el porcentaje de G+C se determinó la temperatura de fusión (T_m) para cada curva. La T_m es la temperatura donde el 50% de las moléculas de DNA se encuentran desnaturalizadas, se corresponde con el punto medio de la curva. Una vez calculadas las temperaturas de fusión se calculó el porcentaje G+C con la siguiente expresión:

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\text{mol \% G+C})$$

4.4.5.3.- Secuenciación y análisis del gen del RNA ribosómico 16S

Metodología Indirecta:

El primer paso fue extraer y purificar DNA de las bacterias a las cuales se le quería realizar la secuenciación de su DNAr 16S. Una vez obtenido y purificado el DNA de las cepas B.7 y B.9 se procedió a realizar las siguientes técnicas:

- **Amplificación del fragmento de DNAr 16S, por PCR, mediante los oligonucleótidos específicos.**
- **Secuenciación de dicho fragmento una vez purificado, por el método de Sanger,1977.**
- **Análisis filogenético basado en las secuencias del gen del RNAr 16S.**

- **Amplificación del fragmento de DNAr 16S**

Se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos o cebadores específicos del gen del 16S RNAr de eubacterias que se denominan **16F27** y **16R1525** (Ziemke,1998) y que fueron sintetizados por Pharmacia Biotech. La temperatura de la reacción de polimerización en cadena fue de 55° C. Se realizó en el termociclador DNA Thermal cycler, modelo 480 de Perkin Elmer.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de 1,7 % de agarosa con 10 μ l de muestra para observar el resultado, junto con una cantidad de marcador fija. Se pudo determinar la existencia del producto de PCR y también su pureza y cantidad aproximada según la intensidad de las bandas del marcador comparativamente.

El producto de PCR que nos interesaba era del orden de las 1500 Pb. Si además de este producto se observa arrastre de DNA hay que purificar dicha banda, bien mediante una columna (QIA PCR CLEAN) o por el método clásico de agarosa LMP(low melting point) o pasando la mezcla a través de columnas de Microcon-100 (Amicon).

- Secuenciación del fragmento obtenido por PCR una vez purificado.

Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación del DNAr 16S para eubacterias son los llamados **16F357**, **16R519** y **16F945** (Fox *et al.*, 1992). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Pharmacia Biotech.

Los DNA 16S purificados fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del centro López-Neyra utilizando un secuenciador de DNA modelo ABI 373 Stretch Applied Biosystems, siguiendo el protocolo recomendado para la secuenciación cíclica por Polimerasa AmpliTaq[†] FS y terminadores (dideoxinucleótidos) marcados con colorantes fluorescentes (Kit ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequency Ready Reaction de Perkin Elmer), de acuerdo al método de Sanger *et al.*, (1977). Las secuencias fueron analizadas por los programas ABIPrism™ 373xl Collection 2.0 y Sequencing Analysis 3.3 en un Macintosh G3.

Tabla 4.4. Oligonucleótidos RNA ribosómico 16S

Cebador	Secuencia (Orientación 5'-3')	Tm/Posición de union
16SF27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Amplificación Saiki <i>et al.</i> 1988
16SR1525	5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'	
16SF357		Secuenciación Fox <i>et al.</i> , 1992 Lane, 1991
16SR519		
16SF945		

- Análisis filogenético basado en las secuencias del gen del RNAr 16S

Para el análisis filogenético comparativo de las cepas B.7 y B.3 se utilizaron las secuencias del gen del RNAr 16S de los *Bacillus* incluidos en el estudio taxonómico numérico, todas las especies descritas hasta el momento del género *Paenibacillus* y *Bacillus* representativos de los nuevos grupos (*Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Brevibacillus*, *Amphibacillus*, *Halobacillus*, *Gracilibacillus* y *Coprobacillus* descritos en bibliografía (Forsyth G. 1998). Los datos de las secuencias están recogidos en la tabla 4.5., fueron obtenidos desde las bases de datos mediante su nº de acceso.

Tabla 4.5. N° de acceso a los RNAr 16S de las especies comparadas con B.3 y B.7

Especie bacteriana	N° Colección	N° Acceso-Base de datos
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	DSM3923	X60743
<i>Amphibacillus xylanus</i>	JCM7361	D82065
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	NCIMB 10056	X60645
<i>Bacillus lentus</i>	IAM 12466	D16272
<i>Bacillus subtilis</i>	NCDO 1769	X60646
<i>Bacillus firmus</i>	NCIMB 9366	X60616
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	IAM 12465	D16271
<i>Coprobacillus cateniformis</i>	NCIMB 9251	AB030218
<i>Gracilibacillus halotolerans</i>	-	AF036922
<i>Halobacillus halophilus</i>	NCIMB 9251	X62174
<i>Lactobacillus lactis</i>	DSM 20072	M58823
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	DSMZ5051T	D78465
<i>Paenibacillus alvei</i>	ATCC 6344	X57304
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	JCM7540	D85396
<i>Paenibacillus apiarius</i>	NRRL NRS-1438	U49247
<i>Paenibacillus azotofixans</i>	ATTC 35681	X60608
<i>Paenibacillus chibensis</i>	NRRL B-142T	D85395
<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	DSMZ5051T	D82064
<i>Paenibacillus curdlandolyticus</i>	IFO15724T	D78466
<i>Paenibacillus durum</i>	DSM 1735	X77846
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	DSMZ5188	D88514
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NRRL NRS-1356T	D85397
<i>Paenibacillus kobensis</i>	IFO15729T	D78471
<i>Paenibacillus larvae</i>	ATCC 9545	X60619
<i>Paenibacillus lautus</i>	NRRL B-142T	D78473
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	-	AF071861
<i>Paenibacillus macerans</i>	JCM2500	D78319
<i>Paenibacillus macquariensis</i>	NCTC 10419	X60625
<i>Paenibacillus periorae</i>	IFO15541T	D78476
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	IAM 13419	D16276
<i>Paenibacillus popilliae</i>	ATCC14706 ^T	AF071859
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	JCM7540	D88513
<i>Paenibacillus validus</i>	DSM3037	D78320

Se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias rDNA 16S de B.3 y B.7 mediante el programa Clustal w (Thompson *et al.*, 1994). Los valores de similitud de los rDNA 16S fueron calculados a partir de los alineamientos. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el programa Dnadist del paquete Phylip 3.5 (Felsenstein, 1989) con el modelo de Jukes & Cantor (1969). El árbol filogenético se construyó utilizando

el algoritmo de Fitch & Margoliash(1967), implementado en un programa informático. El árbol fue dibujado con el programa Treeview (Page, 1996).

4.4.5.4.-. **Hibridación DNA cromosómico-DNA cromosómico**

Para determinar el grado de similitud de DNA entre las cepas estudiadas y las cepas de colección descritas más próximas tanto por taxonomía numérica como por análisis filogenético se realizaron pruebas de hibridación utilizando la técnica propuesta por Ziemke *et al.*, (1998) la cual describimos a continuación.

Requisitos del DNA:

Se necesita DNA altamente puro, cuyo coeficiente de pureza sea ≥ 1.8 y de concentración $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en una cantidad total de $200 \mu\text{l}$.

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa 0.8% para ver las condiciones en las que está el DNA y ver su cantidad. Colocando en los pocillos $1 \mu\text{g}$ de cada muestra+ $2 \mu\text{l}$ de marcador del frente+agua en cantidad suficiente para $5 \mu\text{l}$ de volumen final.

Marcaje del DNA:

Se realiza mediante el Kit comercial de Nick-Translation (Boehringer N.Co.976776).

DNA.....	$0,5 \mu\text{g}$ (x μl)
H ₂ O.....	$10^{-7-x} \mu\text{l}$
Mezcla de dNTP*.....	$5 \mu\text{l}$
Tampón (10x).....	$1 \mu\text{l}$
Enzima.....	$1 \mu\text{l}$
Volumen final	$10 \mu\text{l}$

*Preparada previamente del Kit:

- 3 volúmenes de dATP
- 3 volúmenes de dGTP

3 volúmenes de dCTP

2 volúmenes de dTTP

1 volumen de dig-UTP: 0,75 digoxigenina+0,25 de biotina

La preparación de esta mezcla se hace manteniendo los reactivos siempre en hielo.

Se reúnen los volúmenes en la microcentrífuga.

Se incuban a 15° C / 90 min.

Se procede a la precipitación del DNA , adicionando 390 μ l H₂O milli-Q esterilizada y filtrada , se adicionan 45 μ l de Acetato de sodio 3M (0,1 volumen) y finalmente se añaden 890 μ l de etanol absoluto a -20°C(2 volúmenes).

Centrifugamos, lavamos con etanol del 70% , volvimos a centrifugar, descartamos el sobrenadante, secamos en estufa durante 10 min / 45° C y resuspendimos en 100 μ l de H₂O estéril.

Comprobación del marcaje:

Agregamos a los pocillos de las microplacas de ELISA (Streptavidin-Coated Microtiter Plates, Boehringer cat. 1645692) - Ensayo de inmunoabsorción ligado a un enzima. Enzyme linked immunoabsorbent assay. Inmunoensayo que usa anticuerpos específicos para detectar antígenos o anticuerpos en fluidos del cuerpo. Los complejos que se forman se observan mediante enzimas asociados al anticuerpo. Añadiendo sustrato al complejo enzima-anticuerpo-antígeno (Boehringer, cat 1093274) se obtiene un producto coloreado.

- 200 μ l de tampón fosfato a pH=6.8, 0.14 M y 0.2% de SDS.

- 5 μ l de Albúmina al 4%

- 1 μ l de DNA marcado desnaturalizado mediante calor a 100°C durante 5-10 min. Y pasándolo a hielo inmediatamente para evitar la renaturalización.

- Incubamos a Temperatura ambiente en agitación fuerte 450 rpm durante 1 hora.

Detección y Revelado del marcaje:

Detección:

- Se tira la solución de los pocillos.
- Se lava tres veces en tampón 1* y secar bien.
- Se agrega 200 μ l por pocillo de solución de detección*, que de preparación extemporánea.
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante a 450rpm.

Tampón 1:

NaCl.....0.15 M

Acido Maléico...0.1M

Ajustar a pH=7.5 con NaOH

Autoclavar a 121°C / 20 min.

Solución de detección:

5 ml de tampón 1

0,5% de Albúmina

1 μ l de Anti-dig (Antidigoxigenina-fosfatasa alcalina Cat. N°. 1093274

Boehringer)

La cantidad a preparar se calcula previamente (200 μ l por pocillo).

Revelado:

- Tirar la muestra de los pocillos.
- Lavar los pocillos 3 veces con tampón 1 y secar muy bien.
- Agregarle 250 μ l de solución “developer” o de desarrollo*.
- Leer en el lector de ELISA a una D.O de 405 nm.
- Incubar a 37°C / 30 min. y volver a leer la D.O.

***Solución de Desarrollo:**

5 ml de Coating buffer o Tampón de recubrimiento.

5 ml de H₂O milli-Q3.5 μ l de MgCl₂ 3M (0.1 mg/ml)

10 mg de PNPP (paranitrofenilfosfato = 1mg/ml) (Sigma, cat N-9389)

Se calcula la cantidad necesaria para preparar de acuerdo con el n° de pocillos (250 ml por pocillo).

Hibridación:

Se realiza a 30°C menos que la T_m.

1. En un tubo de PCR de capacidad 0.5 ml se mezclan:

4-12 μ l de DNA marcado

15 μ g de cada DNA

csp.....72 μ l de H₂O milli-Q

2. Desnaturalizamos a 100°C / 10 min. y ponemos en hielo inmediatamente para evitar la renaturalización.

3. Agregamos 28 μ l de tampón fosfato 1M*.

4. Ponemos a T_m-30°C durante 16 horas, para evitar la evaporación de la muestra se le pone unas gotas de aceite mineral a cada tubo.

*Tampón fosfato 1M:

1M de Na₂HPO₄

1M de NaH₂PO₄

H₂O milli-Q csp

pH = 6.8

Se preparan por separado las disoluciones ácidas y básicas, primero se adiciona la disolución ácida al matraz y después la disolución básica hasta alcanzar el pH, y finalmente completamos con agua hasta un volumen de 1litro.

Equilibrar la hidroxiapatita:

Un gramo de hidroxiapatita en 10 ml de H₂O milli-Q .

- Centrifugamos la cantidad necesaria de la hidroxiapatita a 13000rpm / 1 min.

- Descartamos el sobrenadante y agregamos 1ml de tampón fosfato 0.14 M al 0.2% de SDS, se mezcla con el agitador.

- Centrifugamos a 13000 rpm / 1 min. Y descartamos sobrenadante. Esta operación se repite dos veces más.

- Resuspendimos en 1ml de tampón fosfato 0.14M al 0.2% de SDS y agitamos para mezclar.

- Repartimos las alícuotas de 200 μ l, centrifugamos y decantamos el sobrenadante.(Depende del n° de muestras).

La hidroxiapatita a 0.14 M retiene las cadenas dobles de DNA y a 0,4 M las libera.

Purificación de las cadenas simples:

La muestra hibridada que está en 100 μ l a 0.28M de tampón fosfato, se agregan 100 μ l de H₂O milli-Q para obtener una concentración de **0.14M** de tampón fosfato.

De estos 200 μ l se toman 2 alícuotas de 50 μ l y se pasan a dos tubos eppendorf con hidroxiapatita equilibrada.

Mezclamos con el agitador y después incubamos durante 15 min. A T_m-35°C.

Centrifugamos a 13000rpm / 1 min. Y recuperamos los 50 μ l de sobrenadante(con cadenas simples d).

Volvemos a lavar la hidroxiapatita con 450 μ l de tampón fosfato de 0.14M/0.2% SDS. Se mezcla bien y se incuba a la T_m-35°C durante 5 min. Centrifugamos 1 min. y recuperamos el sobrenadante.

Volvemos a lavar con 500 μ l de tampón fosfato 0.14 M/0.2%SDS, mezclamos e incubamos a T_m-35°C / 5 min. Y centrifugamos , recogiendo después el sobrenadante.

Obtenemos de volumen final 1 ml de tampón 0.14M con las cadenas simples no hibridadas. Quedándose en la hidroxiapatita las cadenas dobles.

Purificación de las cadenas dobles:

A la hidroxiapatita que tiene unidas las cadenas dobles se le agregó:

- 200 μ l de tampón fosfato 0.4M, se agita para mezclar homogéneamente y centrifugamos a 13000rpm / 1 min.

- Recuperamos el sobrenadante en otro tubo, y volvemos a lavar con 200 μ l de tampón fosfato 0.4M, mezclamos, centrifugamos y recuperamos el sobrenadante.

El resultado es un tubo con 400 μ l de tampón fosfato 0.4M con las cadenas dobles hibridadas en disolución.

Desnaturalizamos las cadenas dobles a una temperatura de 100°C / 10 min. Y se pasan a un baño de hielo-agua hasta el momento de depositar en la placa de ELISA(evitar que las muestras se congelen).

En paralelo se realiza un patrón para ver cómo evoluciona el marcaje a través del tiempo.

Pusimos 4 μ l de DNA marcado con 800 μ l de tampón 0.14M a 0.2% de SDS. Tomamos 400 μ l de estos y los pasamos a un ependorf que contiene 400 μ l del mismo tampón y así sucesivamente hasta obtener 8 diluciones.

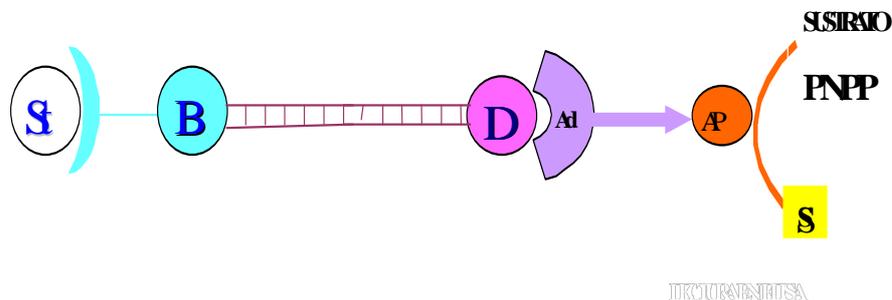
Se agrega albúmina al 0.1%.

Los valores obtenidos de estas muestras en el lector de ELISA nos servirán para realizar la curva patrón de la que se obtendrán los valores finales.

Colocación y lectura de las muestras en las placas:

Las microplacas que contienen “estreptoavidina” que se une específicamente a la Biotina que a su vez forma parte del DNA marcado también con Digoxigenina, mediante la detección y revelado se le une al DNA marcado la Antidigoxigenina+fosfatasa alcalina, que por la adición del sustrato específico de esta enzima, PNPP se obtiene un sustrato coloreado de amarillo que aumenta su color conforme el tiempo de reacción progresa, la intensidad del sustrato coloreado se puede medir en el lector de ELISA a una D.O de 405 nm.

Se colocaron en las placas 200 μ l de disolución con las cadenas simples, 200 μ l de disolución con las cadenas dobles, se colocan todas las muestras por duplicado y se intercalaron blancos que están constituidos por 200 μ l de tampón 0.14M / 0.2% de SDS.



- Una de las filas de la placa se ocupó con el patrón.
- Se le agregó albúmina a todos los pocillos para que quedara a una concentración final de 0,1% , o sea, agregamos 5 μ l de una disolución del 4%.

- Se mantuvo en agitación constante a 450 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente.

Pasamos al revelado, detección (igual que en los pasos anteriores) y lectura de la D.O en el lector que previamente debe ser programado según la colocación de los blancos.

Las lecturas de la placa se hicieron cada media hora, manteniéndolas a 37°C, hasta que el patrón se salga de los márgenes posibles del propio lector (Microplate Reader de Behring, modelo EL 311).

- Determinación de la concentración de DNA marcado utilizado como patrón

Para obtener la recta patrón del DNA marcado, que nos permitirá saber la concentración en *pg* de las cadenas simples y cadenas dobles de cada muestra, es necesario determinar los *pg* de DNA de la muestra patrón.

El DNA marcado que está a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se resuspende en 100 μl de agua desionizada. Por lo tanto por cada μl tenemos 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA, de esto se toman 4 μl y se diluyen en 800 μl de tampón fosfato 0,14 M para preparar la muestra patrón. Entonces, tenemos 0,02 μg (20 ng) de DNA marcado en 800 μl de tampón.

La primera dilución de la muestra patrón que contiene el DNA marcado queda entonces con una concentración de 0,025 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Finalmente, de ésta se toman 200 μl para depositar en los pocillos de la microplaca, por lo tanto la concentración real es de 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ lo que expresado en *pg* correspondería a 5000 *pg*. A partir de esta muestra se diluye a la mitad obteniéndose los valores siguientes.

- Cálculo de la concentración de DNA hibridado

Los valores de densidad óptica obtenidos en la microplaca deben convertirse en concentración de DNA expresada en *pg*. Para esto, se hace una recta de regresión con

los valores del patrón que contiene solo el DNA marcado. Con los valores de la recta se determina la concentración de DNA para cada muestra.

- Tratamiento de los datos de hibridación:

Los datos de las reasociaciones homólogas y heterólogas obtenidas por la lectura a 405 nm en el lector de ELISA, fueron procesados simultáneamente. El cálculo del porcentaje de las cadenas apareadas o grado de reasociación BR (Binding Ratio), se expresó como el porcentaje del DNA marcado liberado con 0,4M de tampón fosfato (cadenas dobles), comparado con el total de DNA marcado liberado (suma de cadenas simples y cadenas dobles). La tasa de unión relativa de DNA heterólogo (RBR) se expresó como el porcentaje de los heterólogos relativo al 100% BR que se debe al homólogo.

BR= $100 \times \frac{\text{DNA}^* \text{ total de cadenas dobles}}{\text{DNA}^* \text{ total cadenas simples} + \text{DNA}^* \text{ total cadenas dobles}}$

RBR= $100 \times \frac{\text{BR heterólogo}}{\text{BR Homólogo}}$.

4. 5. – Resultados

4.5.1.- Resultados de las pruebas fenotípicas:

4.5.1.1.- Clasificación fenotípica básica:

Tras la realización de pruebas fenotípicas básicas a las diez cepas seleccionadas, inicialmente todas quedaron incluidas dentro del género *Bacillus*, con las siguientes características: bacilos Gram variables, esporulados, catalasa positivo y oxidasa negativo.

Así mismo en la tabla 4.6. se describen las características fenotípicas comunes a las diez cepas seleccionadas.

Tabla 4.6. – Características fenotípicas de las 10 cepas estudiadas.

Prueba	Resultado
Forma celular:	Bacilo.
Colonia:	Mucosa, irregular.
Movilidad:	Positivo.
Tinción Gram:	Positivo en cultivos jóvenes.
Producción de endosporas:	Positivo.
Catalasa:	Positivo
Oxidasa:	Negativo.
Acido a partir de Glucosa:	Positivo.
Gas a partir de Glucosa:	Positivo.
Crecimiento en 5% de NaCl:	Positivo.
Hidrólisis de almidón:	Positivo.
Hidrólisis de caseína:	Positivo.
Hidrólisis de gelatina:	Positivo.
Utilización de citrato:	Negativo.
Test de Voges-Proskauer:	Negativo.
Formación de Indol:	Negativo.
Reducción de Nitrato:	Positivo.

4.5.1.2- Ensayos de solubilidad

Como prueba de caracterización se realizó un ensayo de solubilidad en agua y fenol de cada uno de los EPS producidos por las cepas seleccionadas (Tabla 4.7). Los resultados se compararon y confirmaron visualmente mediante crecimiento en YM-azul de toluidina, técnica que permite establecer claras diferencias entre las colonias de cepas productoras de EPS solubles en agua (morfología colonial blanca) e insolubles en agua (morfología colonial azul), tal como se muestra en la Figura 4.2.

Tabla 4.7.- Clasificación de las cepas seleccionadas en función de la solubilidad del exopolisacárido producido

Cepas con EPS insoluble en agua
Cepa B.1
Cepa B.2
Cepa B.3
Cepa B.5
Cepa B.6
Cepa B.8
Cepa B.10
Cepas con EPS soluble en agua
Cepa B.4
Cepa B.7
Cepa B.9

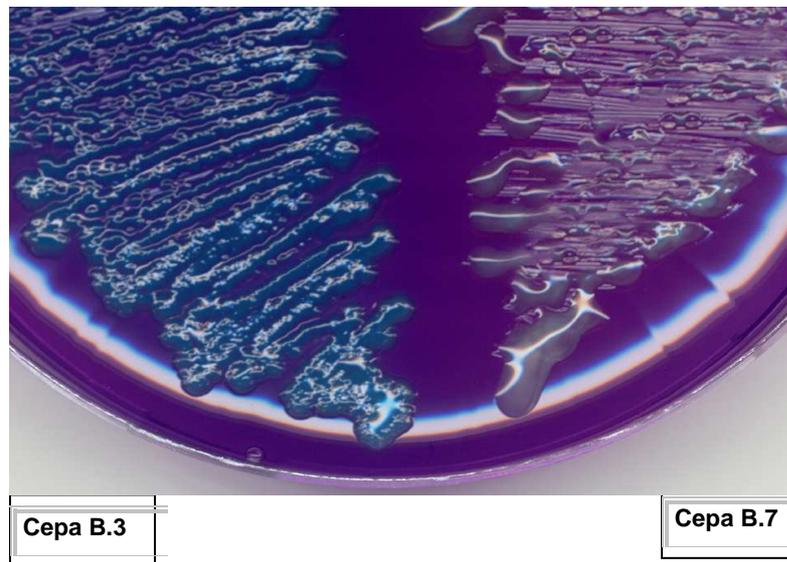


Figura 4.2.- Aspecto colonial diferencial de cepas productoras de EPS en medio YM-azul de toluidina.

Tras los resultados previos descritos anteriormente se seleccionaron las cepas B.3 y B.7, en representación de cada tipo de biopolímero, con el objetivo de realizar un estudio fenotípico completo. Además, dichas cepas son las que presentaron una mayor productividad específica en la producción de EPS. Los resultados obtenidos se describen a continuación

4.5.1.3- Morfología bacteriana

En la figura 4.3. se muestra el resultado de la microscopía electrónica realizada a las cepas B.3 y B.7 a las 48 horas de cultivo.

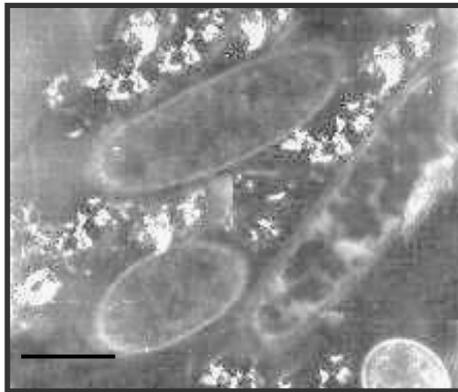


Figura4.3.- Microscopía electrónica. de la cepa B.7 a las 48 h cultivo (Tinción de Rojo Rutenio). **Barra 1 μ m.**

4.5.1.4- Características fenotípicas de las cepas B.3 y B.7

Los resultados obtenidos tras la realización de las distintas pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas a las cepas seleccionadas, B.3 y B.7, se muestran en las tablas 4.8 y 4.9.

Tabla 4.8. Características fenotípicas de las cepas representativas.

CARÁCTERÍSTICAS	CEPA B.3	CEPA B.7
FENOTÍPICAS		
Diámetro Colonial >4 mm	-	+
Diámetro Celular > 1.0µm	-	-
Esporas redondas	-	-
Esporangio hinchado	+	+
Cristal parasporal	-	-
Catalasa	+	+
Crecimiento Anaerobico	+	+
Voges-Proskauer	+	-
Hidrólisis de		
Caseína	+	+
Gelatina	+	+
Almidón	+	+
Utilización de:		
Citrato	-	-
Propionato	-	-
Nitrato reducido a nitrito	+	+
Formación de Indol	-	-
Crecimiento a pH		
6.8	+	+
5.7	+	+
Crecimiento en NaCl		
2%	+	+
5%	-	-
7%	-	-
10%	-	-

Tabla 4.9. Producción de ácidos a partir de distintos substratos

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO	Cepa <i>B.3</i>	Cepa <i>B.7</i>	Control <i>P.polymyxa</i>
Glicerol			+
Eritritol			-
D-arabinosa	+	+	-
L-arabinosa	-	-	+
Ribosa	-	-	+
D-xilosa	+	+	+
L-xilosa	+	+	-
Adonitol	+	+	-
β-methyl-xyloside	-	-	+
Galactosa	-	-	+
D-glucosa	-	-	+
D-fructosa	+	+	+
D-manosa	+	+	+
L-sorbosa	+	+	-
Ramnosa	+	+	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Manitol	-	-	+
Sorbitol	-	-	-
α metil-d-manosida	+	+	-
α metil-d-glucosida	-	-	+
n acetil glucosamina	+	-	-
Amigdalina	+	+	+
Arbutina	-	-	+
Esculina	+	+	+
Salicilina	+	+	+
Celobiosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Lactosa	+	+	+
Melibiosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Trehalosa	+	+	+
Inulina	+	+	-
Melezitosa	+	+	-
Rafinosa	-	+	+
Almidón	-	-	+
Glucógeno	+	+	+
Xilitol	+	+	-
Gentiobiosa	+	+	+
D-turanose	-	-	+
D-lixosa	-	+	-
D-tagatosa	+	+	-
D-fucosa	-	-	-
D-arabitol	-	-	-
L-arabitol	-	-	-
Gluconate	-	-	-
2-Keto-gluconate	-	-	-
5-Keto-gluconate	-	-	-

4.5.1.5- Dendrograma de Taxonomía numérica:

La valoración, en forma de datos binarios, de los resultados obtenidos de las de pruebas fenotípicas realizadas y de mayor trascendencia en la determinación de especies dentro del género *Bacillus* y relacionados, dio lugar a la elaboración de un dendrograma de taxonomía numérica que se muestra en la figura 4.4.

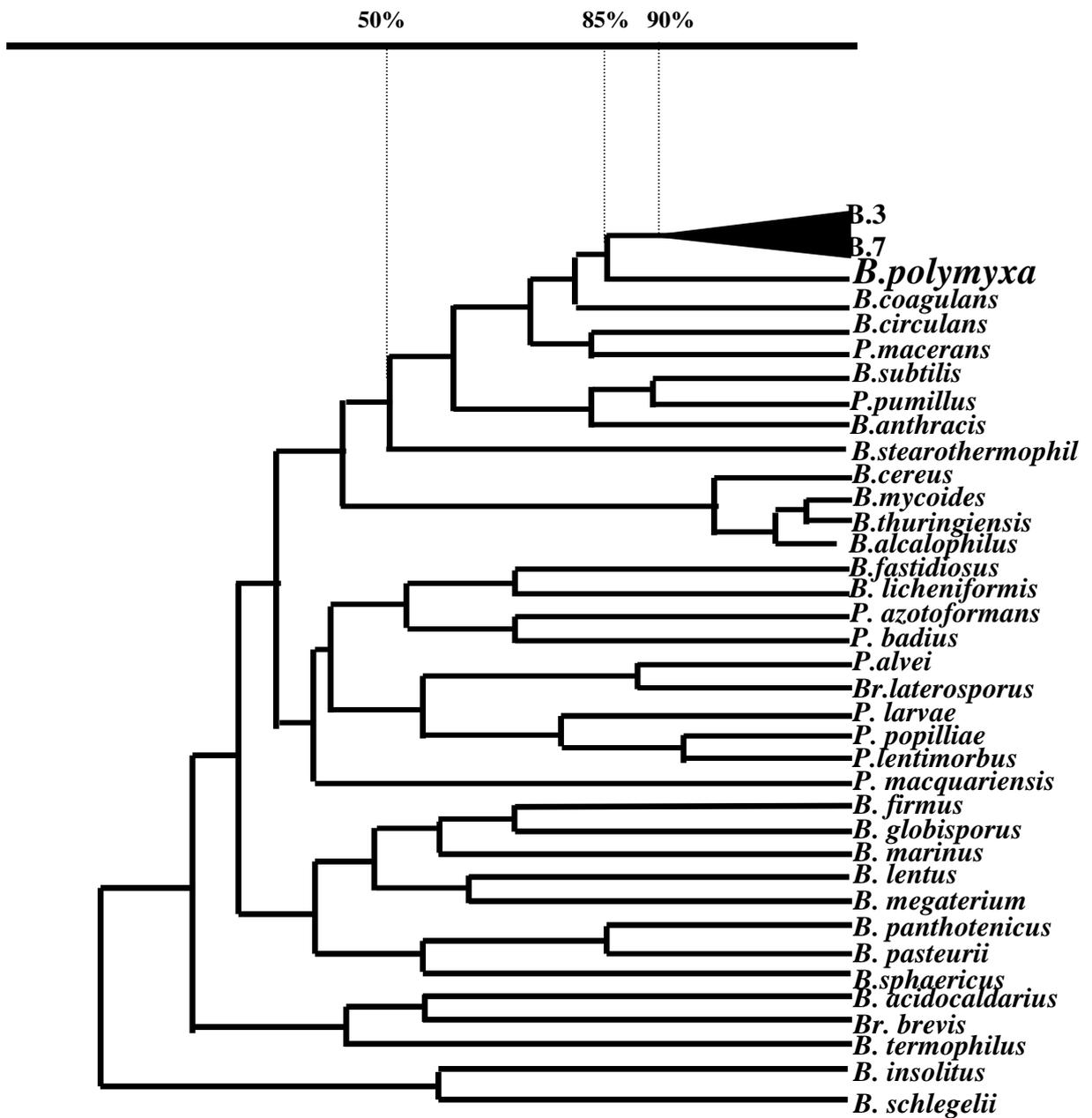


Figura 4.4- Dendrograma de Taxonomía Numérica

Como podemos observar en el dendograma se obtiene un fenón que agrupa a las cepas objeto de estudio a un nivel de similitud del 90%, mientras que con *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*) la semejanza fué de un 85%.

4.5.2.- Resultados de las pruebas genótípicas:

4.5.2.1. Composición de Bases G+C.

Los resultados obtenidos tras el estudio de la composición de bases G+C del DNA de las diez cepas objeto de estudio se expresan en la tabla 4.10.

Tabla 4.10. Composición de base (Tm (° C), G+C (mol %))

CEPAS	Valor medio Tm (° C)	Valor medio G+C (mol %)
Cepa B.1	85.98±0.69	40.48±1.70
Cepa B.2	86.81±0.52	42.68±0.60
Cepa B.3	87.05±0.74	40.21±0.60
Cepa B.4	87.10±0.85	43.41±0.52
Cepa B.5	86.55±0.024	42.07±0.43
Cepa B.6	86.35±0.41	43.41±0.52
Cepa B.7	85.98±0.69	40.68±1.70
Cepa B.8	86.29±0.41	40.71±1.40
Cepa B.9	86.05±0.80	40.85±1.55
Cepa B.10	86.71±0.73	42.43±0.58
Paenibacillus polymyxa	86.18±0.51	41.21±1.26

4.5.2.2.- Determinación del gen que codifica para el RNA ribosómico 16S.

4.5.2.2.1- Secuencias del gen del RNA ribosómico 16S

Tras la amplificación con los oligonucleótidos universales y secuenciación con oligonucleótidos internos (Tabla 4.4.), las secuencias obtenidas fueron las siguientes:

Cepa B.3

>B3Total

TTAANATTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGA
 GCGGGGTTAGTTAGAAGCTTGCTTCTAANTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
 AGGCAACCTGCCACAAGACAGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCCGATACAT
 CCTTTTCCTGCATGGGAGAAGGAGGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCT
 GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACC
 TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGATGATGAAG
 GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTNTTGTAGAGTAACTGCTACAA
 GAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAA
 GTCTGGTGTTTAATCCCGAGGCTCAACTTCGGGTTCGCACTGGAAACTGGGGAGCTTGAGT
 GCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
 ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
 GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGG
 GGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGT
 CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAGCAGTGGAGTATGTGGTT
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGACATCCCTNTGACCGGTCTAGAGA
 TAGACCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTC
 AAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAACAATGGCCGGTACAACGGGA
 AGCGAAGNNGGAGGTGGAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
 GCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
 TACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAG
 TCGGTGAGGTAACCGCAAGGNGCCAGCCCGCAAGGTGGGGTAGATGATGGGGTGAAGT
 CGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCAACCTCTTTCC

Cepa B.7

>B7Total

ATCATGGCTCAGATTGAACGCTAGCGGGATGCTTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGC
 GAGAGAGCTTGCTCTNTTGTTCGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGC
 CCAGTAGCGGGGATAACTACTNNGAAAGAGTGGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGA
 AAGGGGGGATCGCAAGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGG
 TGGGGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTTTGTAGAGGACGACCAGCCACA
 CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCACGAGTGGGGAATTTTGGACAAT
 GGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGCGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCT
 GTTGCCAGGGAAGAACGTCTTGTNGAGTAACTGCTACAAGAGTGACGGTNCCTGAGAAGA
 AAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCG
 GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAGTCTGGTGTTTAATCCCGAGG
 CTCAACTTCGGGTTCGCACTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT
 NCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTATAGATGTGGAGGAACACCANTGGCGAAGGCGACTNT
 TTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTANATACCCT
 GGTAGTCCACGCCGTAANGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTNCGATACCCTTGGTGCC
 GAAGTTAACACATTAAGCATTCGCGCTGGGGAGTNCGGCCGNAGACTGAACTTANAGGA
 ATTGACCGGGGAACCCCNCAAGCAGTGGAGTATGTGGTGWATTACCGCGGCKGCTGCCA
 GGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGNCCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCTGTTAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTCAAGCTGGGCACTCTAAGCAGACTGCCGGT
 GACAAACCGGANGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTA
 CACACGTACTACAATGGCCGGTACANCGGGAAGCGAAATCGTNAGGTGGAGCCAATCCTA

GAAAAGCCGGTCTCAGTTTGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATTGC
 TAGTAATCGCGGATCANCATGCCGNGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGTCG
 GTGAGGTAACCGCAAGNGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGTAGATGATTGGGGTGAAGTCGT
 ACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCAACCTCTTTCC

4.5.2.2.2- Alineamiento local-global (BLAST). Máximas homologías.

BLAST- Cepa B3

Score E

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
dbj D16276 BAC16SRR11 Bacillus polymyxa 16S rRNA gene	2801	0.0
emb AJ011687.1 PBU011687 Paenibacillus burgondia 16S rRNA g...	2753	0.0
emb AJ223988.1 PS16SPMD2 Paenibacillus polymyxa 16S rRNA ge...	2639	0.0
dbj D78318 PBB16SRRJ Paenibacillus azotofixans strain NRRL ...	2579	0.0
dbj D78476 D78476 Paenibacillus peoriae DNA for 16S rRNA	2486	0.0
emb X60632 BPOL16SR B.polymyxa 16S ribosomal RNA	2415	0.0

BLAST- Cepa B7

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
dbj D16276 BAC16SRR11 Bacillus polymyxa 16S rRNA gene	1018	0.0
emb AJ011687 PBU011687 Paenibacillus burgondia 16S rRNA gene, i...	978	0.0
dbj D78318 PBB16SRRJ Paenibacillus azotofixans strain NRRL B-14...	950	0.0
dbj D78473 D78473 Paenibacillus lautus DNA for 16S rRNA	933	0.0
dbj D78476 D78476 Paenibacillus peoriae DNA for 16S rRNA	925	0.0
emb X77846 CD16SRR C.durum (DSM 1735) 16S rRNA gene	915	0.0

- Alineamiento múltiple entre las dos cepas (Clustal X)

CLUSTAL X (1.8) multiple sequence alignment

```

B.3Total      TGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGGGTT
B.7Total      --ATCATGGCTCAGATTGAACGCTAGCGGGATGCTTTACACATGCAAGTCGAACCGCAGC
                *****
B.3Total      AGTTAGAAGCTTGCTTCTAAGTAACCTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACC
B.7Total      GCGAGAGAGCTTGCTCTTTTGTGCGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATATATCGG-AACC
                ***** * * * * *
B.3Total      TGCCCAAGACAGGGATAACTACGGAAACGGTAGCTAATACCCGATACATCCTTTTCC
B.7Total      TGCCAGTAGCGGGGATAACTACTGGAAGAGTGGCTAATACCCGATACGCCCT-----
                ***** **
B.3Total      TGCATGGGAGAAGGAGGAAAGCGGAGCAATCTGTCACTTGTGGATGGGCTGCGGCGCA
B.7Total      -AC--GGGGAAAGGGGGGATCGCAA-GACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATCGGA
                * *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
B.3Total      TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG
B.7Total      TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGTTTGAAGGGA
                *****
B.3Total      TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
B.7Total      CGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCACGAGTGGGGA
                ** * *****
B.3Total      ATCTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGATGATGAAGGTTTTCGG
B.7Total      ATTTGGACAATGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGGAG-TGATGAAGGTTTTCGG
                ** * * *****
B.3Total      ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTTGTAGAGTAAGTACAGAGTGAGCG
B.7Total      ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTTGTAGAGTAAGTACAGAGTGAGCG
                *****
B.3Total      GTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGG
B.7Total      GTACCTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGG
                *****
    
```

B.3Total CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGGTG
 B.7Total CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGGTG

B.3Total TTTAATCCCAGGCTCAACTTCGGGTCGCACTGGAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGA
 B.7Total TTTAATCCCAGGCTCAACTTCGGGTCGCACTGGAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGA

B.3Total GGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG
 B.7Total GGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTATAGATGTGGAGGAACACCAGTGG

B.3Total CGAAGGCGACTCTTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 B.7Total CGAAGGCGACTCTTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG

B.3Total GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGA
 B.7Total GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGA

B.3Total TACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
 B.7Total TACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA-GAC
 ***** ** *

B.3Total TGAAACTCAAAGGAATTGAC--GGGACCCGACACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATTC
 B.7Total TGAAACTTAAAGGAATTGACCGGGGAACCCCAAGCAGTGGATTTCGTATGCCTTTTT
 ***** * * * * *

B.3Total GAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCT-GACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGAC
 B.7Total CGAACAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTACATCCCTCTGACCGGTCTAGAGATAGAC
 * *****

B.3Total CTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGAG
 B.7Total CTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGAG

B.3Total TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTCAAGCT
 B.7Total TGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGCTTAGTTGCCAGCAGGTCAAGCT

B.3Total GGGCACTCTAAGCAGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCA
 B.7Total GGGCACTCTAAGCAGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCA

B.3Total TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCGTACAACGGGAAGCGA
 B.7Total TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCCGTACAACGGGAAGCGA

B.3Total AGTCGCGAGGTGGAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAAC
 B.7Total AATCGCGAGGTGGAGCCAATCCTAGAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAAC
 * *****

B.3Total TCGCCTACATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
 B.7Total TCGCCTACATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT

B.3Total TCCCGGCTCTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTACAACCCGAAGTCGGT
 B.7Total TCCCGGCTCTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTTACAACCCGAAGTCGGT

B.3Total GAGGTAACC-GCAAGGG-GCCAGCCCGAAGGTGGGGTAGATGATTGGGGTGAAGTCGT
 B.7Total GGGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCCGAAGGTGGGGTAGATGATTGGGGTGAAGTCGT
 * *****

B.3Total AACAAAGGTAGCC-GTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA CCTCTTTTC
 B.7Total AACAAAGGTAGCCGATATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA CCTCTTTTC

4.5.2.2.3- Secuencia consenso conservada en todas las especies de *Paenibacillus*

PAEN515F, es una secuencia presente en todas las especies de *Paenibacillus* (Shida *et al.*, 1997a), también está presente en la cepa B.3 y B.7.

3'-GAGTAACTGCTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCC-5'

4.5.2.2.4- Secuencia putativa definitoria del RBS o SD

Extremo final de las secuencias de RNA ribosómico 16S

3'-TGGATCACCTCTTTTCC-5'

-ACCTAGTGGAGAAAAGG-

4.5.2.2.5.- Árbol filogenético del gen del RNAr 16S

Para la realización del árbol filogenético, una vez conocida las máximas homologías con las secuencias ya descritas, incluimos una especie de cada uno de los nuevos géneros descritos recientemente y directamente relacionados con el género *Bacillus*: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Amphibacillus*, *Coprobacillus*, *Halobacillus*, *Gracilibacillus*, *Alicyclobacillus*. En la figura 4.5. se muestra el árbol filogenético obtenido.

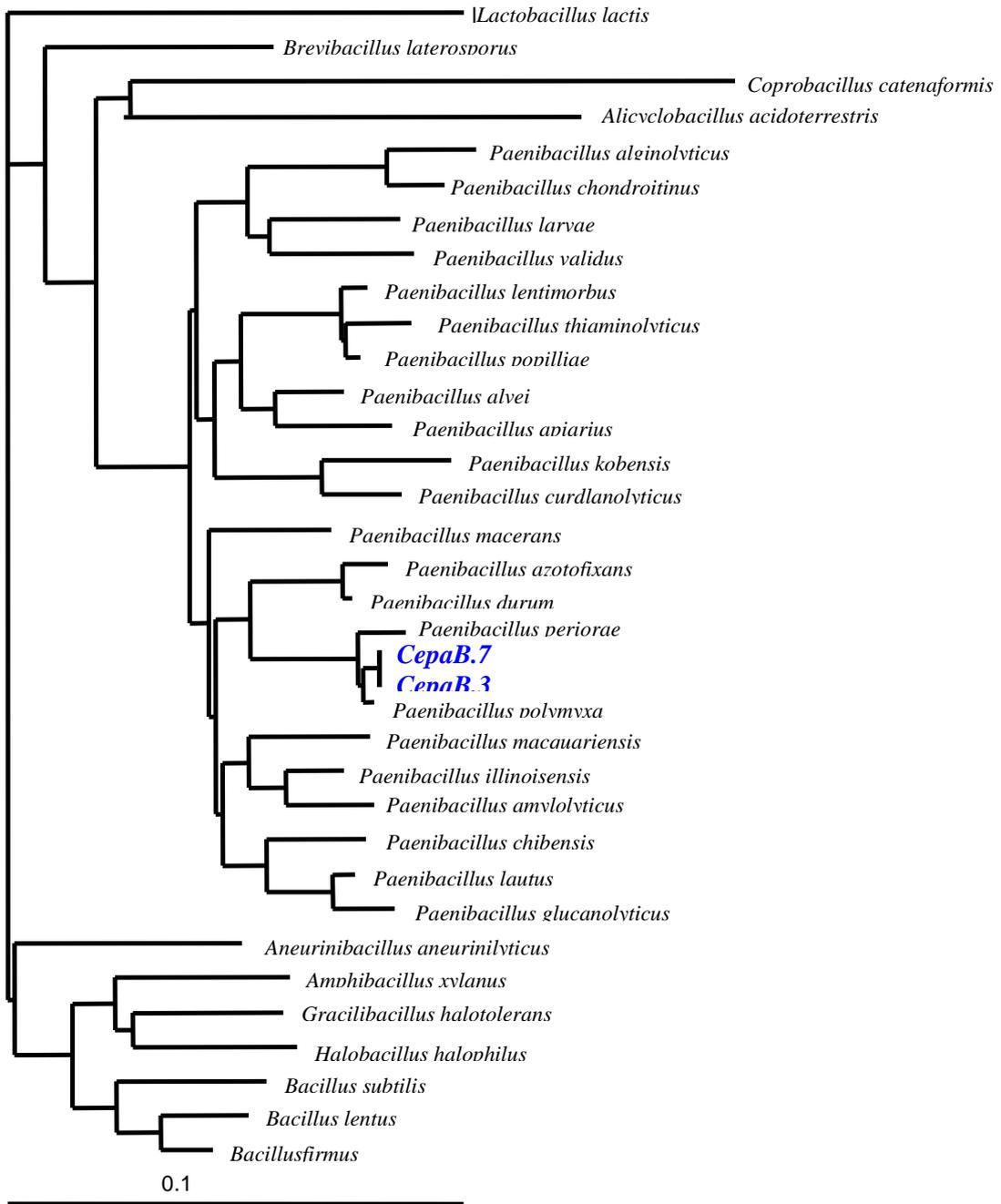


Figura 4.5. Arbol filogenético donde se incluyen las cepas B.3 y B.7 (0.1Knuc)

4.5.2.3.- Hibridación DNA-DNA

Los resultados de hibridación DNA-DNA, mostrados en la tabla 4.11 y Figura 4.6, se obtuvieron mediante técnica inmunoenzimática no radiactiva, marcando el DNA de la cepa B.3, que nos sirvió como valor de referencia. A partir de dicho DNA marcado se realizó hibridación con el resto de las cepas objeto de estudio y con *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lentus* y *Bacillus laterosporus*

Tabla 4.11.- Valores de la hibridación DNA-DNA entre la cepa B.3 marcada y de las diez cepas seleccionadas.

Cepa	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5	B.6	B.7	B.8	B.9	B.10
RBR %	73	83	100	78.5	91.2	68.2	78.3	79.3	85.4	78.2

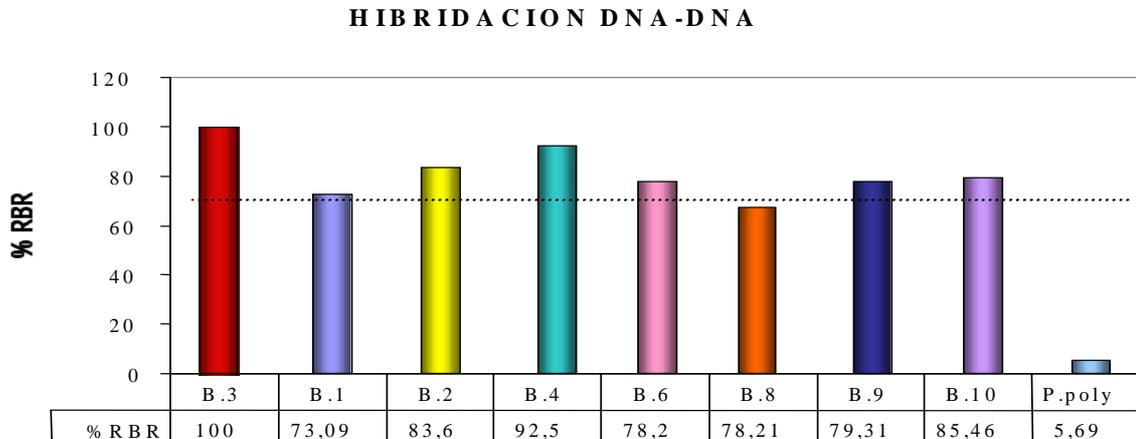


Figura 4.6. Resultados de la Hibridación DNA-DNA

Finalmente, en la tabla 4.12 mostramos un cuadro resumen con los resultados obtenidos de la totalidad de la pruebas genotípicas realizadas

Tabla 4.12. Cuadro resumen de las pruebas genotípicas

Cepa	Tm (° C)	G+C(mol %)	Similitud del RNAr 16S (%)	Hibridación DNA-DNA (%RBR, B.3)
Cepa B.1	85.98±0.69	40.48±1.70	ND	73
Cepa B.2	86.81±0.52	42.68±0.60	ND	83
Cepa B.3 ^r	87.05±0.74	40.21±0.60	100	100
Cepa B.4	87.10±0.85	43.41±0.52	ND	78.5
Cepa B.5	86.55±0.024	42.07±0.43	ND	91.20
Cepa B.6	86.35±0.41	43.41±0.52	ND	68.21
Cepa B.7	85.98±0.69	40.68±1.70	98	78.21
Cepa B.8	86.29±0.41	40.71±1.40	ND	79.31
Cepa B.9	86.05±0.80	40.85±1.55	98	85.46
Cepa B.10	86.71±0.73	42.43±0.58	ND	78.21
<i>P. polymyxa</i>	86.18±0.51	41.21±1.26	98	15
<i>P. peoriae</i>	88.16	46.0	96	ND
<i>P. azotofixans</i>	90.01	50.5	95	ND
<i>B. firmus</i>	85.78	40.2	ND	6
<i>B. lentus</i>	85.56	39.6	ND	13
<i>B. laterosporus</i>	85.31	39.1	ND	21

4.6. – Discusión

Definir taxonómicamente especies del grupo *Bacillus* ha sido un proceso confuso que ha necesitado de continuas revisiones para establecer la situación de especies que, por ejemplo, habían sido definidas según la composición de bases G+C (Smith *et al.*, 1952), como es el caso de *B. megaterium* y que después, según estudios fenotípicos y análisis de hibridación de DNA-DNA se ha desdoblado en cuatro especies diferentes (Hunger y Claus., 1981). Existen muchos estudios de este tipo (Nakamura *et al.*, 1988; Shida *et al.*, 1997a), y concretamente dentro del género *Bacillus* las técnicas moleculares han conducido a un concepto de *Bacillus* unificado y a la subdivisión del mismo, dando lugar a la descripción reciente de nuevos géneros (Shida *et al.*, 1996).

Por otro lado, los rápidos avances en manipulación genética y la expansión de la biotecnología en los últimos años han conducido a una mayor conciencia del enorme potencial industrial de los microorganismos en general y de los del grupo *Bacillus* en especial. Son microorganismos muy diversos y útiles a nivel industrial, estando ampliamente distribuidos en suelo, aire y agua. Determinadas especies de dichos géneros se utilizan para la obtención de diferentes productos, como enzimas, antibióticos, suplementos y potenciadores del sabor de alimentos y también como insecticidas.

El alpechín y alpeorajo, subproductos de la obtención de aceite de oliva, presentan un bajo contenido en nitrógeno orgánico y elevado en fuente de carbono, por lo que ofrecen un ambiente favorable para el desarrollo de determinados microorganismos. En este sentido ofrecen un buen sustrato para los microorganismos fijadores de nitrógeno, lo cual ha sido demostrado después de tratar sucesivamente el suelo con el residuo (García-Barrionuevo, 1992). Balis *et al.*, (1996) encontraron que la población microbiana que se desarrolla en suelos tratados con alpechín, está frecuentemente dominada por el género *Azotobacter*; llegando a aislar una cepa de *Azotobacter vinelandii* altamente fijadora de nitrógeno y productora de limo; siendo estudiada en la actualidad su posible aplicación agrobiológica, ya que proporciona un sistema estable de fijación de nitrógeno y bioremediación del alpechín. Así mismo se ha

encontrado que dicha cepa, cultivada en alpechín, produce auxina y polisacáridos capsulares, los cuales podrían contribuir a la mejora de las tierras de cultivo (Fiorelli *et al.*, 1996).

En esta misma línea, en la actualidad, nuestro grupo de investigación ha realizado aportaciones novedosas relacionadas con el aislamiento de cepas bacterianas capaces de crecer en un residuo tóxico, alpechín, como único substrato (Guerra, 1999) y con la producción de nuevos exopolisacáridos microbianos con aplicaciones industriales y biológicas (Ruíz-Bravo *et al.*, 2001). Al ser el alpechín un subproducto de elevado poder contaminante, nuestras investigaciones contribuyen a la biorremediación de dicho residuo, siendo una de las más eficaces soluciones al grave problema planteado por los residuos derivados de la industria del aceite de oliva (Ramos *et al.*, 1995).

De todo lo anterior se deduce la enorme importancia en la caracterización taxonómica exhaustiva de los microorganismos implicados en dichos procesos, resultado que se presenta en este capítulo y considerado como trabajo preliminar necesario para las posteriores aplicaciones biotecnológicas.

Por otro lado debemos indicar que la taxonomía o sistemática se basa en la organización de los microorganismos en grupos o categorías llamadas taxa (en singular taxon). Una caracterización taxonómica correcta se debe basar en un estudio polifásico, que permita comparar y verificar los resultados de caracterización fenotípica con los de caracterización genotípica y viceversa. Ambos resultados por separado nos dan información parcial de la realidad y no pueden ser concluyentes por sí solos.

Dos características fenotípicas diferenciales a resaltar entre la cepa B.3 y B.7 son el aspecto mucoso y la diferente solubilidad en agua del polímero producido, definidas por la diferente morfología colonial, concretamente el color blanco o azul de las colonias en el medio YM- Azul de Toluidina (Suresh, *et al.*, 1980), demostrando que las diferencias radican en el tipo de EPS producido, con estructuras distintas en ambos fenotipos. También se observó un mayor tamaño de las colonias en la cepa B.7, además de un crecimiento más rápido en medio líquido YM. Estos datos, junto a la solubilidad

en agua del EPS de la cepa B.7, pueden determinar los resultados de rendimiento en la obtención de EPS (Guerra *et al.*, 1998), que era significativamente mayor en la B.7.

En cuanto al resto de las pruebas fenotípicas realizadas a las cepas representantes de los dos fenotipos coloniales, cepa B.7 y cepa B.3, en ambas se obtuvieron los mismos resultados en ambos, a excepción de las pruebas relacionadas del ONPG (Api20E) y la formación de ácidos a partir de determinados azúcares.

Las especies de referencia (Sneath 1986) más relacionadas con las cepas objeto de este estudio según el dendrograma de taxonomía numérica (Figura 4.4) son las siguientes: *P.polymyxa* (88.2%) *B.lentus* (87.5%), *B.stearotermophilus* (87.5%), *B.circulans* (87.5%) , *B.alcalophilus* (87.5%), *B.coagulans* (80.2%), *B.macquariensis* (80.2%) , *P.macerans* (80.2%) , *P.alvei* (72.7%) *Br.brevis* (72.7%), *P.larvae* (72.7%), *B.laterosporus* (72.7%), *B.badius* (72.7%), *B.firmus* (72.7%), *B.pasteurii* (72.7%), *B.pantothenicus* (72.7%).

Tras el análisis de las pruebas fenotípicas, los siguientes pasos experimentales, nos llevaron a un estudio de taxonomía molecular genética.

En primer lugar hemos de indicar que, en la extracción del DNA de las diez cepas objeto de estudio por el método clásico (Marmur, 1961), no se obtuvieron buenos resultados, por lo que se tuvo que modificar la técnica introduciendo glicina en el medio de cultivo, a una proporción del 0.5% (p/v), ya que disminuye el coeficiente C/N favoreciendo el crecimiento y no así la formación de EPS. En este sentido también el EDTA-salino lo sustituimos por GlucosaTE, ya que el NaCl podía influir en la adhesión del EPS a la pared de la célula o formación de agregados. Por la misma razón el NaCl 5M lo sustituimos por Perclorato Sódico.

La composición de bases G+C de las diez cepas, mostrada en la tabla 4.10, presentó unos valores con variaciones máximas de 3.2 moles % de G+C, que traducido a variación en la Tm es del orden de 1.32° C, siendo un dato de importancia taxonómica, ya que las cepas pertenecientes a la misma especie no difieren en su valor de Tm en $\pm 5^{\circ}$ C. Las especies que pertenecen al mismo género normalmente tienen un % de G+C que no varía en más de un 10% (Johnson 1985; Owen *et al.*, 1985) . Sin embargo, antes de

la subdivisión del grupo *Bacillus*, en éste género se agrupaban especies cuyo contenido en bases nucleotídicas era muy heterogéneo, variando entre 32-69 mol % (Fahmy *et al.*, 1985).

Todas las especies relacionadas por taxonomía numérica con las cepas objeto de estudio no variaron en $\pm 10\%$ del G+C, a excepción de *B.macerans* y *B.stearothermophilus* que superan ligeramente dicha variación.

A pesar de lo anteriormente expuesto, se considera que especies muy relacionadas tienen valores de G+C similares, y que dos organismos con similar composición de bases no están necesariamente relacionados, ya que la disposición en su estructura primaria, o sea, la secuencia de nucleótidos, puede ser diferente y determinante en su fenotipo. Por lo que el contenido en G+C no se puede considerar un dato taxonómico concluyente por sí solo.

Las relaciones filogenéticas se pueden establecer mediante el análisis de moléculas conservadas a lo largo de la evolución de los organismos, tal es el caso del RNA ribosómico 16S en los microorganismos procariontas (Ash *et al.* 1991), y también el RNA ribosómico 23S y los “interspacers” o moléculas internas a los dos anteriores.

El análisis del gen del RNA ribosómico 16S (Figura 4.5. - Árbol filogenético), demostraron que las cepas aisladas de alpechín y productoras de un nuevo exopolisacárido están altamente relacionadas con *P.polymyxa* y dentro del grupo mayoritario que engloba a las especies del género recientemente descrito como *Paenibacillus* por Shida *et al.*, (1997a). Las cepas B.3 y B.7 se agrupan con las especies de *Paenibacillus* fijadoras de nitrógeno, característica interesante, para la utilización del alpechín y alpeorujo como sustratos en la biorremediación (García-Barrionuevo *et al.*,1992; López *et al.*,2001).

En el árbol filogenético podemos apreciar la distribución más alejada de especies que hemos utilizado en el estudio comparativo numérico y de otras especies, entre las que cabe destacar la distancia evolutiva de las especies de los géneros *Aneurinibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Coprobacillus*, *Halobacillus*, *Amphibacillus*, *Gracillibacillus*,

Brevibacillus, mientras que no ocurre lo mismo con las especies de *Paenibacillus*, que incluye organismos que difieren muy poco en sus características fenotípicas, y que parten de una misma rama del árbol filogenético.

La distribución relativa de las especies en el árbol guardan relación directa con el árbol filogenético descrito en bibliografía y realizado con 100 especies del grupo *Bacillus* (Forsyth *et al.*, 1998) utilizando el programa Treecon para Windows (Van De Peer *et al.*, 1994).

Si atendemos a la situación dentro del árbol filogenético, las cepas objeto de estudio, están muy próximas a *P.polymyxa*, dato coincidente con la posición relativa de ambas especies en el dendrograma de taxonomía numérica, mientras que *B.lentus*, *B.firmus*, *B.circulans* y *Br.laterosporus* están a gran distancia evolutiva de las cepas B.7, y B.3.

Las posiciones relativas de las cepas B.3 y B.7 dentro del árbol filogenético ponen de manifiesto la posibilidad de que ambas conformen una única especie, junto al valor en porcentaje de la comparación de sendas secuencias del gen del RNA ribosómico 16S (98%). Contienen, además, la secuencia consenso asignada a todas las especies del género *Paenibacillus* (Shida y col., 1997).

PAEN515F:3'-GAGTAACTGCTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCC-5'

Los porcentajes relativos a la similitud de secuencia con las especies más cercanas fueron 98%, 96% y 95% respectivamente para *Paenibacillus polymyxa*, *P. peoriae* y *P. azotofixans*. El porcentaje con *Paenibacillus polymyxa* fué lo suficientemente alto (>97%- Stackebrandt *et al.*,1994) para poder considerarse de la misma especie si no tenemos en cuenta otros resultados, los cuales son necesarios para dar credibilidad a un estudio global de taxonomía bacteriana.

La experiencia científica ha demostrado que las relaciones entre especies bacterianas se pueden establecer realmente con la hibridación DNA-DNA, quizá por ello es el método que se realiza como concluyente, a pesar de ser la técnica de mayor dificultad y envergadura. Generalmente las bacterias de la misma especie muestran

valores de homología de DNA igual o superior al 70% (Johnson, 1985; Ziemke, 1998), aunque últimamente se han establecido incluso conceptos más específicos, como genomovar (Rossello-Mora 1999) para ajustar las relaciones entre cepas de la misma especie, pero con suficientes características genotípicas para considerarlas diferentes. Así, cuando existen valores inferiores a 70% de homología DNA-DNA, se consideran distintos genomovares de una misma especie. Además, el límite teórico inferior para descartar la identidad a nivel de especies es el 20%. El rango de valores que existe entre 20 y 70% para considerar organismos pertenecientes a las mismas o diferentes especies es arbitrario, y de difícil acuerdo entre microbiólogos.

Los resultados de hibridación DNA-DNA presentados en la tabla 4.11, confirman de forma absoluta la alta relación entre las diez cepas objeto de estudio, ya que hibridan todas en un porcentaje superior al **73%**, respecto a la cepa marcada de referencia (cepa B.3); mientras que los porcentajes de hibridación con la especie *Paenibacillus polymyxa* candidata a ser homóloga, fueron inferiores al 20%. Realizamos también hibridaciones con especies cercanas por taxonomía numérica, dando un resultado negativo en todos los casos (datos no mostrados). Así mismo como control negativo de los valores de hibridación entre distintas especies está el valor de hibridación entre *B.firmus* y *B.circulans* que no es superior al 7%.

Resaltamos que la hibridación DNA-DNA con *P.polymyxa*, especie más próxima por comparación de pruebas fenotípicas y genotípicas, dio un resultado del 15,5% descartándose la posibilidad de identidad con esta especie.

Los resultados globales obtenidos del estudio taxonómico polifásico de las cepas de acuerdo a los datos morfológicos, bioquímicos, contenido de G+C, estudios filogenéticos de RNAr 16S e hibridación DNA-DNA, conducen a la proposición de una nueva especie dentro del género *Paenibacillus*, género que tiene las siguientes características según describe Ash en 1993:

Bacilos. Gram positivos, Gram negativos o Gram variable. Móviles por flagelos peritricos. Esporas elipsoidales con esporangio hinchado. Anaerobios facultativos o

aerobios estrictos. La mayoría de las especies son catalasa positiva. La oxidasa es variable. La reacción de Voges-Proskauer (producción de acetilmetil-carbinol) es variable y el pH en dicho medio es menor de 6.0.

No produce sulfhídrico. El indol es producido por algunas especies. La reducción de nitrito es variable.

La hidrólisis de la caseína, hidrólisis del almidón, y la hidrólisis de la urea son variables.

La descomposición de la tirosina es variable.

El crecimiento a pH 5.6 y a 50° C es variable. El crecimiento óptimo de la mayoría de las especies se produce a 28-30° C. El crecimiento se ve inhibido al 10% de NaCl. Algunas especies no crecen en medio que contenga 0.001% de lisozima.

Son productores de ácido a partir de diversos azúcares. *P.polymyxa*, *P.priorae*, *P.azotofixans* y *P.macerans* producen gases a partir de varios azúcares.

Algunas especies son capaces de descomponer polisacáridos.

El ácido graso mayoritario es el ácido anteiso-C_{15:0}.

El intervalo de la composición de bases, mol % de G+C, va desde 45-54%.

Los niveles de similitud en el gen del RNAr 16S son mayores del 89.6% para los miembros del género.

La especie tipo de este género es *Paenibacillus polymyxa*.

Descripción de *Paenibacillus jamilae* sp. nov.: (“jamilá” palabra proveniente del árabe que significa “el agua que corre de las aceitunas”, residuo donde es capaz de crecer la bacteria como único substrato)

Son bacilos de un tamaño de 0.6 a 0.8 µm por 3.0 a 5.5 µm. Gram variable. Móviles por flagelos peritricos. Esporas elipsoidales formadas dentro de un esporangio hinchado. Colonias convexas, circulares, mucosas, de pigmentación blanquecina.

Anaerobios facultativos.

Catalasa positiva y oxidasa negativa.

No producen acetilmetilcarbinol (Voges-Proskauer negativa).

No producen indol.

Reducen el nitrato a nitrito.

Hidrolizan la caseína, gelatina y almidón.

No utilizan citrato.

El crecimiento se produce entre temperaturas de 30 y 40° C, a un intervalo de pH 5-12. El crecimiento óptimo se produce a 30° C y a pH 7.0. El crecimiento es inhibido por el 5% de NaCl. Capaces de crecer en presencia del 0.001% de lisozima.

Producción de ácidos y no de gases a partir de D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa y D-manitol.

Con un contenido medio de G+C del 40.7 %.

Capaces de crecer al 100% (v/v) de alpechín y producir un nuevo exopolisacárido.

4.7. – Conclusiones

- Todas las cepas objeto del presente estudio pertenecen a la misma especie, ya que su porcentaje de hibridación es superior al 70 % y concuerda con los resultados casi idénticos en las pruebas fenotípicas.

- Los análisis filogenéticos del RNAr 16S sitúan a las cepas dentro del género *Paenibacillus*, a una mínima distancia evolutiva de la especie *Paenibacillus polymyxa* (98% similitud de secuencia)

- El porcentaje de hibridación de las cepas con la especie tipo del género *Paenibacillus*, *P. polymyxa*, la especie bacteriana más similar tanto fenotípica como genotípicamente, es del 15.5 %, lo que descarta su identidad a nivel de especie.

- Las cepas objeto de estudio son bacilos, Gram positivos (o variable), esporulados, catalasa positiva, no pertenecen a ninguna especie descrita hasta el momento del grupo *Bacillus* según los datos numéricos, de composición de bases, similitud RNA ribosómico 16S y homología en la hibridación *DNA-DNA*.

- Proponemos la descripción de una nueva especie del género *Paenibacillus*, *Paenibacillus jamilae*, capaz de crecer en alpechín como única fuente de carbono y energía, y producir EPS con potencial industrial y biológico.

**PARTE III.2: ESTUDIO MOLECULAR DE LA
BIOSÍNTESIS DE EPS EN *Paenibacillus jamilae***

**Capítulo 5. Estudio genético del exopolisacárido de
*Paenibacillus jamilae***

Capítulo 5. Estudio genético del exopolisacárido de *Paenibacillus jamilae*.

5. 1. – Resumen

5. 2. – Introducción

5. 3. - Objetivos

5. 4. - Material y métodos

5. 5. – Resultados

5. 5.1.- Localización e Identificación Genética del Operón de Biosíntesis del Exopolisacárido

5.5.1.1.- Búsqueda en Base de datos de los operones EPS Bibliografía.

5.5.1.2.- Alineamiento inicial de los genes implicados en la síntesis de EPSs y Diseño de oligonucleótidos degenerados universales.

5.5.1.3.- Extracción de DNA cromosómico y amplificación con las parejas de oligonucleótidos degenerados diseñados.

5.5.1.4.- Clonación, secuenciación de los fragmentos obtenidos y comparación de las secuencias con las bases de datos.

5.5.1.5.- Elaboración de sondas marcadas con digoxigenina.

5. 5.1.6.- Búsqueda física del cluster de EPS mediante Southern Blot.

5. 5.1.7.- Obtención de productos mediante PCR inversa y/o larga adyacentes a la secuencia inicial.

5. 5.1.8.- Construcción ordenada de la secuencia nucleotídica del operón de síntesis del EPS.

5. 5.2.-Análisis de la Secuencia Nucleotídica del Operón de Síntesis del EPS:

5.5.2.1.- Localización de elementos genéticos de interés: SD o RBS, secuencias promotoras (posiciones -35 -10 y +1), terminadores, inicios y finales de ORFs.

5.5.2.2.- Análisis de ORFs .

- 5.5.2.3.- Representación gráfica del operón de biosíntesis de EPS.
- 5. 5.2.4.- Análisis de restricción.
- 5. 5.2.5.- Traducción de la secuencia de nucleótidos a secuencia proteica.
- 5. 5.2.6.- Análisis y asignación de funciones por similitud de la secuencia de proteínas con las bases de datos.
- 5. 5.2.7.- Secuencias y dominios conservados.

5. 6. – Discusión

5. 7. – Conclusiones

5. 1. – Resumen

Este capítulo describe la localización e identificación genética del operón de biosíntesis del exopolisacárido soluble en agua de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*. Realizamos la secuenciación de los fragmentos específicos de DNA genómico, amplificados por PCR y posteriormente clonados. Asignamos funciones enzimáticas mediante un análisis bioinformático de la secuencia obtenida por analogías en la composición de aminoácidos con las proteínas existentes en las bases de datos.

La localización del operón de biosíntesis es cromosómica, encontrándose como una única unidad policistrónica de un tamaño aproximado de entre 10 y 12Kb en la que hemos definido 12 ORF probables. Determinamos la localización de las secuencias SD o RBS correspondientes a cada ORF. Localizamos todas las secuencias promotoras probables basándonos en la conservación de estas secuencias en procariontas. Hay un promotor probable en la región del principio del extremo 5' del operón y hasta tres promotores internos delante de los principales genes implicados en la biosíntesis propiamente dicha del polisacárido (genes que codifican glicosiltransferasas. Se determina también la posición de un único posible terminador transcripcional detrás de un ORF con similitud con un gen GDPD, localizado hacia el extremo 3' del mismo. Los dos últimos ORF son análogos a proteínas implicadas en procesos de transcripción con acción reguladora de la expresión.

La organización de los genes (ORF) es muy similar a las estructuras genéticas ya descritas para diferentes bacterias con interés industrial (*Xanthomonas sp.*, Bacterias del

Ácido Láctico, *Pseudomonas solanacearum*, etc) en las que se distinguen una región central con las enzimas esenciales en la biosíntesis del EPS, las glicosiltransferasas (ORF3, ORF6, ORF7, ORF8, ORF9), que están flanqueadas por a ambos lados por regiones genéticas con similitud con proteínas implicadas en la polimerización o determinación de la longitud de la cadena, enzimas liberadoras del oligosacárido (ORF10) del transportador lipídico, moléculas transportadoras (ORF4) o proteínas que juegan un papel esencial en la transcripción (ORF 11-12). Existen también zonas no codificantes (entre ORF1 y ORF2, sector 5), que no tienen homología con ninguna proteína, pero que pueden contener secuencias de unión a DNA u otras proteínas con función reguladora.

5. 2. – Introducción

Para abordar el estudio genético de la biosíntesis de exopolisacáridos es necesario establecer conceptos básicos relativos a los biopolímeros microbianos de esta naturaleza.

5.2.1.- Exopolisacáridos microbianos (EPS).

Naturaleza de los EPS.-

Los microorganismos producen polisacáridos de tres tipos distintos: extracelulares, estructural y formas intracelulares de almacenamiento. Los EPS como su nombre indica son polisacáridos de alto peso molecular que son exteriores a la célula microbiana, pudiendo encontrarse bajo dos formas: (a) como cápsula, formando capas mucosas que están firmemente unidos a la pared celular; (b) disociados totalmente de la célula y que se acumulan en grandes cantidades fuera de la pared celular y se difunden en el medio de crecimiento (Sutherland, I. W. 1972).

Los EPS pueden ser producidos por un amplio número de microorganismos, tales como: arqueas, bacterias, algas unicelulares, levaduras y hongos. (Kang y Cottrell, 1979).

Los EPS como tal, normalmente no contribuyen a la estructura microbiana, resultando que los otros componentes de la superficie celular permanecen inalterados si éstos están ausentes; sin embargo cumplen una función biológica y ecológica importante. Muestran considerable diversidad en su composición química, estructura, propiedades físicas y organización en la superficie microbiana; algunos de estos polímeros pueden tener similitud química con los componentes de la pared celular, pero la mayoría son estructuras distintas totalmente no relacionadas con los constituyentes celulares (Sutherland, 1990).

Las dos formas de polímeros extracelulares pueden ser distinguidas al microscopio óptico a través de las técnicas de tinción negativa, entre las cuales la más práctica y sencilla es el procedimiento de tinta china desarrollado por Duguid (1951). Recientemente muchos investigadores están empleando técnicas modernas y sofisticadas, como la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para estudiar la naturaleza del polisacárido y la forma en la que son excretados de la célula. Pero dichos métodos necesitan un mayor desarrollo, ya que si bien nos indican su presencia, no es posible relacionar la naturaleza de las fibras visualizadas en el microscopio electrónico con las propiedades químicas y físicas de los exopolisacáridos (Broker, 1976; Bayer y Turrow, 1977).

Además del hecho de que los polisacáridos capsulares puedan estar covalentemente unidos a la pared celular, la naturaleza de la unión ha sido difícil de identificar en muchos casos, no estando dilucidados totalmente dichos aspectos. Una fracción de diacil glicerol que se cree esta involucrada en el enlace de superficie, ha sido encontrada en *Escherichia coli* K(L), y *Neisseria meningitidis* (Gotschlich *et al.*, 1981; Schmidt y Jann, 1982; Jann y Jann, 1987). También se ha sugerido que diferentes lípidos unen el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b, a la superficie celular (Kuo *et al.*, 1985) y este tipo de mecanismo de enlace podría ser común en bacterias Gram negativas. Por otro lado en una cepa de *Aerobacter aerogenes* no se ha encontrado ningún componente que pudiera estar involucrado en el anclaje del polisacárido capsular quedando por establecer si existen interacciones iónicas o de otro tipo para mantener la unión de éste a la célula (Troy *et al.*, 1970).

5.2.2. Estructura de los exopolisacáridos.

El significado de los términos *estructura primaria* y *secundaria*, en referencia a la estructura de los exopolisacáridos es similar a su significado en referencia a las proteínas. Hasta hace poco, las descripciones de los polisacáridos habían sido confinadas a su estructura primaria, es decir, a su identidad, secuencia, enlaces y configuraciones anoméricas de todos sus residuos monosacáridos, y la naturaleza y posición de algún otro sustituyente; recientes trabajos han indicado la importancia de considerar los niveles superiores de las estructuras de los EPS (Rees y Welsh, 1977). La estructura secundaria de los polisacáridos está asimismo determinada por el rango estrecho de orientaciones relativas que los residuos de monosacárido describen en torno a los enlaces glicosídicos, teniendo en cuenta que los enlaces covalentes entre azúcares adyacentes no son completamente flexibles; lo que permite que las cadenas de exopolisacárido adopten sólo ciertas formas, dependiendo por lo tanto de su estructura primaria (Morris *et al.*, 1977a).

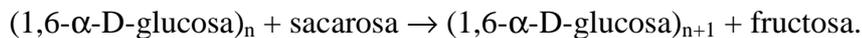
La estructura terciaria de los polisacáridos extracelulares es producto de interacciones energéticamente favorables entre cadenas, que dan como resultado estructuras en orden específico. Finalmente, tales estructuras compactas pueden interactuar entre ellas mismas, o con otros polímeros, para dar niveles de organización superiores, las cuales son descritas como estructuras cuaternarias (Powell, 1979).

5.2.3.- Biosíntesis de exopolisacáridos.

Los EPS bacterianos son sintetizados en diferentes fases de desarrollo y bajo una variedad de condiciones de crecimiento, dependiendo del microorganismo estudiado (Sutherland, 1985).

Los procesos biosintéticos involucrados pueden ser divididos dos principales categorías, basados en el lugar de síntesis y la naturaleza de los precursores:

Síntesis fuera de la célula.- Sólo dos polímeros de importancia industrial son sintetizados extracelularmente, el dextrano y el levano. Son homopolisacáridos y son formados por varias especies de bacterias. El dextrano es producido comercialmente empleando cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. En general, la síntesis involucra la adición de una unidad monomérica simple a la terminación no reductora de una molécula iniciadora de polisacárido y ocurre sólo cuando la bacteria tiene a la sacarosa como sustrato. La biosíntesis de glucanos requiere la hidrólisis de la molécula sustrato para liberar la fructosa, mientras el residuo glucosil es transferido a un apropiado aceptor, el mecanismo involucra la transferencia de la glucosa a la terminación no reductora de la cadena del exopolisacárido naciente. El aceptor se une al enzima y la reacción catalizada es:



El esquema, relativamente simple de la reacción para biosíntesis, se complica por la observación de que el polímero muestra un variable grado de ramificaciones y contiene enlaces α 1→3 y α 1→6. Las enzimas responsables tienen actividad glucosiltransferasa, cada una de las cuales realiza una discreta contribución al producto total (Sutherland, 1990).

Síntesis en la membrana celular.- La biosíntesis de los heteropolisacáridos es mucho más compleja que la de los homopolisacáridos. Se caracteriza porque se genera a partir de precursores intracelulares, tiene lugar en la membrana celular donde intervienen portadores intermediarios de naturaleza lipídica, es catalizada por sistemas multienzimáticos y se produce a partir de un amplio rango de sustratos (Whitfield y Valvano, 1993).

Sutherland (1990) divide el proceso de biosíntesis de los exopolisacáridos en cuatro secuencias principales: (1) captación de sustrato, (2) metabolismo intermediario, (3) formación de exopolisacárido, (4) modificación y liberación del EPS. Estas secuencias generales son lógicas y útiles para explicar la formación de los exopolisacáridos. A pesar de la carencia de una información biosintética completa, los

resultados de investigaciones sobre microorganismos relacionados pueden ser extrapolados para formar una hipótesis razonable para la biosíntesis de los exopolisacáridos, pudiendo ocurrir variaciones de acuerdo a la especie estudiada.

- (1) El sustrato ingresa en la célula por uno o varios, de los tres mecanismos siguientes: difusión facilitada, transporte activo o translocación de grupo, de acuerdo al tipo de microorganismo involucrado y sustrato (Roseman, 1972; Cerning, 1990, 1995; De Vuyst & Degeest, 1999).
- (2) El sustrato que ha ingresado a la célula es fosforilado transformándose en un precursor activado donador de grupos glicosilo; las enzimas involucradas en este paso (hexoquinasas), son citoplasmáticas pero en algunos casos puede estar relacionada con la membrana celular (Tolmasky, 1980; Sutherland, 1985).
- (3) La construcción de las unidades repetidas de residuos de monosacárido, se realiza a nivel de la membrana plasmática, por la transferencia secuencial de los grupos glucosilo apropiados a partir del precursor activado a un portador intermediario, el cual es un lípido isoprenoide alcohol fosfato (Troy, 1979). Cada paso es catalizado por una glicosiltransferasa específica.
- (4) Como última etapa ocurre la modificación y liberación del EPS formado. La acetilación de la unidad de repetición es catalizada por una acetilasa específica con acetil coenzima A como donador de grupos acetilo. La adición de grupos acetal cíclico de ácido pirúvico (carboxietilación) es catalizada por una cetilasa específica con el fosfoenolpiruvato como co-sustrato. Las reacciones de acetilación y carboxietilación ocurren durante la elongación de la cadena de oligosacáridos, mientras permanece unida al portador lipídico. En la mayoría de casos se ha demostrado que las reacciones de sustitución no son prerequisite para la biosíntesis del EPS y no necesitan ser consecutivas, por lo tanto no son estequiométricas (Ielpi *et al.*, 1983). El mecanismo exacto de la liberación del exopolisacárido

formado, desde la membrana celular hacia el extracelular, aún no ha sido determinado, muchas observaciones permiten establecer la participación de intermediarios de naturaleza lipídica y proteínas de membrana en el proceso. Se cree que los oligosacáridos nacientes, ligados a portadores lipídicos, atraviesan la membrana celular y son transferidos a aceptores endógenos, formados por cadenas de EPS en crecimiento en la pared celular, completando la polimerización, para luego ser liberado al medio por acción de depolimerasas específicas (Whitfield y Valvano, 1993).

5.2.4.- Genes de biosíntesis de exopolisacáridos.

En la mayoría de especies bacterianas hay muchas enzimas implicadas en el proceso global de biosíntesis de EPS, aunque no todos tienen porqué estar implicados exclusivamente en la formación de EPS. Los genes del metabolismo nucleotídico genes (*deo*) han sido detectados hacia el extremo 5' de los genes del EPS (*eps*) en *Streptococcus thermophilus* (Almiron-Roig 2001). La proximidad dichos genes hace especular sobre la existencia de mecanismos reguladores entre ambos fenómenos bioquímicos, la biosíntesis de EPS y el metabolismo nucleotídico (Kao & Sequeira, 1992).

Mientras que las investigaciones de los genes de polisacáridos en gram-negativas comenzaron hace aproximadamente 20 años (Sutherland 1985; Whitfield, C & Valvano M.A., 1993), en las bacterias gram-positivas ha avanzado rápido, pero sólo en los últimos años, en cepas patógenas (*Streptococcus pneumoniae* (Kolman *et al.*, 1997), *Staphylococcus aureus* (Lin *et al.*, 1994) y en microorganismos utilizados en alimentación (Stingele, *et al.*, 1996; Kranenburg, *et al.*, 1997).

Los genes *eps* están caracterizados por estar directamente involucrados en la biosíntesis de EPS, están todos localizados como una agrupación en el genoma, bien en el cromosoma como en *Xanthomonas campestris* (Barrere *et al.* 1986; Thorne *et al.* 1987; Harding 1987), *Xylella fastidiosa* (Silva *et al.*, 2001), *Pseudomonas solanacearum* (Huang & Schell, 1995), *Streptococcus pneumoniae* (Kolman *et al.*, 1996; Morona *et*

al.,1997), *Streptococcus thermophilus* (Stingele *et al.*,1996), *Bradyrhizobium japonicum* (Becker *et al.*,1998), genes localizados en plásmidos, como en *Lactococcus lactis* (Kranenburg *et al.*,1997; Kranenburg *et al.*,2000) o incluso en megaplásmidos como se describe para *Rhizobium meliloti* (Finan *et al.* 1986; Inés *et al.*,1986).

La organización general, dirección transcripcional y funciones deducidas de los genes de biosíntesis de EPS en diferentes agrupaciones parece estar altamente conservada. De acuerdo a búsquedas de homología, los genes parecen estar organizados in cuatro regiones funcionales (Stingele *et al.*, 1996): una región central con genes que muestran homología con glicosiltransferasas, dos regiones que flanquean la región central que muestran homología a enzimas que determinan la longitud de la cadena, procesos de polimerización y exportación y una región situada hacia el extremo 5' con función reguladora. Parece que la agrupación de genes de EPS son transcritos como una única unidad transcripcional, a pesar de la existencia en determinadas especies de promotores posibles internos (Almiron-Roig *et al.*, 2000). La ausencia de terminadores transcripcionales después de cada gen corroboraba la idea de un unico transcrito.

Las cepas bacterianas de EPS pueden perder su fenotipo mucoso tras sucesivas resiembras o después de tiempos de incubación prolongados a altas temperaturas (Forsen *et al.*,1973; Macura & Townsley, 1984). Este fenómeno puede ser indicativo de la inestabilidad genética en la producción de EPS en determinadas bacterias, cuyo mecanismo no está bien dilucido. Puede ser debido a pérdida de plásmidos, cuando se sabe que los genes de EPS tienen localización plasmídica (Macura & Townsley, 1984; Neve *et al.*,1988) pero que puede ser debida a los elementos genéticos móviles como las secuencias de inserción (IS) o a una inestabilidad genómica generalizada, que incluya deleciones y reagrupamientos. Ambos fenómenos fueron observados y descritos, por ejemplo, en *S.thermophilus* (Gancel and Novel, 1994; Stingele *et al.*,1996). El polimorfismo genético se puede producir por transferencias horizontales, o recombinaciones entre secuencias más o menos relacionadas, este hecho está demostrado en un estudio realizado también en *S. termophilus* (Vaughan *et al.*, en 1995;Charron-Bourgoing *et al.*,2001).

Las regiones más conservadas son la que codifican para glicosiltransferasa, el resto son variables. Podemos encontrar pseudo-genes, cuando contienen cambios en el ORF o códones de terminación. También existen los genes mosaico que tienen una alta divergencia con secuencias relacionadas (De Vuyst *et al.*,2001).

En todas las bacterias productoras de EPS, al igual que para las bacterias del ácido láctico, su rendimiento de producción depende de la composición del medio y de las condiciones de crecimiento (Deggest *et al.*,2001). La biodisponibilidad en el medio de los azúcares que formarán parte del oligosacárido contribuye positivamente a la biosíntesis de determinados EPS, si no, los microorganismos poseen rutas enzimáticas alternativas que favorecen la conversión de determinados azúcares necesarios, por ejemplo UDP-galactosa se puede sintetizar a partir de galactosa-1-P por la ruta de Leloir (Maxwell *et al.*,1962) o bien tras una epimerización desde UDP-glucosa. *Bradyrhizobium japonicum* posee las enzimas de la ruta degradativa de DeLey/Doudoroff (DeLey & Doudoroff 1957) que provee a las células de UDP-glucosa.

5. 3. - Objetivos

Justificación y planteamiento de objetivos:

La elección de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* para realizar el estudio de caracterización y localización genéticas implicadas en la biosíntesis de EPS atendía a los resultados de interés obtenidos en estudios previos, que globalmente conforman los objetivos de un proyecto global de biorremediación de residuos contaminantes de la obtención de aceite de oliva, mediante la obtención de nuevos recursos aprovechables (capítulo 1).

El biopolímero BP-7 es un heteropolisacárido constituido por dos fracciones, de elevado peso molecular y de tipo aniónico obtenido por fermentación de azúcares mediante un cultivo puro de *Paenibacillus jamilae*-cepa B7, posteriormente recuperado mediante precipitación con etanol, dializado, liofilizado y pulverizado. La estructura de

la cadena macromolecular está compuesta por unidades de monosacáridos, siendo mayoritarios siempre glucosa, galactosa, y manosa en diferentes relaciones según la fuente de carbono presente en el medio en el que se desarrolla la bacteria, también pueden contener otros monosacáridos en menor proporción arabinosa, ramnosa y en forma de trazas fucosa y xilosa. Contiene una pequeña proporción de ácido glucurónico y N-acetil glucosamina, conteniendo además grupos acetato, piruvato y sulfato. Las características y ventajas del producto en general, sus características reológicas, propiedades fisicoquímicas, su viscoelasticidad y gelificación sinérgica, junto a la determinación de su toxicidad, son parámetros que se han determinado con orientación a su utilización en la industria, donde podemos destacar su capacidad de gelificación sinérgica en la que los valores de sinéresis son mejores que para otras mezclas utilizadas en alimentación (Guerra, 1999).

Todos los ensayos preliminares de cantidad, estructura y composición química del EPS producido por la cepa B.7 de *P.jamilae*, en las condiciones de cultivo óptimas, junto a estudios de estabilidad, solubilidad y capacidades de modificar propiedades reológicas específicas le conferirían un probable carácter de utilidad en el ámbito industrial (Guerra 1999). Es también un biopolímero que carece de toxicidad alguna y por otro lado su demostrado potencial biológico (Ruíz-Bravo 2001), es una importante característica que le confiere poder inmunomodulador.

Así pues, por la mayor productividad específica de biopolímero y por el valor potencial a nivel industrial y biológico del biopolímero BP-7, nuestro estudio genético se centró en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*, para establecer las bases de planteamientos futuros de mejora genética de la cepa, planteándonos para ello los siguientes objetivos:

1. - Localización e identificación de los genes responsables de la biosíntesis de EPS en el genoma de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*.

2. - Caracterización de cada uno de los genes y elementos genéticos implicados en la biosíntesis de EPS en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*.

5.4. -Materiales y Métodos

5.4.1.- Localización e identificación genética del operón de biosíntesis del exopolisacárido en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*

5.4.1.1.- Búsqueda en las bases de bibliografía y las bases de datos del EMBL y GENBANK de los genes implicados directamente en la biosíntesis de EPS descritos en bacterias de interés.

- En primer lugar, realizamos una búsqueda bibliográfica, mediante la utilización de palabras clave o descriptores, en el bioservidor NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a través de su servicio de “Biblioteca Nacional de Medicina”, PubMed, que tiene acceso a 12 millones de citas de diversas revistas de ciencias de la vida, incluyendo nexos a muchas publicaciones que con acceso directo y a otras fuentes bibliográficas relacionadas.

Palabras clave o descriptores: Genes, operon, “cluster”, exopolisacárido, EPS, bacterias.

- En segundo lugar, una vez obtenida la relación de citas bibliográficas, seleccionamos aquellas referentes a bacterias de interés y en las que se hubiera realizado un estudio genético completo, ya que era uno de nuestros objetivos a realizar con la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*.

- En tercer lugar elegimos los genes esenciales de biosíntesis de EPS descritos para *Xanthomonas campestris*, por producir un exopolímero de gran interés industrial y por estar disponible y completo el acceso a las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos en las bases de datos. Localizamos su secuencia en los servicios del EMBL (European Molecular Biology Laboratory) (<http://srs.embl-heidelberg.de> - Nº de acceso U22511).

5.4.1.2.- Alineamiento local y alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes seleccionados e implicados en la síntesis de EPS . Diseño de oligonucleótidos degenerados universales.

- **Alineamiento local.** Las secuencias de aminoácidos de los genes de biosíntesis de EPS en *Xanthomonas campestris* (**GumA** SWISS-PROT; [Q56767](#) , **GumB** SPTREMBL; [Q56768](#), **GumC** SPTREMBL; [Q56769](#) , **GumD** SPTREMBL; [Q56770](#) , **GumE** SPTREMBL; [Q56771](#) , **GumF** SPTREMBL; [Q56772](#) , **GumG** SPTREMBL; [Q56773](#), **GumH** SPTREMBL; [Q56774](#), **GumI** SPTREMBL; [Q56775](#) , **GumJ** SPTREMBL; [Q56776](#) , **GumK** SPTREMBL; [Q56777](#) , **GumL** SPTREMBL; [Q56778](#) , **GumM** SPTREMBL; [Q56779](#)) fueron utilizadas para realizar una búsqueda de homologías con secuencias similares contenidas en las bases de datos mediante la realización un alineamiento básico local **BLASTX 2.2.3** (Atschul *et al.*, 1997).

- Posteriormente elegimos de entre el listado de secuencias de aminoácidos similares de cada proteína, una vez obtenidos los BLAST de GumA, GumB, GumC, GumD, GumE, GumF, GumG, GUM, GumI, GumJ, GumK, GumL, GumM, un conjunto de entre 3 y 16 secuencias, concretamente aquellas proteínas que pertenecieran tanto a bacterias gram-positivas como a gram-negativas y que estuvieran alejadas entre sí filogenéticamente, para aumentar la probabilidad de divergencia genética.

- **Alineamiento múltiple.** Con las secuencias elegidas realizamos un alineamiento con el programa informático CLUSTALX, con el objetivo de encontrar las zonas conservadas o de máxima identidad entre todas las secuencias alineadas.

- Las secuencias de aminoácidos conservadas tras realizar el CLUSTALX, de entre 5 y 7 aminoácidos, nos servirían mediante la utilización del código degenerado, para diseñar la secuencia nucleotídica de los cebadores, con los que amplificaríamos directamente del genoma de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* mediante reacciones de PCR sobre los genes homólogos a los de biosíntesis de EPS.

5.4.1.3.- Extracción de DNA cromosómico y amplificación con las parejas de oligonucleótidos degenerados diseñados.

La extracción, purificación y cuantificación de DNA de *Paenibacillus jamilae*, cepa B.7, se realizó de acuerdo al método de Marmur de 1961 modificado según se especifica en el apartado 4.2.1 de materiales y métodos del capítulo 4. “Descripción taxonómica”.

La extracción de plásmido se realizó mediante métodos descritos en el manual de técnicas de biología molecular de Sambrook *et al.*, (1989) y con diferentes kits comerciales Gibco®, Quiagen®, atendiendo a sus indicaciones respectivas.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50µl, con ciclos de desnaturalización de DNA a 94° C durante 1 minuto, el anillamiento de los cebadores de forma específica, se realizó en los tres casos con una escalera de dos ciclos con T^a de anillamiento descendente desde 55° C hasta 50° C durante 1 minuto y elongación a 72° C el tiempo necesario en cada caso, se realizan 25 ciclos, para ello empleamos la polimerasa Amplitaq de PerkinElmer®. Los tiempos de elongación varían según el tamaño del fragmento amplificado que esperábamos en cada caso: DegGumC: 1 minuto; DegGumD: 30 segundos; DegGumE: 1 minuto.

Se trabajaba en todas las reacciones de PCR con un control positivo, uno negativo (ausencia de DNA), con sólo el cebador F y con sólo el cebador R para prever los fragmentos falsos positivos por uniones inespecíficas.

5.4.1.4.- Clonación, secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

- La clonación del fragmento amplificado por reacción de PCR y concentrado mediante el sistema Microcon-100 (Millipore), se realizó en el vector comercial pGEMT (Promega), de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. La secuenciación de un clon positivo se realizó con los oligonucleótidos SP6 y T7, en ambos sentidos.

- El análisis bioinformático se realizó, en primer lugar con la traducción de la secuencia nucleotídica a aminoácidos mediante el programa informático de análisis de secuencias genéticas GP versión 2.0, en los diferentes marcos abiertos de lectura.

Posteriormente se realizó una comparación local con las secuencias existentes de las bases de datos mediante un BLAST.

5.4.1.5.- Secuenciación completa de genes implicados en la biosíntesis de EPS de *Paenibacillus jamilae*.

Una vez localizado e identificado un fragmento de un gen de síntesis del exopolisacárido de *Paenibacillus jamilae* procedimos a la ampliación de la secuencia nucleotídica en ambas direcciones 5' y 3'.

5.4.1.5.1.- Búsqueda física mediante Southern Blot del agrupamiento cromosómico que contiene el fragmento de gen de biosíntesis de EPS identificado.

Para la búsqueda del cluster en el cromosoma bacteriano de la cepa B.7 y la ampliación de la secuencia nucleotídica flanqueante se procedió elaborando una sonda con los 113 nt conocidos, marcada con digoxigenina y rastreando el cromosoma completo con dicha sonda, mediante Southern blot.

- Elaboración de sonda marcada con digoxigenina.

La elaboración de la sonda no radiactiva se realizó mediante una reacción de normal de PCR, utilizando como molde el clon positivo de pGEMT con las 113pb ya identificadas como gen implicado en la biosíntesis del EPS, con los oligonucleótidos específicos:

113F: 5'-ATGAGTTTGGTGGGGCCGCGT-3'

113R: 5'-GCCCATCCCGATGCCGGGA-3'

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

La mezcla equimolar de los cuatro desoxinucleótidos (Promega) utilizada contiene uno de los nucleótidos dTTP, en la proporción de 1/3 sustituido por un nucleótido marcado con digoxigenina- dUTP* (Boehringer).

Para tener un control positivo de la reacción, realizamos de forma paralela una reacción de PCR con una mezcla equimolar de los cuatro desoxinucleótidos, sin marcar.

Se purificó la sonda mediante el sistema Microcon (Millipore) de tamaño de poro adecuado para sólo quedarnos con el fragmento de 113pb.

- Southern Blot:

- En primer lugar obtuvimos fragmentos de DNA cromosómico de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* con una batería de enzimas de restricción, que abarcaban un rango de corte amplio.

Las enzimas de restricción utilizadas, las condiciones de utilización y los tampones necesarios se describen en la siguiente tabla:

Tabla 5.1. Condiciones de reacción de las enzimas de restricción

Enzima Restricción	Casa comercial	Diana o blanco	Tampón	Tª de Incubación	Tiempo
Apa I	Biolabs	GGGCC`C	NEB4/BSA	25° C	2h.
Ase I	Biolabs	AT T`AAT	NEB3	37° C	2h.
Ava I	Biolabs	C`PyCGPuG	NBE4	37° C	2h.
BamH I	Biolabs	G`GATCC	NBE-BamH/BSA	37° C	2h.
Bgl I	Biolabs	GCCNNNNNGGC	NBE3	37° C	2h.
Bgl II	Biolabs	A`GATCT	NBE3	37° C	2h.
BstE II	Boehringer	G`GTNACC	B(azul)	60° C	2h.
Dpn I	Biolabs	GA`*TC	NBE4	37° C	2h.
EcoR I	Biolabs	G`AATTC	NBE-EcoRI	37° C	2h.
EcoR V	MBI-F	GAT`ATC	(blanco)	37° C	2h.
Hind III	Biolabs	A`AGCTT	NBE2	37° C	2h.

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

Hpa I	Biolabs	GTT ³ AAC	NBE4	37° C	2h
Kpn I	Boehringer	GGTAC ³ C	L(gris)	37° C	2h.
Mfe I	Biolabs	C ³ AATTG	NBE4	37° C	2h.
Noc I	Biolabs	C ³ CATGG	NBE4	37° C	2h.
Not I	Boehringer	GC ³ GGCCGC	H(rojo)	37° C	6-8h.
Pac I	Biolabs	TTAAT TA ³ A	NBE1+BSA	37° C	6-8h.
Pst I	Biolabs	CTGCA ³ G	NBE3	37° C	2h.
Sal I	MBI-F	G ³ TCGAC	(blanco)	37° C	2h.
Sma I	Biolabs	CCC ³ GGG	NBE4	25° C	2h.
Xba I	MBI-F	T ³ CTAGA	H(rojo)	37° C	2h.
Xho I	Boehringer	C ³ TCGAG	H (rojo)	37° C	2h.

Una vez obtenidos los fragmentos del cromosoma se separaron en varios geles de agarosa del 0,8 % (10 muestras por gel), durante toda la noche a 20V. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se expuso a la luz UV durante 5-10 minutos para favorecer la transferencia del DNA cortado a la membrana.

- **Transferencia del DNA a la membrana** de Nylon (Hybond H+):

Se realizó mediante el paso sucesivo de diferentes disoluciones con un sistema de vacío.

- **Revelado con un sistema colorimétrico.**

La transferencia y el revelado se realizaron de acuerdo a Sambrook *et al.*, 1986

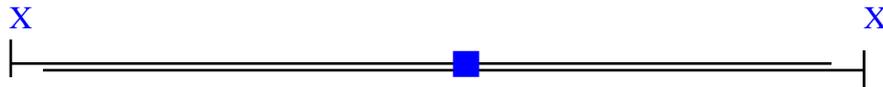
- **Análisis de los tamaños** mediante un software de análisis de los fragmentos. Realizamos una tabla que indica el tamaño estimado para cada fragmento que contenía en cada caso parte del gen marcado o su totalidad.

5.4.1.5.2.- Obtención de productos nucleotídicos adyacentes a la secuencia inicial amplificados por reacción de PCR inversa y/o PCR larga.

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

El método de PCR inversa consiste en la amplificación de secuencias de DNA adyacentes a una región de DNA conocida y localizada en el genoma (southern Blot), especificamos su desarrollo a continuación:

- Habrá “n” fragmentos resultantes de cada corte del DNA con las enzimas de restricción, sólo algunos contienen la secuencia ya identificada (recuadro azul).



- Reacción de religación. Se realizó una reacción de ligación con con $1\mu l$ de Ligasa T4 (New England Biolabs), con $1\mu l$ de tampón correspondiente, con $1\mu l$ de distintas diluciones de los productos de las reacciones de restricción: 1; 1:10; 1:20; 1:50 y 1:100, a un volumen final de $10\mu l$. Siguiendo las condiciones especificadas para dicha enzima: $16^{\circ} C$, durante toda la noche para favorecer la ligación.

Habrá “n” religados, entre los cuales deben existir aquellos que contengan el fragmento conocido de 113pb. Éstos serán las muestras con las que se realizan las reacciones de PCR inversa con oligonucleótidos diseñados en direcciones opuestas a la dirección normal para obtener un producto de PCR. El tamaño debe ser predicho en función de los tamaños obtenidos en el Southern blot para cada enzima de restricción.

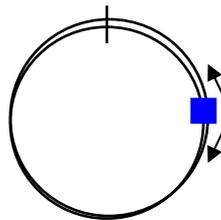


Tabla 5.2. Oligonucleótidos para las reacciones de PCR inversas

Oligonucleótido	Secuencia (Orientación 5'-3')	Producto de PCR	Tamaño pb
Inv120F	ATTCCAAAATACATGGTGAAG	Ase	600
Inv120R	TTCCTCACGGAAGTATCCAC	Mfe	1200
IHindIIIF(IPCR1)	CATGGGCATCCAGCGGAAGCGCC	HindIII	3500
IHindIIIR(IPCR2)	GGTTTGGCCTATACTAATGCGCGTGAAGC	EcoRI	5000

InvEcoRIF	CACTATCGCCTATTATAGCATACCG	InEco	2400
InvEcoRIR	CCGGAGTATTTATCCCTATCCATCCG	PstI	5800
InvkpnIF	CGCTAAGCAGAGTGTAAGC	Kpn	1200
InvkpnIR	GCCAAAACGAAGCATCGGAG		

- Para los fragmentos mayores de 2500-3000 pb se realizaron reacciones de PCR largas, que son específicas porque se realizan con una polimerasa capaz de amplificar sin error hasta más de 20000pb (XL-Polimerase de Perkin Elmer). Las reacciones con esta enzima se realizan a un volumen final de 100 μ l, en ciclos de dos pasos, desnaturalización a 95° C durante 30 segundos y anillamiento de oligonucleótidos y elongación juntos a la misma temperatura 72° C durante el tiempo necesario, aproximadamente 1 minuto por Kb a amplificar.

- En determinados casos, se secuenciaron directamente los productos de PCR tras su purificación y concentración con el sistema Microcon-100 (Millipore). En los que no fue posible la secuenciación directa, se hizo necesaria su clonación en pGEMT y posterior secuenciación con los oligonucleótidos SP6 y T7 y los oligonucleótidos internos diseñados una vez conocida la secuencia.

Posteriormente la secuencia fue ampliada y se diseñaron oligonucleótidos para nuevas PCR inversas en cada caso.

Con todos los datos de secuenciación de los fragmentos obtenidos por reacciones de PCR construimos de forma ordenada la secuencia nucleotídica total.

5.4.2.-Análisis y caracterización de la secuencia nucleotídica del operón de síntesis de EPS de *Paenibacillus jamilae*:

5.4.2.1.- Análisis bioinformático del operón.

Realizamos los siguientes apartados:

- Determinación de los posibles genes (ORFs) del operon mediante el programa informático GP.
- Localización de secuencias nucleotídicas de interés: SD o RBS en base a la secuencia terminal del RNA 16S de la cepa B.7 de *P.jamilae* . Localización de promotores (posiciones -35 -10 y +1) y terminadores transcripcionales.
- Representación gráfica del operón de biosíntesis de EPS.
- Análisis de restricción mediante el programa informático GP.
- Traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos.
- Análisis bioinformático para asignar funciones posibles a las proteínas, mediante la realización de un BLAST.
- Localización de secuencias y dominios conservados.
- Finalmente realizamos un esquema resumen de todo el análisis bioinformático.

5.5. – Resultados

5.5.1.- Localización e identificación genética del operón de biosíntesis del exopolisacárido en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*.

5.5.1.1.- Estudios genéticos implicados directamente en la biosíntesis de EPS descritos en otras bacterias de interés.

- Las primeras conclusiones de las estructuras genéticas completas de polisacáridos de interés industrial fueron realizadas sobre *Xanthomonas campestris* (Hötte, B., et al., 1990; Ielpi et al., 1993; Koplín et al. 1993), *Rhizobium meliloti* (Glucksmann et al., 1993), *Pseudomonas solanacearum* (actualmente *Ralstonia solanacearum*) (Huang y Schell 1995; Tseng et al. 1999).

- Hay estudios genéticos avanzados en bacterias en las que el EPS juegan un papel potenciador de las causas de enfermedades infecciosas, por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, (Kolman et al. 1996; Morona et al. 1997; Kolman et al. 1997). En otras especies bacterianas el EPS favorece asociaciones simbióticas y enfermedades en plantas, son por ejemplo *Bradyrhizobium japonicum* (Becker et al. 1998).

- En los últimos años se ha producido un avance espectacular en el estudio estructural, genético y funcional de los exopolisacáridos de bacterias del ácido láctico (BAL) por su gran interés en la industria alimentaria. Desde, por ejemplo, la caracterización molecular del EPS de *Lactococcus lactis* (Kranenburg et al. 1997; Kranenburg et al. 2000), cuya localización genética es plasmídica, *Streptococcus termophilus* (Stingele et al. 1996; Lemoine et al. 1997; Low et al. 1998) aumentando la posibilidad de mejora en la producción y calidad de EPS mediante ingeniería de Carbohidratos (Charron-Bourgoin et al. 2001; Vuyst et al. 2001).

- El número de acceso [U 22511](#) en el servidor del EMBL nos proporcionó la secuencia nucleotídica y su codificación en aminoácidos para cada uno de los genes del operón de biosíntesis de EPS de *Xanthomonas campestris*.

```
XC22511      standard; DNA; PRO; 16075 BP.
U22511;

U22511.1
15-APR-1995 (Rel. 43, Created)
04-MAR-2000 (Rel. 63, Last updated, Version 4)

Xanthomonas campestris GumA, GumB, GumC, GumD, GumE, GumF, GumG,
GumH, GumI, GumJ, GumK, GumL, and GumM genes, complete cds.

Xanthomonas campestris
Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Xanthomonas group;
Xanthomonas.

Referencia 1. 1-16075
Referencia [3]1-16075
Pollock T.J.;
Submitted (13-MAR-1995) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
Thomas J. Pollock, Shin-Etsu Bio, Inc., 6650 Lusk Blvd., Suite B106,
San Diego, CA 92121, USA
SPTREMBL; Q56768; Q56768.
SPTREMBL; Q56769; Q56769.
SPTREMBL; Q56770; Q56770.
SPTREMBL; Q56771; Q56771.
SPTREMBL; Q56772; Q56772.
SPTREMBL; Q56773; Q56773.
SPTREMBL; Q56774; Q56774.
SPTREMBL; Q56775; Q56775.
SPTREMBL; Q56776; Q56776.
SPTREMBL; Q56777; Q56777.
SPTREMBL; Q56778; Q56778.
SPTREMBL; Q56779; Q56779.
SWISS-PROT; O56767; IHFA XANCP.
```

Figura 5. 1. Resultado de la búsqueda bioinformática del operón de biosíntesis de *Xanthomonas campestris* en el bioservidor SRS del EMBL. Número de acceso U22511.

5.5.1.2.- Oligonucleótidos degenerados universales.

- **Resultados del alineamiento local**

Los resultados del alineamiento local de una proteína son unos listados resultantes de la comparación con todas las proteínas más similares encontradas en las bases de datos en orden sucesivo respecto al grado de similitud (%) del fragmento de secuencia comparable. En la siguiente tabla mostramos el acceso a cada uno de los BLAST completos de cada proteína de biosíntesis de EPS de *Xanthomonas campestris*.

Tabla 5.3. BLAST de cada uno de los genes *gum* de *Xanthomonas campestris*

Proteína de <i>Xanthomonas campestris</i>	Nº de BLAST
GumA SWISS-PROT; Q56767	BLAST: RID: 1031129573-012225-22960
GumB SPTREMBL; Q56768	BLAST: RID: 1031129769-015907-15288
GumC SPTREMBL; Q56769	BLAST: RID: 1031130011-020956-10574
GumD SPTREMBL; Q56770	BLAST: RID: 1031130145-023639-28787
GumE SPTREMBL; Q56771	BLAST: RID: 1031130228-025264-18311
GumF SPTREMBL; Q56772	BLAST: RID: 1031130509-0586-26567
GumG SPTREMBL; Q56773	BLAST: RID: 1031130595-01995-1243
GumH SPTREMBL; Q56774	BLAST: RID: 1031130727-04568-1341
GumI SPTREMBL; Q56775	BLAST: RID: 1031130792-05801-1207
GumJ SPTREMBL; Q56776	BLAST: RID: 1031130856-06891-1189
GumK SPTREMBL; Q56777	BLAST: RID: 1031130933-08320-30014
GumL SPTREMBL; Q56778	BLAST: RID: 1031131001-09466-24486
GumM SPTREMBL; Q56779	BLAST: RID: 1031131051-010302-1017

- **Resultados del alineamiento múltiple**

A continuación mostramos la selección de las secuencias proteicas de la lista general de cada BLAST (Tabla5.X) con las que se realizó el alineamiento con el programa CLUSTALX.

Tabla 5. 4. Secuencias proteicas utilizadas para realizar el alineamiento múltiple

Proteína	Denominación en bases de datos - Número de acceso	Organismo	
GumA	AAL42192.1 GI:17739583 AE009081.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
	AA1702428 GI:227370	<i>Bacillus caldolyticus</i>	
	BAB05028.1 GI:10173925 AP001511.1	<i>Bacillus halodurans</i>	
	1904151A	<i>Bacillus Subtilis</i>	
	BAB35842.1 GI:13361886 AP002558.1	<i>E. coli</i>	
	BAB35842.1 GI:13361886 AP003014.2	<i>Mesorhizobium loti</i>	
	CAD15285.1 GI:17428599 AL646065.1	<i>Ralstonia solanacearum</i>	
	A38173 GI:79156	<i>Serratia marcescens</i>	
	CAC45837.1 GI:15074190 AL591786.1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	
	BAB95227.1 GI:21204531 AP004827.1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	
	AAF94381.1 GI:9655703 AE004202.1	<i>Vibrio cholerae</i>	
	AAM41733.1 GI:21113616 AE012357.1	<i>Xanthomonas campestris</i>	
	AAF83553.1 GI:9105633 AE003916.1	<i>Xylella fastidiosa</i>	
	AAD53893.1 GI:5834289 AF176314.1	<i>Zymomonas mobilis</i>	
	GumB	CAB57195.1 GI:6009988 AJ243431.1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
AAL42247.1 GI:17739643 AE009086.1		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
AAD30002.1 GI:4808909 AF118249.1		<i>E.coli</i>	
CAA54880.1 GI:600428 X77921.1		<i>Erwinia amilovora</i>	
BAA04775.1 GI:747663 D21242.1		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
BAB54319.1 GI:14027726 AP003014.2		<i>Mesorhizobium loti</i>	
CAD18171.1 GI:17431493 AL646082.1		<i>Ralstonia solanacearum</i>	
CAC45812.1 GI:15074165 AL591786.1		<i>Sinorhizobium meliloti</i>	
BAA17224.1 GI:1652301 D90904.1		<i>Synechocistis sp. PCC 6803</i>	
BAC09320.1 GI:22295494 AP005375.1		<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	
AAF94098.1 GI:9655394 AE004176.1		<i>Vibrio cholerae</i>	
AAL28080.1 GI:16755721 AF427012.1		<i>Xanthomonas campestris</i>	
AAF85169.1 GI:9107546 AE004046.1		<i>Xylella fastidiosus</i>	
GumC		CAA75431.1 GI:2808460 Y15162.1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
		AAL45588.1 GI:17743306 AE009408.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	AAC04825.1 GI:2921558 AF039306.2	<i>Bradirhizobium japonicum</i>	
	CAB43868.1 GI:4972034 AJ238695.1	<i>E.coli</i>	
	CAA54882.1 GI:600430 X77921.1	<i>Erwinia amylovora</i>	

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

	BAB88845.1 GI:20086341 AB059427.1	<i>Gluconobacter xylinus</i>
	BAB49307.1 GI:14022698 AP002998.2	<i>Mesorhizobium loti</i>
	AAC33460.2 GI:8714527 AF067140.2	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
	CAC49486.1 GI:15140972 AL603645.1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
	AAD35728.1 GI:4981166 AE001738.1	<i>Thermotoga maritima</i>
	AAF94099.1 GI:9655395 AE004176.1	<i>Vibrio cholerae</i>
	AAL28079.1 GI:16755719 AF427011.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAF85168.1 GI:9107545 AE004046.1	<i>Xylella fastidiosa</i>
	AAK15032.1 GI:13183028 AF236053.1	<i>Zoogloea ramigera</i>
GumD	AAD34733.1 GI:4972659 AF131869.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	AAK87033.1 GI:15156281 AE008051.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	AAK80286.1 GI:15025338 AE007733.1	<i>Clostridium acetobutyllicum</i>
	AAC75108.1 GI:1788360 AE000295.1	<i>E.coli</i> K12
	BAB88843.1 GI:20086339 AB059427.1	<i>Gluconobacter xylinus</i>
	BAA04785.1 GI:747673 D21242.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	BAB54317.1 GI:14027724 AP003014.2	<i>Mesorhizobium loti</i>
	AAG05619.1 GI:9948256 AE004649.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	AAL21007.1 GI:16420636 AE008793.1	<i>Salmonella tiphymurium</i>
	CAC45810.1 GI:15074163 AL591786.1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
	AAC44071.1 GI:1314578 U51197.1	<i>Sphingomonas</i> sp. S88
	AAF94096.1 GI:9655392 AE004176.1	<i>Vibrio cholerae</i>
	AAA86372.1 GI:733145 U22511.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAF85166.1 GI:9107543 AE004046.1	<i>Xylella fastidiosa</i>
GumE	AAL02642.1 GI:15619144 AE008577.1	<i>Rickettsia conorii</i>
	AAA86373.1 GI:733146 U22511.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAF85165.1 GI:9107542 AE004046.1	<i>Xylella fastidiosa</i>
GumF	CAB13225.1 GI:2633723 Z99111.1	<i>Bacillus subtilis</i>
	AAK80982.1 GI:15026102 AE007801.1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
	CAC96225.1 GI:16413453 AL596167.1	<i>Listeria innocua</i>
	BAB48435.1 GI:14021824 AP002996.2	<i>Mesorhizobium loti</i>
	AAM31380.1 GI:20906192 AE013404.1	<i>Methanosarcina mazei</i>
	BAB57212.1 GI:14246820 AP003361.2	<i>Staphylococcus aureus</i>
	AAA86374.1 GI:733147 U22511.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAF85164.1 GI:9107541 AE004046.1	<i>Xylella fastidiosa</i>

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

GumG	CAB13225.1 GI:2633723 Z99111.1	<i>Bacillus subtilis</i>
	BAB48435.1 GI:14021824 AP002996.2	<i>Mesorhizobium loti</i>
	BAB57212.1 GI:14246820 AP003361.2	<i>Staphylococcus aureus</i>
	CAA55208.1 GI:581831 X78451.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAD31525.2 GI:5391444 AF147035.2	<i>Xanthomonas oryzae</i>
	AAF85164.1 GI:9107541 AE004046.1	<i>Xylella fastidiosa</i>
GumH	CAA64436.1 GI:1321690 X94981	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
	AAK05020.1 GI: 12723856 AE006326	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	AAM30838 GI:20905589 AE013343	<i>Methanosarcina mazei</i> Goel
	AAM37429.1 GI: 2108852 AE011898	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
	AAA86376.1 GI:733149 U22511.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAF85163.1 GI:9107540 AE004046	<i>Xylella fastidiosa</i>
GumI	BAA23165.1 GI:2588783 D49835.1	<i>Homo sapiens</i>
	AAM07108.1 GI:19917826 AE011087.1	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A
	AAM37428.1 GI:21108851 AE011898.1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
	AAA86377.1 GI:733150 U22511.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAD31527.1 GI:4877997 AF147037.1	<i>Xanthomonas oryzae</i>
GumJ	AAK88642.1 GI:15158365 AE008205.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	CAB15577.1 GI:2636086 Z99122.1	<i>Bacillus subtilis</i>
	CAA54890.1 GI:600439 X77921.1	<i>Erwinia amylovora</i>
	BAB36274.1 GI:13362319 AP002559.1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
	AAK04310.1 GI:12723068 AE006259.1	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	BAB51749.1 GI:14025148 AP003006.2	<i>Mesorhizobium loti</i>
	AAB95421.1 GI:2766551 AF040104.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	S40176 GI:628539	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
	AAM62295.1 GI:21552731 AF402095.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	AAA86378.1 GI:733151 U22511.1	<i>Xanthomonas campestris</i>
	AAF61109.1 GI:7340150 AF231923.1	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
	AAF85161.1 GI:9107538 AE004046.1	<i>Xylella fastidiosa</i>

- No hubo resultados positivos en todos los alineamientos realizados con todas las proteínas analizadas (GumA-GumM), es decir, no se encontraron zonas conservadas de entre 5 y 7 aminoácidos contiguos que nos permitiera el diseño de oligonucleótidos útiles en todos los casos, para la reacción de PCR.

- Los aminoácidos conservados mayoritariamente han sido MSIVGPRP y PGITGWAQ, están separados por un total de entre 23 ó 26 aminoácidos. La distancia equivalente entre ambas zonas conservadas corresponde a 114 ó 126 nucleótidos (media 120 nt). Los oligonucleótidos diseñados a partir de estas secuencias se denominaron DegGumD120F y DegGumD120R.

Alineamiento Gum E:

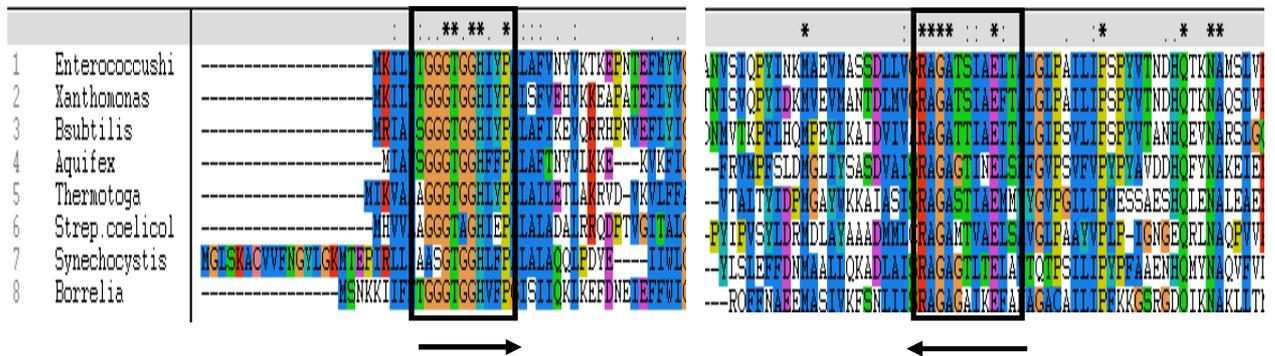


Figura 5.4. Alineamiento secuencias homólogas de GumJ, los recuadros enmarcan las zonas de máxima analogía. * aa idénticos; □ aa positivos y □ aa similares

- Los aminoácidos conservados mayoritariamente han sido SGGTGGH y RAGAGAI, están separados por un total de entre 262 ó 278 aminoácidos. La distancia equivalente entre ambas zonas conservadas corresponde a 835 nucleótidos máximo. Los oligonucleótidos diseñados a partir de estas secuencias se denominaron DegGumJ835F y DegGumJ835R.

*Los nombres de los oligonucleótidos o cebadores corresponden a **DegGumXN°F** o **DegGumXN°R**

Deg = Oligonucleótido Degenerado

GumX = La letra de la proteína inicialmente utilizada en los alineamientos local y múltiple.

N° = El tamaño en nucleótidos del producto de PCR esperado.

F: (Forward: Directo → Dirección 5'-3')

R: (Reverse: Inverso ← Dirección 3'-5')

Tabla 5.5. Oligonucleótidos degenerados diseñados sobre los alineamientos.

Cebador*	Secuencia de aa conservada	Secuencia de nt (Orientación 5'-3')
DegGumC570F	HVEAGLRS	CAYRTNGARGCNGGNYTNMG
DegGumC570R	SGGVQEE	GCYTCYTCYTGANNCCNCC
DegGumD120F	MSIVGPRP	HTNWSNYTNGTNGGNCCNMGNCC
DegGumD120R	PGITGWAQ	GCCCANCCNGTDATNCCNMGNCC
DegGumE835F	SGGGTGGH	RCNNGGNGGNACNGSNGGNCA Y
DegGumE835R	RAGAGAI	TCNGCNAYNGTNCYNGCNCCNSYNC

- Amplificación por reacción de PCR con los oligonucleótidos degenerados de fragmentos de genes homólogos a los de biosíntesis de EPS en el genoma de *Paenibacillus jamilae*-cepa B.7.

Tras la extracción de DNA genómico, cromosómico y plasmídico, no se reveló la existencia de plásmidos en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*, por ninguna de los métodos utilizados. Así la búsqueda de la localización del operón fue directamente sobre el DNA cromosómico, purificado y cuantificado.

Sólo obtuvimos un resultado positivo, que mostramos a continuación, de entre todas las reacciones de PCR realizadas. Con los oligonucleótidos degenerados DegGumD (tabla 5.3), obtuvimos un fragmento de ≈115 pb, que coincidió, según la distancia en aminoácidos (38- 42 aa totales) descrita en el análisis de las regiones conservadas (Fig.5.5).

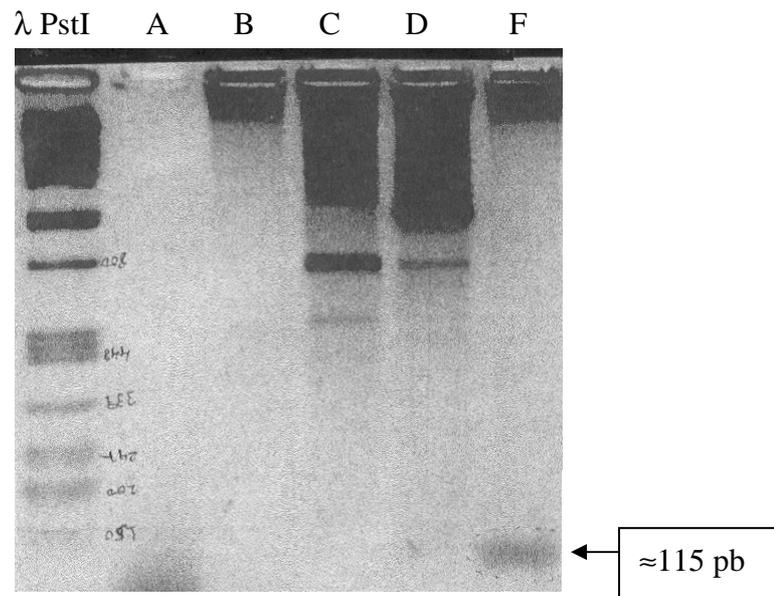


Figura 5.5. Análisis electroforético de las reacciones de PCR realizadas con los cebadores degenerados DegGumD120F-R. Gel de agarosa del 3,5%, A: control negativo, sin DNA, B: sin oligonucleótidos, C: con el oligo F solamente, D: con el oligo R solamente, F: Con la pareja de oligonucleotidos

5.5.1.3.- Clonación, secuenciación y análisis bioinformático de los fragmentos amplificados.

Los resultados de la secuenciación de un clon positivo de pGEMT en ambos sentidos de las cadenas mediante los oligonucleótidos SP6 y T7 corroboró el tamaño definitivo del fragmento de PCR y su composición específica en nucleótidos:

>Secuencia nucleotídica: 113 pb

ATGAGTTTGGTGGGGCCGCGTCCAGAACGACCCTATTATGTGGATCAGT
TCCGTGAGGAAATTCCAAAATACATGGTGAAGCATCATGTTCGTCCCGG
CATCACGGGATGGGC

>Secuencia Proteica: 37aa

MSLVGPRPERPYYVDQFREEIPKYMVKHHVRPGITGW

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

Los primeros datos concluyentes de que habíamos obtenido una porción de un gen implicado en la síntesis de polisacárido característico de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* fueron obtenidos en el BLAST, en el que encontramos que nuestra secuencia de 37 aminoácidos tenía valores de alta similitud con proteínas de biosíntesis de exopolisacárido en otras especies bacterianas. Las similitudes de mayor interés se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5.6. Similitudes en composición de AA del fragmento de 37AA de *P.jamilae*

Proteína (N° de Acceso)	Especie Bacteriana	Número de AA	Similitud (% Identidades- % Positivos)
Glicosiltransferasa (AF238861)	Lactobacillus rhamnosus	466	64-85
Transferasa envuelta en la síntesis de lipopolisacárido (AE007733)	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	461	58-80
Proteína de Biosíntesis de Exopolisacárido (AE001737)	Thermotoga maritima	408	56-77
Colanico-UDP-glucosa transferasa al transportador lipídico probable (AE000295)	<i>Escherichia coli</i>	464	54-75
UndecaprenilfosfatoGlucoFosfottransferasa WcaJ (AF131869)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	485	48-75
GumD (U22511)	<i>Xanthomonas campestris</i>	484	48-66
Glicosiltransferasa-Biosíntesis de CPS (D21242)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	465	52-71
Fosfo-prenol-glucosa-1-fosfottransferasa (X93149)	<i>Acetobacter xylinus</i>	532	47-59
UDP-galactosafosfottransferasa (AL139077)	<i>Campylobacter jejuni</i>	200	48-58
Proteína similar a las de biosíntesis de polisacárido (Z99121)	<i>Bacillus subtilis</i>	202	48-61
UDP-galactosafosfottransferasa (AJ243431)	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	203	47-63
Galactosiltransferasa exopolisacáridica (Z98171)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	227	40-58
Galactosil-1-fosfottransferasa (D90914)	<i>Synechocystis sp.</i>	243	38-63

Habíamos localizado e identificado parcialmente uno de los genes que participaban en la biosíntesis de EPS en la cepa B.7 de *P.jamilae*

5.5.1.4.- Secuenciación completa de los genes implicados en la biosíntesis de EPS de *Paenibacillus jamilae* y genes adyacentes.

5.5.1.4.1.- Búsqueda física mediante Southern Blot del agrupamiento cromosómico que contiene el fragmento de 113 pb identificado.

- Elaboración de la sonda marcada con digoxigenina

La sonda aparece en el gel con un peso molecular mayor que el control positivo debido a las inserciones de dUTP-digoxigenina.

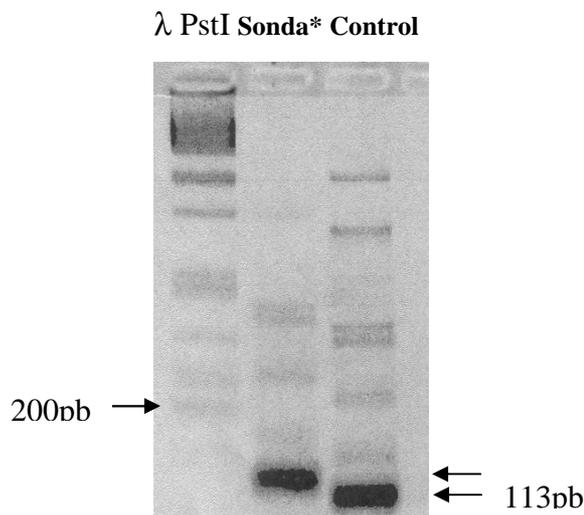


Figura 5.6. Análisis electroforético en gel de agarosa del 3,5% del marcaje con digoxigenina de la Sonda 113nt para Southern Blot.

- Southern Blot:

- Una vez obtenidos los fragmentos de restricción de DNA cromosómico de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* con una amplia batería de enzimas de restricción, se separaron en gel de agarosa (Figura 5.X), se transfirieron a una membrana de Nylon y se hibridaron con la sonda 113pb, dando una única señal en todos los casos(Figura 5.X).

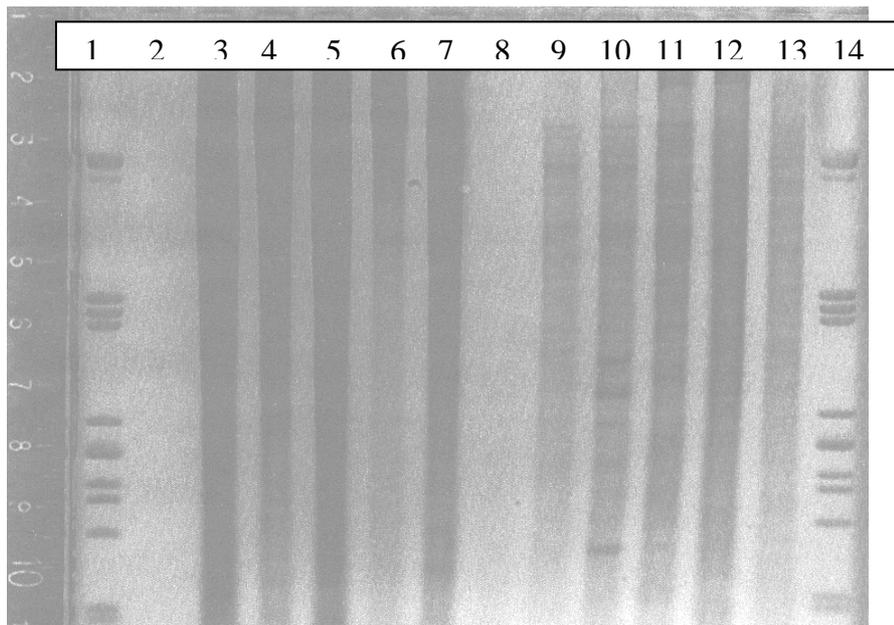


Figura 5.7. Gel en 0.8% Agarosa DNA cena B.7- *P. jamilae*

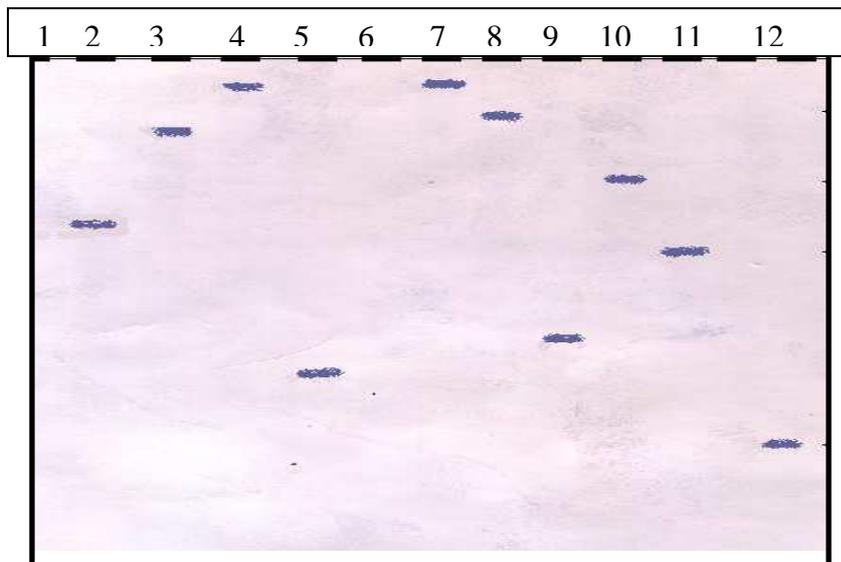


Figura 5.8. Southern blot con sonda 120nt-dioxigenina

Los tamaños de los fragmentos fueron estimados en orden a las distancias de los marcadores de peso molecular.

Tabla 5.7. Tamaños de los fragmentos obtenidos en los shouthern blot.

Enzima de Restricción	Tamaño del fragmento (pb)	Enzima de Restricción	Tamaño del fragmento (pb)	Enzima de Restricción	Tamaño del fragmento (pb)
BamHI	<200	EcoRI	6000	SalI	15000
AseI	790	EcoRV	6600	BglII	15000
MfeI	1300	PstI	9000	SmaI	≥23000
AvaI	1800	HpaI	10000	XbaI	≥23000
HindIII	4700	KpnI	11000	NotI	≥23000

- Ampliación de la secuencia genética mediante PCR inversa y PCR larga.

Se fueron realizando las PCR inversas con los fragmentos de restricción de tamaños predichos en orden creciente: AseI, MfeI, HindIII, EcoRI, PstI, KpnI. Los fragmentos de restricción con extremos romos (p.e. HpaI, EcoRV) o con posiciones versátiles (p.e. AvaI) no produjeron buenos resultados en la reacción de PCR inversa, podría ser debido a la menor eficiencia de ligación frente a la de extremos cohesivos.

Los productos de PCR que necesitaron la metodología y la enzima de PCR larga para la obtención de buenos resultados fueron los de HindIII, EcoRI, PstI, KpnI.

5.4.2.-Análisis y caracterización de la secuencia nucleotídica del operón de síntesis de EPS de *Paenibacillus jamilae*:

5.4.2.1.- Análisis bioinformático del operón localizado e identificado.

- Codificación de la secuencia completa nucleotídica y sus correspondientes aminoácidos.

- Presentamos a continuación la determinación de los posibles genes (ORFs) del operon mediante el programa informático GP. La localización de secuencias

nucleotídicas de interés: SD o RBS en base a la secuencia terminal del RNA 16S de la cepa B.7 de *P.jamilae* , los posibles promotores (posiciones -35 -10 y +1) y las secuencias terminadoras transcripcionales probables.

- Mediante el programa informático GP hemos determinado los posibles genes codificantes (ORFs), aparecen como podemos apreciar en la figura 5.9 ORFs mayoritariamente en fase de lectura 1 y en fase de lectura 2; en fase de lectura 3 existe un posible ORF coherente. Se indican mediante líneas perpendiculares hacia arriba los inicios (ATG) y hacia abajo las terminaciones de las proteínas probables (TGA, TAA). Hemos determinado también la secuencia de aminoácidos en las distintas fases de lectura, para establecer posteriormente, las similitudes con las proteínas ya descritas en las bases de datos.

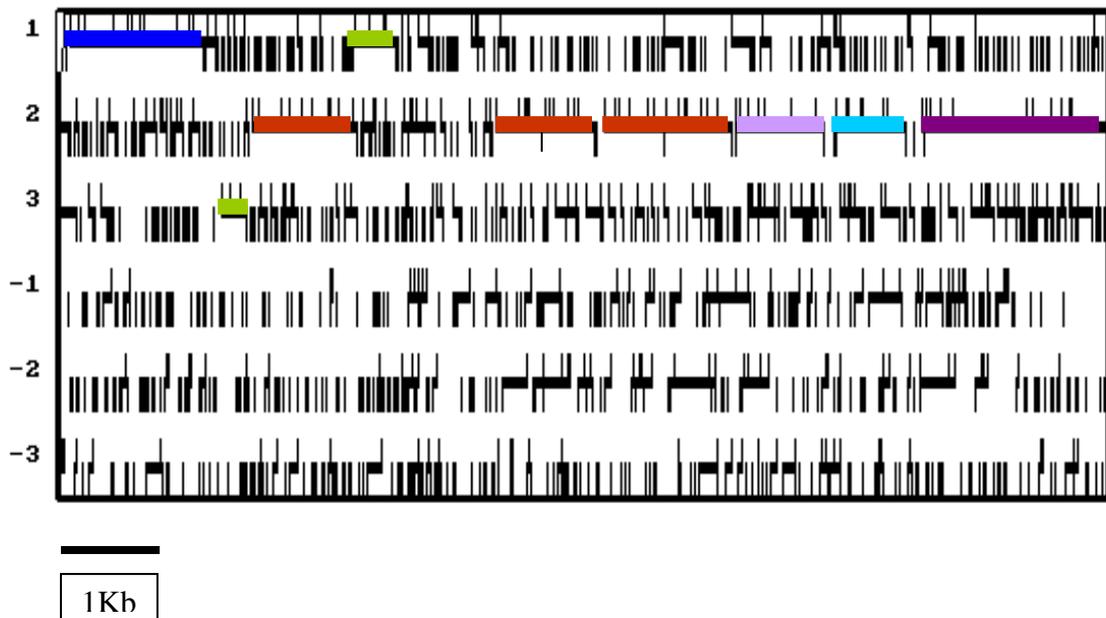


Figura 5.9. Análisis bioinformático con el programa GP de los posible genes en el operón de *Paenibacillus jamilae*. Fase de lectura 1: ORF1y ORF4. Fase de lectura 2: ORF3, ORF6-7, ORF 8-9, ORF 10, ORF 11 y ORF 12. Fase de lectura 3: ORF2.

Este primer análisis de la secuencia nucleotídica nos permitió establecer las posibles secuencias de unión del ribosoma o de Shine-Dalgarno (SD), por su posición inmediatamente anterior a la regiones probables codificadoras y también en función de

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

la secuencia terminal del 16S RNA ribosómico de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* (5'-AGGAGAAAA-3'). Además comprobamos las zonas promotoras, que encuentran en zonas genómicas no codificantes, delante de ORF definidas. Determinamos también, mediante este análisis, las posiciones relativas dentro del operón de las proteínas posibles y localizamos posibles terminadores. Las posibles zonas promotoras y las secuencias terminadoras coincidieron con zonas de secuencia de muy difícil secuenciación.

Para facilitar la revisión de la secuencia nucleotídica atender a los códigos de colores específicos:

Rojo: Codificación de los ORF con homologías con glicosiltransferasas.

Secuencias consenso de Promotores putativos dentro de secuencias reguladoras de color negro. La secuencia -10 recuadrada y la secuencia -35 subrayada.

Negro: Zonas no codificantes

Verde: Secuencias SD o RBS (secuencias de unión al ribosoma)

Naranja: Posible terminador transcripcional.

Cada coloración corresponde a un ORF obtenido por el análisis informático basado en el código genético general.

Subrayados del mismo color que el ORF: oligonucleótidos PCR inversas

Figura 5.10. Secuencia nucleotídica completa 5'-3'

```
GCCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTGGGCAAATCTGGTAGCCA      60
CACGCGGCGGAGATAGATCTATTGGTTGTAACGCTTATGATTTTCTCTTTCAGTGGAGTG    120
GTGTTTCACAGCTTGATAGGTTACCTTGATGGAGTTGGTCTCATACTGTTATGATGCTG      180
TATCTTCTGCTGTATAAAAAGAAAATCCAATCACTGAGTGTTCAGGATATTATAATTATG    240
```

M

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

GTTAATTTACTGATCTCACCTGCTTTTTTTCGCGAGATGGTATTCTTATTTTCGTAGTATCT 300
V I L L I S P A F L R R W Y S Y F V V S

TTTTTCGCGAGCAGTATTTATCACTAAACTCATTAAAGGCCCTTTGGGATAAGCAATATGGG 360
F F A A V F I T K L I K A L W D K Q Y G

TTAAAGGACTTTATTCGCGAGTGTTCAAAAGTGTGGTAATTGGAGTAGGATGCTTGTTA 420
L K D F I R S V S K L F V I G V G C L L

GTATTATTTTATTTTCAAGTCTTTTATTTTGCTTAGTATACGTGACGTAGGCAAAGGG 480
V L F L F F K S F I L L S I R D V G K G

GTATATGAGTATAACAATCATCCTCCTCTGGATAAATTTATTGAAATGTTAATTATTTTC 540
V Y E Y N N H P P L D K F I E M F N Y F

GGTTTAATTACTATTATTTTGGTATTAAGTGGGCGAGTTATTGGTGTTCCTTTAAAAAG 600
G L I T I I L V L T G A V I G V A F K K

ACTCGATATTTGCTATTTTCTCAATATTACAGAGCTGCTTCGCTTATCTATTAATAACA 660
T R Y F A I F S I L Q S C F A Y L L I T

TCGGAGCAGTTTATGTCTCCTCAGCATATTTTATTGGTATCAACAGGTATGATGGTGCTT 720
S E Q F M S P Q H I L L V S T G M M V L

GTTTTCTGAATTACAATTATGTACTTTTTAATAAAAAACGCTTTGTGCAATTTTCGGTA 780
V F L N Y N Y V L L I K K R F V Q F S V

CCCAAAATGAACTTGATCCTCAAAGTATTGCTTACACTCTGCTTAGCGATGAGTACGCTA 840
P K M N L I L K L L L T L C L A M S T L

TTTATAGCTAATGGTTATTTGCTTAATTTGCAAACCACTATTGGAAAAATTTCACTACTA 900
F I A N G Y F V N L Q T T I G K I S V L

CCGAAACACACAGAGCCTCGAGTTAAACAATGATATTGATGAGATCAAGGAAATAACTGAA 960
P K H T E P R V N N D I D E I K E I T E

TTTTTAAATAGTGTGTCAAGTCCAAGTAAACCTGTATATGTCATTTTCAGGAACCTGCTGT 1020
F L N S V S S P S K P V Y V I S G T C C

TATGATGATGTTTTTAAACAATTTGTATCTCCCTGATCAAAAAATGCATTAAACTATTTG 1080
Y D D V F N N L Y L P D Q K N A L N Y L

GCTCGTTCATCCTACAATGATGCTTTAGGATTTCAAATTTATTATTGAGGTCTGGGTTT 1140
A R S S Y N D A L G F P N L L L R S G F

GTTGTAGTAGTTGAACCAATTGTATCGAATGAAATGGTTGTTAGGAAAAGTCTGAGTAT 1200
V V V V E P I V S N E M V V R K T A E Y

TTCTCAATGGTCGATTTGATAATTATCCGTGATAAAGACAGTTAATTTGGTCGGTAAT 1260

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

F L N G R F D N Y S V I K T V N L V G N

ACAAAGTCACTATTTTTGAGCGTATGAGGCCATTTTCTAATTCTTCATTGCAAGCTCTA 1320
T K V T I F E R M R P F S N S S L Q A L

AATGAAATGCAAAAAGAATTTTTGACAGATATCCTGACAAAAAGAACTATATAAATTT 1380
N E M Q K E F F D R Y P D K K E L Y K F

CTGATTATAGAGTTAATATTTCAAAAACCTACTCTGGATTGCCTAGTGTGAAGTTAAGT 1440
L I I E L I F Q K L T L D C L V L K L S

TAACGCCGGATAGCATAACTATTCACCCTGGAGGAACCAACGATGTTCAAAGGTTTTTCC 1500
*

TATATAGAAGTAGATTACAAAAATCTCTTAAAAGATTGTCCTTTACAGCTTCTATGGAA 1560

ACGATATAGAAGTAGATTACAAAAATCTCTTAAAAGATTGTCCTTTACAGCTTCTATGG 1620

AAACGATAGATAAGGATATAGCTAGAATACCGGAAGCTGCAGAAGTATATTTAACAATTT 1680

TAGGGGATGGGAAACAGATGAAAAAGAGTATATTACAATTAACAACCTGAAGTATTCCG 1740

ATGTAGATATTTCTCAATATCAAAAAGTGGTGATTGAGTTGATAAGGGAAATTCTCAA 1800

TAATAATGATACTACTCAAATTAGTAATATTAATTTAAATGATGTTCTGATTTATTAAA 1860

CTATCAACATACTATGTATAGAAAATAAATTTTCAAATACTGTCCGCTTTTATCGTAAA 1920

AGTATTTTTGAT TATAATGGTTTTCAATTTAAATAAATATTCTTGTAAGAAGGGGCTTC 1980
M V F N L N K Y S C K E G A S

TATGTTTAAACTATAACAATTCTTATACCTGCA TATAATGAAGAAGAGTTATTTACCA 2040
M F K T I T I L I P A Y N E E E V I Y Q

ACTTTATTCTCGTTAACCAGAGTAATTGACTCTATTACAGGTTATCATTTGAATTATT 2100
L Y S R L T R V I D S I T G Y H F E L L

ATTCGTAATGACGGAAGTAAGGATAACACGGTTGAAATTCTTAAAAATTTAGGTAAGAA 2160

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

F V N D G S K D N T V E I L K N L G K K

GGATAGAAGAATTTTCATTAGTGGACCTATCACGTAACCTTCGGAAAGGAGGTTGCGATGAT 2220

D R R I S L V D L S R N F G K E V A M I

TGCCGGATTAGATTTTTCCGTGGGGAATGCTGTTGTGATTATCGATGCAGATCTTCAGGA 2280

A G L D F S V G N A V V I I D A D L Q D

CCCTCCTGAATTAATTGTTGAGATGATTAATACTGGGAGCAGGGCTATGATGATATATA 2340

P P E L I V E M I K Y W E Q G Y D D I Y

TGCGAAGCGGGCAACCAGAGCGGGGAAACCTGGTTAAAAAATGGACAGCATCCAGCTT 2400

A K R A T R A G E T W L K K W T A S S F

TTATAAATTGCTTCAAAGAATGAGTAGAATTCCTATCCAAGAAAACACAGGGGATTTCCG 2460

Y K L L Q R M S R I P I Q E N T G D F R

ATTACTCGACAGGCGTTGTATCGAGGCGTTAAAACAGTTGAGAGAAACACAAAGGTATAC 2520

L L D R R C I E A L K Q L R E T Q R Y T

AAAAGGTATGTTTAGTTGGATTGGATTTACAAGAAGGAGATTTTATTCAATCGTGAICT 2580

K G M F S W I G F N K K E I L F N R D S

TCGTGCGGCGGGAGAAACAAAATGGAATTATTATAAGCTTTTAGATCTGGCTATTGAAGG 2640

R A A G E T K W N Y Y K L L D L A I E G

AATTACTTCTTTCACAACGGCACCTTAAGATTATCTGCAATGCTGGGGTATTTATTTTC 2700

I T S F T T A P L R L S A M L G V F I S

GATAGGCGCATTTTTTTTACATGATTTTTATCATAACTAGGACTCTTATTTTTGGAGGCTC 2760

I G A F F Y M I F I I T R T L I F G G S

TGTTGCTGGTTATGCTTCACTTATGACAGTAATTTTATTTCTTGAGGAATACAATTGTT 2820

V A G Y A S L M T V I L F L G G I Q L L

GTCTCTCGGTATTATTGGTGAATATCTAGGCAGAGTATTTAATGAAACCAAAGTAGACC 2880

S L G I I G E Y L G R V F N E T K S R P

ACTGTATTTGTCAAAGAGTATAACGATGGTAAGGGTGCTATCTCGGAACAAAAATATAT 2940

L Y F V K E Y N D G K G A I S E Q K Y M

GGAAAATAGATTCTCTCGGGGTCGGATATGAAATTAGGTAAGGAGCTTGTCAATTACGTT 3000

E N R F S R G R * M K L G K E L V N Y V

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

GTTTTTGGAGTTCTTACAAC TATTATAAATTTGATTATTTATGCCCTCTTTACAAAAGTA 3060
 V F G V L T T I I N L I I Y A L F T K V
 TTGGGTGCAGATTATAAGCTTTCTATCACTGTAGCTTGGTTGATATCTATGATATTTGCT 3120
 L G A D Y K L S I T V A W L I S M I F A
 TTTGTAACGAACAAGCTATATGTATTTAAAAAAATGACTCTCGATTAACCTCGTTGCCT 3180
 F V T N K L Y V F K K N D S R L T S L P
 AAAGAGTTCTCTTTATTTCTTCTGATCAGATTGTCATCTCTTTGCCTGGACTTCATTTTA 3240
 K E F S L F F L I R L S S L C L D F I L
 ATGATTGTGCTTATCCAAAATGTACGGATGAATGATATTCTAGCAAAAATTATTGTTAAT 3300
 M I V L I Q N V R M N D I L A K I I V N
 TTTATAGTTATAGCAGTGAATTACTTGGCAAGCAAATACTTGGTATTTATAAAAAAACA 3360
 V N K L L E I V K A L I N C R I L K I Q
 AGTGAATAAAATTATTGGAAATTGTTAAGGCTTTAATTAATTGCCGGATTCTCAAAAATACA 3420
 F I V I A V N Y L A S K Y L V F I K K T
 ATTAANAATGAACTAAATCCATATAAGTATGGCGAGCGCTCTATCTGCCGATGGCTTTCT 3480
 L K *
 AATTCGTTATGTTAAAT TATAAT GCTGGTGGCTCATGATTGATTGTTGTGTAATGGTGCA 3540
 TATTATCATTTTACACAGAATCAGCATGGGCGTTTCTTTACTCTTAACATACTCCATATG 3600
 TCATACTACTACAATCTATATTGGAACATAAGCACTATTTTCTGCATAATAGTAAACGA 3660
 GTTCTGAAGTTCAATACTCATGGCAAGTCGTAATTCATGTGGTTTTTTTGTTAATCCAGTG 3720
 GAGGATTAANAATGAAAGTATAAAGTTTCACTTCGATAATTGTTCAAGCGTGTACGCTT 3780
 TATTAGACATGACTATTTTATTAANAATACCATCGAATGCGTGTTCCTTTATGGAAAAATA 3840
 TAG TATAAT TGAAACGTGCAACCGATAGAGCTGCCAAGGGCGGTGGCTAACTCTCCGA 3900
 GGAGGGGGGTGAAGCCTGTGACAGTGTGAGGCGCTCAGTTAATGCTGACGTTCCGGG 3960

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

CGTTAATCGTCACTGTTAGAGTTTAACAAACGAAAATAGACCCGCCCCGCAAGGGAA 4020

NGGTCTATTTTCGGGCCTGATTGTTCCAAAACCGTCCGCTCTTGAGCGTTGGTTGCGCA 4080

GGGGCTGGCTGGCACCAGCCCTTTTTCCATGTATATCTTACCACGATGAATTTTAGACCT 4140

CAACCGAGGATTTTACAAAAATCTAATAAACGACTTCCAATGAACAATATATAGATCGAA 4200

ATGTTTTCGTTTGTCTATATTTGCACTTTGGAGCGACTGGAATCGAATTTTTTGAAATTC 4260

TGCTAACTATGTAAGGCTACAAGTTATGTGCTTTTTTTGCGCCCTGTGGTCTGCGCGGTAT 4320

GC TATAATAGGCGATAGT AGAATAGATTACTGAATTTGTCA GGAGCGTTTTAAAT ATGGA 4380

M D

TGTAAGCATACTGGTCGTCAACTATAATACATGTCAATTGACGCTGGATTGTTTGCAATC 4440

V S I L V V N Y N T C Q L T L D C L Q S

GGTGATGCGTCAAAGTCGCAGTACCGATATNAAGTGATTGTGATTGATAATCACTCCAG 4500

V Y A S K S Q Y R Y X V I V I D N H S S

TGACGGTCTGTTGAGGCTATTCGTGCTGCATACCCGGATATTACATTGATAGCTAATAA 4560

D G S V E A I R A A Y P D I T L I A N K

GGATAACACAGGTTTCGCCAAGGCGAACAATCAGGGGATGGAAGTAGCCAGCGGGCGTTA 4620

D N T G F A K A N N Q G M E V A S G R Y

TGATTGCTGCTGAACTCCGATACGTTGGTGCAGCCGGATACGCTGGATACAATGATTCA 4680

V L L L N S D T L V Q P D T L D T M I Q

GTTTATGGACACGCATCCGAGATGGGGCATCGGGCTGTAAGGTCATCTTGCCAGATGG 4740

F M D T H P E M G A S G C K V I L P D G

CTCGCTAGATAAGGCTTGTAAGCGAGGATTTCCAACGCCGTCAGCTTCTTTTTACTACGC 4800

S L D K A C K R G F P T P S A S F Y Y A

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

TTTCGGCTGGTCGAAGCGTTACCCGGATAACCCGAAGTACAATCAATATCAGCTTGGGCA	4860
F G W S K R Y P D N P K Y N Q Y Q L G H	
TCTAAGCCCGACGATGAGTATCCTGGATGTACTGGTAGGTGCTTTTATGCTGGTGGCGCG	4920
L S P T M S I L D V L V G A F M L V R R	
AGAGACAATTGACCAGGTGGGGGCTTGGACGAAACCTTTTTTATGTATGGTGGAGATAT	4980
E T I D Q V G G L D E T F F M Y G E D I	
TGACTGGTGTNACCGGATTAAGCAAGCCGGTGGGGCATTACTACTACCCGCGCACATA	5040
D W C X R I K Q A G W G I Y Y Y P R T Y	
TATTATTCATATCAAAGGGGGCAGCGCTCGCCGTCGTCCTTTGAAAATTATTTATGAGTT	5100
I I H I K G G S A R R R P L K I I Y E F	
TCATAGAGCTATGTGGGTATTTTCATCGTAAGCATTATAAACAGCAATACAGTTGGATCAC	5160
H R A M W V F H R K H Y K Q Q Y S W I T	
CAATATGGCTGTATATGCGGGAATTACGGTGAAGTTTGGAAATGGCCTTTCTAAAAAATAA	5220
N M A V Y A G I T V K F G M A F L K N K	
GTTGTCTGCACCGGTCAAGCCGGACAGCGGGGAACAATCTCGTACTGAGGGAAAGCATGA	5280
L S A P V K P D S G E Q S R T E G K H D	
TACGCAGAAATCAGCGTTTTTTAACCCAATTATATATTGTGGCGGATTTGCGGGTCATTC	5340
T Q K S A F F N P I I Y C G G F R G H S	
AGTTGTCCTTTCTGATCGCTTGGTTTTTCAAATTTGAAGTGAAGGATCACCTATAAAGA	5400
V V L S D R L V F Q I *	
NCCGCTTCCTATTCAAGTATATGGAGGCTGGAGCTTAATCTACGGCCTGATTGCCGTAGT	5460
GCTGGGAATGTTATTCTCGCTCTATTGCGCCAAACGCAAAAAACGATTTGCAGATGACGT	5520
M L F S L Y S P K R K K R F A D D V	
ATTCCGCGTCACCCAAATTCATATTGTTGGCCTGTTTCGTGCTGTTGAGTGTGATGTTCTT	5580
F R V T Q I H I V G L F V L L S V M F F	
CGTGAAGCAAATCGACATTTGCGGGTCTATCTGGCGATCTATATGGTTGAAATGTGCT	5640
V K Q I D I S R S Y L A I Y M V G N V L	
GCTTATTTGTTTTACCGGTTCTTTTTGAAGCAAGTTCTTAAAGCTCTCCGTCAAAAAGG	5700
L I L F Y R F F L K Q V L K A L R Q K G	

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

GTACAACAAGCAGTTCATGCTTATTCTCGGGGCGGGTACTCTAGGCCAACGATTTTATCA 5760
Y N K Q F M L I L G A G T L G Q R F Y H

TAATCTGGACAGTATCCTGATCTAGGATACGAGGTCGTGGGTTTTCTGGATGATAAGCG 5820
N L G Q Y P D L G Y E V V G F L D D K R

GCATTGGAGTGAAGAGGAAGCGGCGCATTCCGCCGATTCTTGAGGCCTTAGATCAATT 5880
H W S E E E A A H F R P I L G G L D Q L

GGAGGCTACGCTGTCGCGTCTGATGATTGACGAGGTCATTCTGGCGCTCCGCTGGATGC 5940
E A T L S R L M I D E V I L A L P L D A

CCATGATAAGTACCCCAAGATTATAAACATGTGTGAAAAGGCTGGAGTGCGCACGCTTAT 6000
H D K Y P K I I N M C E K A G V R T L I

AAATCCCTGACTTTTTTGGATTATTTGCCGGCTCGTCCGTAATTTGATAACTTTCAGGTAT 6060
I P D F F D Y L P A R P Y F D N F A G I

TGCCGATGATTAATGTACGGGATATTTCCACTGGATGTGGCGGGGAATCGATTGTTTAA 6120
A D D * M W R G I D C L N

CCGCTCTATTTCGATATTTTATTCTCTTTATTTCGGAATCTTTTGACGTTTTCCGATCA 6180
R L F R Y F Y S L Y S R I F W T F S D H

TTGCTGGCAGTGGCGAATTGGGTGTATGATCACATTCCAGAGGGGCCCTTCATTTTTAA 6240
C W Q W R I G C M I T F Q R G P F I F K

ACCAAGAACGGGTGGCTTTGAATCGTCNCAACCCTTCCGAATGTACCAAATTCGTTTCGAT 6300
P R T G G F E S X Q P F R M Y Q I R S M

GAAGGTGCTGCCTCCTGGAAGTGAAGATACGGGCTGGACGACTGCTAATGACCCAAGACG 6360
K V L P P G T E D T G W T T A N D P R R

CACACGTTTTGGTACTTTTATTTCGTAACGAGTCTCGACGAGCTGCCTCAATTTTTCAA 6420
T R F G T F I R K T S L D E L P Q F F N

CGTTCGCTGGGTGATATGAGTGTGTTGGTCCACGCCGAGAACGACCTATTATGTGGA 6480
V L L G D M S V V G P R P E R P Y Y V D

TCAGTTCGGTGGGAAATTCAAAATACATGGTGAAGCATCATGTTTCGCTGGAATCACA 6540
Q F R E E I P K Y M V K H H V R L E S Q

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

GGCTGGGCACAGACAAACGGCTTGCCTGGAGATACATCTATTGAGGAACGGATTAAGCAT 6600
A G H R A T A C V E I H L L R N G L S M

GACATCTTCTATATTGAGAACTGGTCGCTCTTATTTGATATTTAAAATTATTTCCGCACG 6660
T S S I L R T G R S Y L I L K L F S A R

ATTGCAACGGTTTCAAGAACGCGTATTAATACAGAAGCACCCCTTCGGTTTAGCCGGAGG 6720
F A T V S R T R I N T E A P F G L A G G

GTGCTTTTGCCTCTGGCAGTTGTTTTGAGCATGCGTATGTGGGGTATTGACCTGTACGAA 6780
C F C V W Q L F *

AAGGATGTGACACCCCATGAAACGATTGATTGTTTCGGTTATTCTTTTAATGTTAATCGG 6840
M K R L I V S V I L L M L I G

CACATTTTTACTGGCATACAAAGGAAAATCCACAGAAGAACATACTGGCTTTACCACGCA 6900
T F L L A Y K G K S T E E H T G F T T H

CCGTGTGATTTTCGCATGCCATGGGAGCCGTTGATGGTTTGGCCTATACTAATGCGCGTGA 6960
R V I S H A M G A V D G L A Y T N A R E

AGCGTTTGTGAAAATTATAAAAAAGGCAGCCGCGTATTCGAGGTCGACCTGATGTTTAC 7020
A F V E N Y K K G S R V F E V D L M F T

ATCGGATGGACAATTGGTGGCGCGCCATGAATGGACAGAATCTTTTACAGAGCAAATGCA 7080
S D G Q L V A R H E W T E S F T E Q M Q

ACAGGAAAATGCAGTTGCTACGGAACAGGGCGGAAAACCTTGGAGCTATCATCAATTTAA 7140
Q E N A V A T E Q G G K P W S Y H Q F K

GAACACTCCCATAACGGTTCTTATACCCAGTAGATTGGAAGGATGTATTGGATTTATT 7200
N T P I H G S Y T P V D W K D V L D L L

GGAAACATACCCGGATGCTTATATTGTGACCGATACGAAAGAAGCAGACCCCTGTCCAAT 7260
E T Y P D A Y I V T D T K E Q D P V Q I

CAAACAGTTGTTTGCGCAACTGACCCGTCAGGCACAGGAGAAAAACCCCGAGCTTTTGTC 7320
K Q L F A Q L T R Q A Q E K N P E L L S

CCGTATTGTTCTCAAATTTATAATGAAGAAATGTTGCGAACGTTACGGAGTATTTATCC 7380
R I V P Q I Y N E E M L R T L R S I Y P

CTATCCATCCGTTATTTATACGGTCTATCGCACAGAAGATAAGGACGACCAGATCATTCC 7440
Y P S V I Y T V Y R T E D K D D Q I I R

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

ATTTGTACAACAAAATGATATAACGGCAGTAACTTTACCAGAGAATCGGGTGAGTGGTGC 7500
 F V Q Q N D I T A V T L P E N R V S G A

TTTAGTGAAAAGTTTGCCTCAGGCAGGGCAGTGTGCTACGTAAATACCATTAATGAGTT 7560
 L V E S L R Q A G A V C Y V N T I N E *

GAAGGATGCGGCTGAGTATGAACAGATGGGTGTACGAGGTTTCTATACAGATAGTTTAAAC 7620

GGAAAAAGAACTTAGTGACGCATGTGGTTGTATGCGTTACGACCATGAGTTGTCTGAAC 7680

GGGGTGTCCCATTTGATACGAACAATTGACA CTTTTTAAGCACTATCATAGACTTAGCAT 7740

AGAACGCTTTTGGATATTGGAA TTCGGCTCGCCTGGATCATGACAAAAGCAATGAATGCT 7800
 M L

GGAGGAATGTGTGTTGGCAGATTCAATTC AATCATGGAGGCATGTGTTTAAGCTTGATCC 7860
 E E C V L A D S I Q S W R H V F K L D P

TGACAAGGAACTGGATGATGGTGGCTTGACGCCGTGTGTATGTCTGGTACGGATGCGAT 7920
 D K E L D D G A L D A V C M S G T D A I

TATGGTAGGAGGTTCCCTCAGGTATTACCTATGAAAATACGGTGGATTTGCTGTCCGAGT 7980
 M V G G S S G I T Y E N T V D L L S R V

TCCGCGTTATGAGGTGCCGTGTGTGCTTGAGGTGTCCGATCTGGAGGCTGTTGTGCCGGG 8040
 R R Y E V P C V L E V S D L E A V V P G

GTTTGATCTATATATGATTCCCATGGTACTAAATACTACTGACAGTAATTGGATTCTAGG 8100
 F D L Y M I P M V L N T T D S N W I L G

GCAGCACCAACGTGCGATTGAGCAGTTTGGTTATTTGATCCCTTGGGATTTGCTTGTGAC 8160
 Q H Q R A I E Q F G Y L I P W D L L V T

GGAAGGATATATTGTTTTGAACGGTGGTTCCACAGTTGCTAAGCTTACCGGAGCAGATAC 8220
 E G Y I V L N G G S T V A K L T G A D T

TTGCTGGGTGCTACATCAGCCGCTCATATGCACAGATTGCTGACAAGCTCATGCATCT 8280
 S L G A T S A A S Y A Q I A D K L M H L

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

ACCGATTGTATATGTGGAATATAGCGGTGCTTTTGGAGATATGGAGCTGGTGCAGAAAAT	8340
P I V Y V E Y S G A F G D M E L V Q K I	
ACATCGCAGTACGGAGCGCTCTCGTGTCTATACGGGGGAGGTATCGTGGATAAATCTAC	8400
H R S T E R S R V L Y G G G I V D K S T	
CGCGTTACAAGCGGCTGCCGTTTGTGACACCATTGTAGTAGGAAACATCATTATCGTGA	8460
A L Q A A A V C D T I V V G N I I Y R D	
CTTGGCGAAAAGCGCTGGAGACGGTAGCTGTGAAATTGGAAGTATAGAACGTGAATTTATG	8520
L A K A L E T V A V K L E V *	
GAAGCTCAGGAAAGGAGCATGCACGCATGCAATCAATAGATATACACGAAGCGGGTAGCT	8580
CGTCTTAATCCGCCTCAACGGATTGGATTACCTCGAATTCAGCATTGGATTCTCGGATC	8640
AATTGTCTGTCATTTCGAGCTGCATGAAGGATCTGAATATAGACACAAAAGTTTGACCCAA	8700
AGCGGTTCACTCTATGATGAGTACAGCTAAAAATGAACTGGCACTCCCGAAATGTATGAA	8760
M M S T A K N E L A L P K C M N	
CGTAAGATTGGCGACTATTTGAGGGGATTGTGGCGAAGGTATATACCAAGTACACAACG	8820
V R L A T I L R G L W R R Y I P S T Q R	
ACTCAAAAATAACAATTCTCTTGATTTTGATGATTTGATCATGGCAACGATTTCAGCTTTT	8880
L K N N N S L D F D D L I M A T I Q L F	
TAAAGAAGTACCTGAGGTACTGGACTTCTATCAGAAGAAATTTCAATACATTCATGTTGA	8940
K E V P E V L D F Y Q K K F Q Y I H V D	
TGAATATCAAGATACGAACCGTGCGCAGTACATGCTGTGCAAAATGCTGGCCGACAAGCA	9000
E Y Q D T N R A Q Y M L C K M L A D K H	
TCACCGGATTTGCGTAGTAGGTGACAGTGACCAATCCATCTATCGGTGGCGGGGGCGGA	9060
H R I C V V G D S D Q S I Y R W R G A D	
TATTAGCAACATTTTGAATTTTGAAGAGGACTACCCGGAAGCGCGCACCATTTGCTGGA	9120
I S N I L N F E E D Y P E A R T I L L E	
GCAGAACTACCGGTCCACCTCGAATATTCTCAATGCTGCCAACGAAGTTATTGGTCAAAA	9180

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

Q N Y R S T S N I L N A A N E V I G Q N

TACAGGCCGCAAGCCGAAAAAACTATGGACTGACAAAGAAGCGGAGCCAAGATTAAAGT 9240
T G R K P K K L W T D K E G G A K I K V

TTATCGTGCTGACTCTGAGCATGATGAGGGCTACTTTATCGCCTCCGAAATTCATAAGAA 9300
Y R A D S E H D E G Y F I A S E I H K N

TATTAATGCGGGCAAACCTATAGCCATCATGCCATTTTGTACCGTACGAATGCTCAGTC 9360
I N A G K T Y S H H A I L Y R T N A Q S

TCGGGTTGTCGAGGAAATTTGATTAAATCCGATATTCCTTACCAGATCGTGGCGGTAT 9420
R V V E E I L I K S D I P Y Q I V G G I

CAAGTTCATGATCGGAAGGAAATTAAGGATTTGCTGGCGTATCTTCGCCTGCTCTCAA 9480
K F Y D R K E I K D L L A Y L R L L S N

TCCTGACGACGACATCAGCTTGATCCGAATCATTAATGTGCCAAAACGAAGCATCGGAGA 9540
P D D D I S L I R I I N V P K R S I G D

CACAACCGTCGGCAAATTCAGGCAGTCTATCGACAAAAT TATAAT TATGGTGTACAAA 9600
T T V G K L Q A V Y R Q N Y N Y G V Q N

TGGAATTTCTTTAACTGCTGTATTTCGATGAGATTGAGCATGTTGGAGTAAGTGCAAAGGT 9660
G I S L T A V F D E I E H V G V S A K V

TACAAAGGCAGTAAAAGAATTCGCAGGTTTATTACACAATTGGGTAAATATGCAAGAGTA 9720
T K A V K E F A G L L H N W V N M Q E Y

TTTATCTGTTACAGAATTGGTAGAAGAAGTGATTGAAAAACAGGCTATCGCGATATGTT 9780
L S V T E L V E E V I E K T G Y R D M L

GAAAAATGAGCGTACGTTAGAAGCAGAAGGTCGTCTGGAAAACCTTAGATGAGTTTTTATC 9840
K N E R T L E A E G R L E N L D E F L S

TGTTACGCAAACATTTGAATCTCAAAGCGAGGATAAGAGCCTTGTTGCATTCTTAACAGA 9900
V T Q T F E S Q S E D K S L V A F L T D

CTTAGCACTTGTTGCAGATATTGATCGTGTAGATGAAGACCCAACCTGCTGGTGAGGAAGT 9960
L A L V A D I D R V D E D P T A G E E V

TATTTTAATGACGATGCACTCAGCGAAGGGTTAGAATCCCAGTTGTCTTTATTGTTGG 10020
I L M T M H S A K G L E F P V V F I V G

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

TTTAGAGGAAGGAATATTCCACATACTCGTTCTCTAATGGAAGAAGATGAAATGCAAGA 10080
L E E G I F P H T R S L M E E D E M Q E

AGAGCGTCGTCTTGCTTATGTAGGTATTACTCGTGC GGAAGAAGAGTTGTATTATCAAA 10140
E R R L A Y V G I T R A E E E L Y L S N

TGCACAAATGCGTACTTTATTTGGTAGAACAAAGTATGAATGCCGCATCGCGATTTATTAC 10200
A Q M R T L F G R T S M N A A S R F I T

AGAAATCCCGACAGAACTAGTAGAATCATTAAATGAAACAGCACCGAAGCGTGAAACTTC 10260
E I P T E L V E S L N E T A P K R E T S

GTTTGGTGCAAAAGGAAGAGTGGCAAGTAGCAGTAAAACGACAACTACAACACGTTCTCG 10320
F G A K G R V A S S S K T T T T T R S R

CTCAGCTTTCGCACGTCCTGCAGCTAAGACGACAGGCGGCGAACAAATTGGCTGGGCAGT 10380
S A F A R P A A K T T G G E Q I G W A V

AGGTGATAAAGCTTCCCACCAAAAATGGGGAGTCGGTACAGTTATAAGTGTAAGGTGA 10440
G D K A S H Q K W G V G T V I S V K G E

AGGTGATGCAAAAGAATTAGATATTGCGTTCCCAAGCCCAATTGGTGTTAAACGTTTGT 10500
G D A K E L D I A F P S P I G V K R L L

AGCAAAATTTGCACCTGTGACGAAACAATAG 10531
A K F A P V T K Q *

A continuación mostramos la composición de bases nucleotídicas y una tabla resumen con las posiciones relativas de todos los elementos genéticos encontrados en el análisis bioinformático.

Tabla 5.8.a. – Composición de bases nucleotídicas

Bases	A	T	G	C	N	AT	GC
Totales	3049	3218	2409	1850	5	6267	4259
Porcentaje	29.0	30.6	22.9	17.6	0.0	59.5	40.4

Tabla 5.8.b. - Posiciones relativas de los ORF, secuencias SD, promotores y terminadores probables.

Genes	Posibles RBS <u>5'AGGAGAAAAG3'</u>	Nt de Inicio	Nt de Fin
ORF1-2	AGGA	1-730	731-1456
ORF3	GAAAA	1937	2957
ORF4	GGAA	2968	3367
ORF5	GAAAA	3368	4370
ORF6-7	GGA	4373-4912	4912-5377
ORF8-9	GGA	5464-6072	6073-6748
ORF10	AGGAG	6799	7669
ORF11	GAAAA	7807	8464
ORF12	AGAA	8683	10531
Posibles promotores	P1: 220-245	P2: 1900-1950	P3: St: 4300-4350 y St2: 4380-4440
Posibles terminadores	T1: 7638-7660	-	-

- **Representación gráfica del operón de biosíntesis de EPS.**

Con el análisis anterior realizamos una representación gráfica de la estructura de los elementos contenidos en el operón de biosíntesis de EPS.

OPERON EPS DE *Paenibacillus jamilae*:

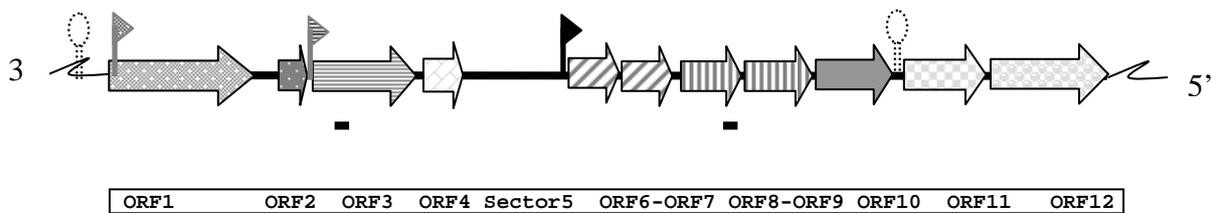


Figura 5.11. **Organización genética del Operón de genes *eps*.** Flechas: ORFs, los recuadros negros son las regiones utilizadas como sondas marcadas para los southern blot, los triángulos son los posibles promotores y los círculos son los posibles terminadores transcripcionales.

- **Análisis de restricción.**

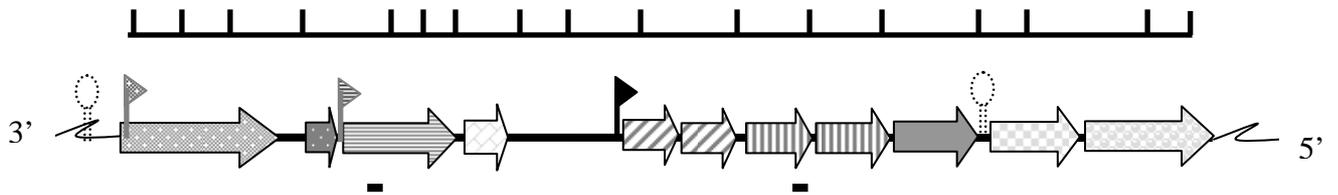


Figura 5.12. Análisis de restricción del operón de biosíntesis de EPS de *P.jamilae* .

A:AseI, B:BglII; Ba: BamHI; D: DndI; E: EcoRI; H: HindIII; M: MfeI; S: Sall;

- **Asignación de funciones posibles a las proteínas, mediante análisis bioinformático (BLAST).**

Los resultados con las máximas similitudes y con mayor coherencia (similitudes con las proteínas de bacterias de interés) son los que presentamos a continuación.

Tabla 5.9. Similitud de secuencias proteicas

ORF	Proteína(Nº de acceso)	Especie Bacteriana	Número de AA	Similitud (%Identidades- %Positivos)
ORF1	ATP sintasa	-	-	-
	Precursor de B-1,4 Endoglucanasa	-	-	-
ORF2	Factores de Transcripción	<i>Varias</i>	ND	ND
	DNA-topoisomerasa I	-	-	-
	SAM-Metiltransferasa	<i>Arqueobacterias</i>	243	23
ORF3	Glucosiltransferasa (AE012399)	<i>Xylella fastidiosa</i>	378	41-63
	Transferasa de azúcares (AE003871)	<i>Xanthomonas campestris</i>	367	44-67
	Similar a dolicol-fosfomanosa sintasa (Z99110)	<i>Bacillus subtilis</i>	323	42-67
	Bactoprenol-Glucosiltransferasa(U82619)	<i>Shigella flexneri</i>	307	41-60
ORF4	TransportadorBactoprenol-linked glucose translocase (U82619) GtrA-IV	<i>Shigella flexneri</i>	120	22-48
	Similar metal cations ABC transportador (permeasa) (AL596170)	<i>Listeria innocua</i>	280	31-47
	Transportador hipotético(AP000981)	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	418	29-54
	Proteína de simporte sodio:soluto(AE004571)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	463	31-49

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

ORF5 Promotor	(XM_129448) RIKEN cDNA 2310006M14 (AK009188)	<i>Mus musculus</i>	164	23-55
	(AC084762) putative transposon protein	<i>Oryza sativa</i>	865	29-58
ORF6	Biosíntesis de la cápsula polisacáridica (AE004176)	<i>Vibrio cholerae</i>	465	27-51
	Proteína GumD (AE004046)	<i>Xylella fastidiosa 9a5c</i>	484	23-46
	GumD(U22511)	<i>Xanthomonas campestris</i>	484	24-49
	Nucleosido-difosfato azúcar- epimerasa (AE013035)	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	623	24-47
	Biosíntesis de la cápsulapolisacáridica (AP001519)	<i>Bacillus halodurans</i>	608	25-45
ORF7 Glucó	Glicosiltransferasa(AE007732)	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	298	42-60
	Glicosiltransferasa (AE012166)	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913</i>	279	32-51
	Similar Glicosiltransferasa (AF498404)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	311	26-51
	Proteína de la familia de las Glicosiltransferasas (AE005719)	<i>Caulobacter crescentus</i>	308	29-46
	dTDP-Rha:a-D-GlcNAc- difosforilpoliprenol, a-3-L- rhamnosyl transferasa (AF187550)	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	296	24-46
	Putativa transferasa de azúcares(AF324836)	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	191	33-51
ORF8 Galacto	(AE012356) GumD protein [913]	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris str.</i>	484	40-57
	probable undecaprenyl phosphate Galactosephosphotransferase (AP003187)	<i>Clostridium perfringens</i>	220	54-70
	putative glucosyltransferase(AB059427)	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	444	42-56
	Cps2E(AF118389)	<i>Streptococcus suis</i>	459	65-74
	UDP-galactosa-lipid transferasa (X77921) carrier	<i>Erwinia amylovora</i>	477	49-68
ORF9 GDPD	Glicerofosforildiester fosfodiesterasa (AP004825)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2</i>	309	24-43
	Glicerofosforildiester fosfodiesterasa (NC_003995) GDPD	<i>Bacillus anthracis str. A2012</i>	287	23-43
	glpQ2 (Z96800)	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	256	32-43
	Glicerofosforildiester fosfodiesterasa (AE010490)	<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586</i>	261	19-40
	Glicerofosforildiester fosfodiesterasa (AP001513)	<i>Bacillus halodurans</i>	249	24-40

Parte III. Capítulo 5 Estudio genético del Exopolisacáridos de *Paenibacillus jamilae*

ORF10 PCRB	PcrB, Familia PcrB (NC_003995)	<i>Bacillus anthracis A2012</i>	229	51-70
	BH0647-Proteína desconocida conservada (AP001509)	<i>Bacillus halodurans</i>	229	48-68
	Proteína PcrB (Y15254)	<i>Bacillus subtilis</i>	228	50-70
	Proteína PcrB	<i>Staphylococcus aureus</i>	227	46-68
	Familia PcrB(AE011109)	<i>Methanosarcina acetivorans C2A</i>	247	26-45
ORF11 H	UvrD-helicasa, UvrD/REP helicasa (NC_003995)	<i>Bacillus anthracis A2012</i>	751	64-76
	ATP-dependent DNA helicase (AP001509)	<i>Bacillus halodurans</i>	747	62-74
	Similar a DNA helicasa ATP-dependiente (Z99107)	<i>Bacillus subtilis</i>	739	60-74
	DNA helicasa ATP-dependiente (AP003363)	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50</i>	730	58-69
	DNA helicasa ATP-dependiente (AL596170)	<i>Listeria innocua</i>	731	55-72

Hacemos ahora un resumen ilustrativo de las homologías de mayor importancia asignadas a cada ORF.

Estructura-función probable del operón de EPS de *Paenibacillus jamilae*:

ORF1-2: Homologías bajas con GENES DE REGULACIÓN, EXPORTACIÓN y POLIMERIZACIÓN

ORF3: TRANSFERASA de AZÚCARES

ORF4: ABC-TRANSPORTADOR-DEPENDIENTE DE ATP

: Zona reguladora-PROMOTOR

ORF6-7: GLUCOSIL/RAMNOSIL-TRANSFERASA

ORF8-9: GLUCO/GALACTOSIL-TRANSFERASA

ORF 10: GLICEROFOS-FORILDIESTER-FOSFODEIESTERASA



TERMINADOR TRANSCRIPCIONAL PROBABLE

ORF11: Familia PcrB, función desconocida

ORF12: HELICASA DEPENDIENTE DE ATP

- **Localización de secuencias y dominios conservados.**

El análisis bioinformático de los dominios estructurales de las proteínas nos permitió un nexo para establecer las regiones conservadas equivalentes a proteínas muy bien caracterizadas, para las que se han determinado sus estructuras tridimensionales y se permite visualizar mediante un programa informático Cn3D 4.0.lnk.

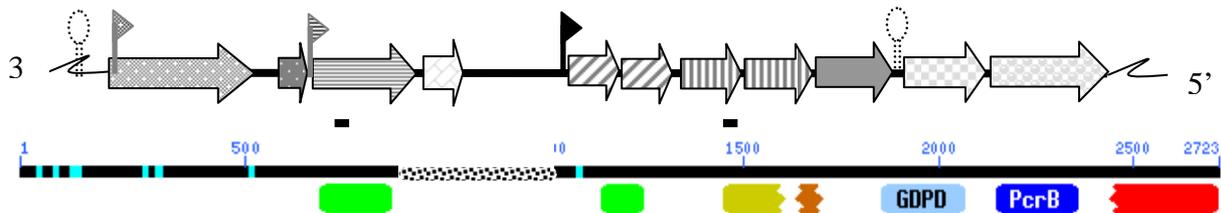


Figura 5.13. Dominios de secuencias conservadas

- Las zonas verdes vivo son las regiones conservadas que corresponden al extremo amino terminal de las posibles proteínas del ORF3 y ORF6, que están implicadas en la biosíntesis de la cápsula polisacáridica (pfam00535).
 - La de color verde ocre corresponde a la mitad de la zona aminoterminal del ORF8 (pfam02719), proteína conservada implicada en la síntesis de polisacárido relacionada con manosiltransferasas y epimerasas.
 - La zona marrón conservada corresponde a proteínas diversas que tienen regiones conservadas y están implicadas también en diferentes pautas de biosíntesis de polisacáridos (pfam02397).
 - La zona celeste GDPD (pfam03009) está claramente conservada y corresponde a proteínas con igualmente Glicerofosforildiesterfosfodiesterasa, con un plegamiento típico en barril TIM.
 - La región conservada representada en azul corresponde a una proteína de función desconocida, aunque conservada en diferentes especies, familia PcrB(pfam01884)
 - La región roja, representa un segmento proteico conservado correspondiente a una DNA-Helicasa dependiente de ATP(pfam00580)
- Presentamos a continuación dos de las estructuras tridimensionales conservadas también en

nuestra secuencia y que están accesibles a través de la base de datos para visualizarlas.

- La visión tridimensional de la estructura para determinadas proteínas está disponible en la base de datos mediante un programa informático Cn3D 4.0:



- ORF3: Con máxima similitud con manosiltransferasas y glucosiltransferasas ya descritas:

Glicosiltransferasas. Familia diversa, que transfiere azúcares UDP-glucosa, UDP-N-acetil-galactosamina, GDP-manosa o CDP-abequosa, a un rango de sustratos que incluyen celulosa, dolicol fosfato y ácidos teicoicos.

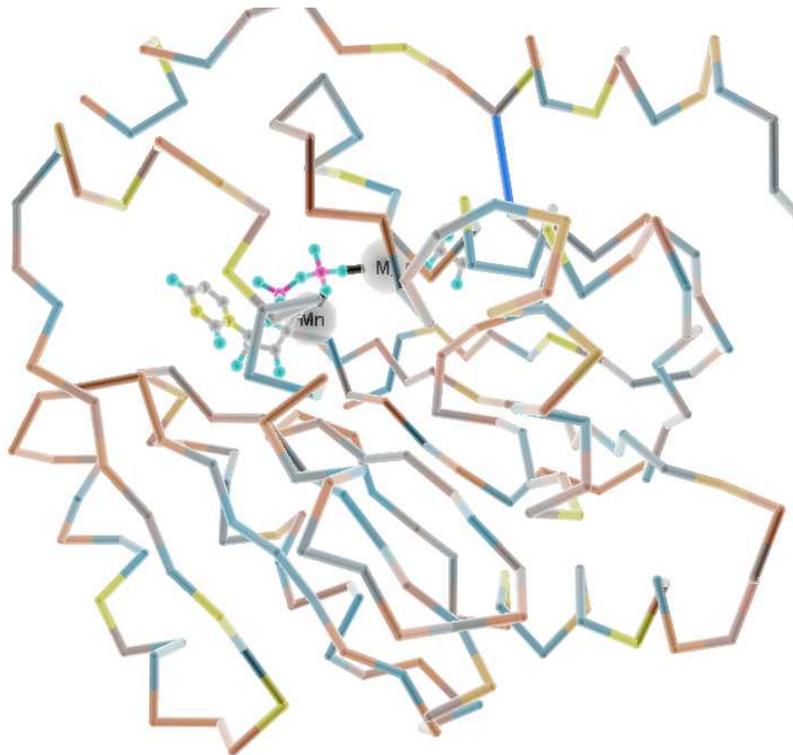


Figura 5.14. Estructura tridimensional de una manosil/glucosiltransferasa homóloga al ORF3 del operón de *Paenibacillus jamilae*K.

- ORF 12:

Helicasa

UvrD/REP helicase. La familia Rep de helicasas están compuestas por cuatro dominios estructurales. La familia Rep funcionan como dímeros. Helicasas REP catalizan el desenrollamiento de la doble cadena a cadena simple, utilizando ATP. Algunos miembros tienen grandes inserciones cerca del extremo carboxi terminal relacionados con otros en la familia.

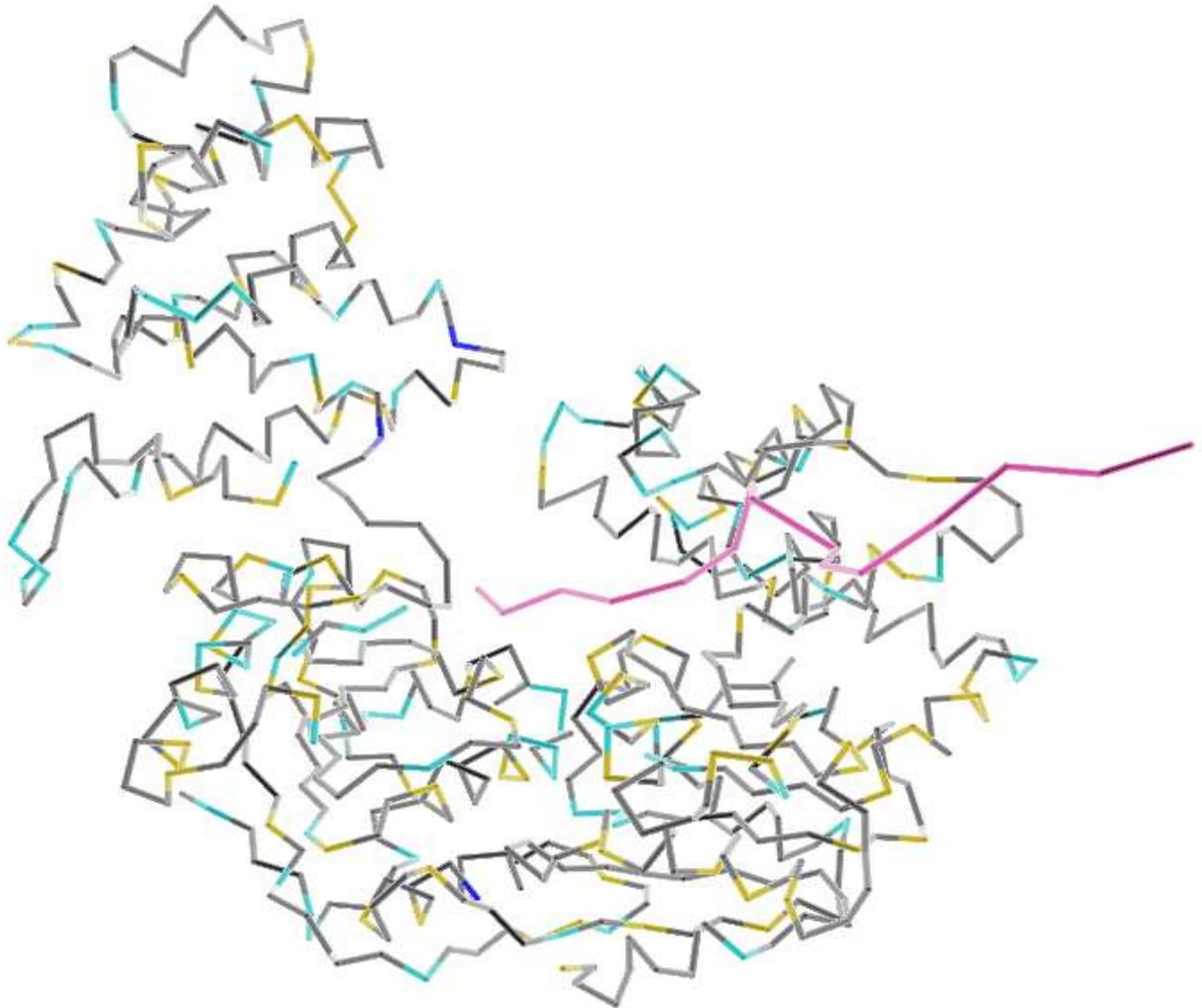


Figura 5.15. Estructura tridimensional de una helicasa homóloga al ORF12 del operón de *Paenibacillus jamilaeK*.

5.6.– Discusión

En la parte inicial del estudio del operón del EPS, hemos descrito el análisis estructural de una región pequeña de DNA de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*, la cual está implicada en la parte esencial de la biosíntesis de su EPS, dado que los porcentajes de identidad de secuencia de aminoácidos son suficientemente altos, variando entre los valores mínimo y máximo de identidad de 48- 64% y los porcentajes de positivos (aminoácidos que comparten estructuras y polaridad muy similares) entre un 66-85% para considerar una identidad de función enzimática (Tabla 5.2. Similitudes en composición de aminoácidos).

La ampliación de la secuencia de dicha región a ambos lados nos ha permitido localizar e identificar en el cromosoma de *P. jamilae* un operón de biosíntesis de EPS, constituido por 12 regiones bien diferenciadas y que constituyen los genes *eps*. La localización de la secuencia de nucleótidos que codifican proteínas de biosíntesis de EPS es característica de cada especie bacteriana, pudiendo estar localizados tanto en el cromosoma bacteriano (*Xanthomonas campestris*; *Pseudomonas solanacearum*) como en plásmidos (*Lactococcus sp.*) y megaplásmidos (*Rhizobium meliloti*).

El interés del estudio a nivel molecular de EPS de tan variadas especies ha evolucionado en la última década de forma espectacular, todas ellas con el objetivo de una caracterización genética, genética funcional, proteica y metabolómica de los EPSs (término puede ser utilizado para referir ambos tipos de polisacáridos externos CPSs y EPSs, según Sutherland, 1972), que permita en último término su perfecto entendimiento y consecuente manipulación biotecnológica para mejorar los procesos en los que estén implicados los EPSs.

La peculiaridad e interés futuro de este estudio genético en *Paenibacillus jamilae*, cepa B.7, es debida a la capacidad de crecimiento en un residuo tóxico alpechín, produciendo gran cantidad de EPS de interés industrial y biológico (Ruíz-Bravo, 2001), todo ello con miras biotecnológicas.

La función biológica del EPS en *Paenibacillus jamilae* podría constituir un fenotipo de resistencia, que permita la asociación con la superficie externa para formar una estructura de biofilm que prevalece como estructura microbiana frente a otras que no tienen dicha capacidad (Watnick y Kolter 2000). Otra función del EPS podría ser un mecanismo de defensa frente a los agentes tóxicos del medio de cultivo (ácidos fenólicos en alpechín), como por ejemplo en otras bacterias el EPS previene el ataque de fagos (Forde *et al.*, 1999).

El estudio de los CPSs y EPSs comenzó ligado a su papel en especies patógenas de animales (Boulnois and Roberts 1990; Rietschel *et al.*, 1999) como responsables de mecanismos de respuestas inmunes evasivas (*Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus pneumoniae* (Morona *et al.*, 1997), *Aeromonas hydrophila* (patógeno de peces). Otro de estos procesos de interés está ligado a un objetivo comercial, por la alta tasa de producción de EPS de determinadas especies bacterianas, como es el caso de *Xanthomonas campestris* (Ielpi 1993, Köplin 1993) productor del xantano, su estructura molecular ha sido objeto de continuas revisiones y manipulaciones (Wilson *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1999; etc) de amplia utilización en la industria alimentaria. *Acetobacter xylinus* productor de acetano. Con interés ecológico, desde el punto de vista del estudio molecular de las interacciones plantas-microorganismos, en las que el papel de los EPSs o CPSs es muy importante, como en el caso de *Rhizobium meliloti* (Glucksmann 1993; Petrovics 1993; Astete y Leigh 1996), ya que su EPS está implicado directamente en la formación de nódulos de la rizosfera de *Medicago sativa*. *Sinorhizobium meliloti* (Ruberg *et al.*, 1999), productor también de galactoglucano. También *Pseudomonas solanacearum* (Kao *et al.*, 1992) es un fitopatógeno importante cuyo EPS es parcialmente responsable de la letalidad del mismo, así se llevó a cabo el estudio del operón completo por Huang y Schell en 1995. En diversas especies pertenecientes a las bacterias del Ácido láctico, como *Streptococcus thermophilus* (Stingele *et al.*, 1996), *Lactococcus lactis* (Kranenburg *et al.*, 1997; 1999), se han determinado el papel de sus EPSs y la biosíntesis del mismo con objetivos moleculares. Otras especies en las que se han descrito estudios relacionados con la estructura y función de su polisacárido han sido especies probióticas de interés muy reciente *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* (Lamothe 2002),

Lactobacillus rhamnosus, que son bacterias GRAS y que pueden modificar propiedades de los alimentos que las contienen, precisamente por las características fisicoquímicas de su EPS.

El éxito de amplificación del fragmento de DNA cromosómico de *P. jamilae* con alta similitud con proteínas de la biosíntesis de EPSs, realizado con la pareja de oligonucleótidos DegGumD120F-R, frente a la ausencia de resultados utilizando las otras dos parejas de oligonucleótidos (DegGumC570F-R y DegGumJ835F-R) fueron un conjunto de factores tratados con la máxima minuciosidad y control. Por un lado la elección de secuencias de genes codificadores de proteínas esenciales (Glucosiltransferasas y Galactosiltransferasas (Stingele *et al.*, 1999)) conservadas en la gran mayoría de las bacterias productoras de EPS tanto Gram positivas como Gram negativas, incluyendo una gran variedad filogenética, por otro lado la elaboración detallada de cada oligonucleótido, evitando la degeneración innecesaria pero sí la suficiente para permitir cierta variabilidad y controlando que los oligonucleótidos de una misma pareja tuvieran las mínimas diferencias de Tm (relativo a su contenido a G+C) que van a determinar la temperatura de anillamiento en la reacción de amplificación en cadena desde el DNA cromosómico molde, el cual ha de estar en las mejores condiciones fisicoquímicas, de pureza y concentración. Estos parámetros se controlaron para las tres reacciones de PCR con los cebadores degenerados DegD120F-R, DegC570F-R y DegE835F-R, la única diferencia radicaba en el tamaño del amplicón esperado: 120nt, 570nt, 835nt respectivamente. El fragmento que obtuvimos fue el de menor tamaño (120 nt) y además único, sin inespecificidades, lo cual puede estar justificado, simplemente por la mayor facilidad de la polimerasa para encontrar los primeros amplicones, cuando el resto de los parámetros de amplificación no le son favorables (cebadores degenerados, temperaturas de anillamiento no exactas por la indefinición de la secuencia, tiempos no definidos, etc).

Los resultados de hibridación DNA-DNA utilizando como sonda el fragmento de 120 nt específicos de *Paenibacillus jamilae* cepa B.7, nos dieron una única señal en todos y cada uno de los ensayos con las distintas enzimas de restricción (DNA cromosómico cortado con 22 Enzimas de restricción) (Figura 5. Southern Blot), que era indicativo de una única y exclusiva localización cromosómica de dicho gen marcado u

homólogos. Para los genes responsables de la biosíntesis en otras especies bacterianas, la distribución genética es contigua (De Vuyst, *et al.*, 2001), lo cual es indicativo de que están en la misma unidad transcripcional, dando lugar a un RNA mensajero policistrónico.

EL contenido en G+C de la secuencia completa del operón analizada es del 40% aproximadamente, coincidente con el porcentaje de G+C descrito para la especie *Paenibacillus jamilae* en el capítulo de descripción taxonómica (Tabla 4.10.)

El tamaño predicho para el operón completo es aproximadamente de 10Kb-12Kb. La distribución general de los nucleótidos secuenciados del operón de EPS de *P.jamilae* es muy similar al de los operones de biosíntesis de EPSs (De Vuyst, *et al.*,2001) y se puede dividir en tres grandes regiones, de acuerdo a la similitud de secuencias aminoacídicas de los fragmentos codificantes (Tabla 5.9):

- Región 3' de aproximadamente 2 Kb: que engloba de forma general promotor fuerte inicial, transportadores y zonas de unión DNA-DNA, DNA-RNA y DNA-PROTEÍNA, todas ellas sin homologías definidas por no codificar para enzimas específicas con el objetivo de regular de la transcripción.

- Región central de aproximadamente 5 Kb, que contiene los genes de las proteínas esenciales en la biosíntesis propiamente dicha, es decir, codifica para enzimas específicas implicadas en la síntesis del oligosacárido, como unidad estructural fundamental del biopolímero.
 - o En esta región central podemos distinguir dos bloques transcripcionales, el primero hacia el extremo 3' que englobaría unas 1200pb, con una secuencia promotora putativa delante de una región codificadora con homología glicosiltransferasa, con su secuencia "Shine Dalgarno" o secuencia de unión al ribosoma precediéndola.
 - o La siguiente unidad transcripcional, dentro de la región central es de máximo interés, por su envergadura estructural, pudiéndose considerar como un elemento transcripcional autónomo dentro del operón, incluso

que es capaz de decidir la expresión del mismo (Se discutirá en el capítulo de funcionalidad enzimática y análisis transcripcional), contiene una región promotora putativa de un total de 1000pb, con múltiples posibles sitios de inicio (posiblemente entre 3 y 4), podría incluir secuencias reguladoras del mismo y con SD delante de la secuencias que constituyen ORFs similares a dos Glicosiltransferasas separadas por un total de 83 nucleótidos. En el extremo 5' tenemos otro SD anterior a otra región codificadora de otra enzima y finalmente una secuencia nucleotídica que puede constituir un terminador transcripcional.

- Región 5', de aproximadamente 3 Kb, región codificadora para proteínas que también son comunes a otras localizaciones externas y adyacentes a operones complejos y de interés en otras especies gram positivas que pueden tener una relación directa con el control de la transcripción.
- El análisis de los cortes realizados con las enzimas restricción una vez construida la secuencia nucleotídica, nos permitió conocer los tamaños exactos de los fragmentos que contenían los nucleótidos de la secuencia marcada inicialmente, las señales obtenidas en el Southern Blot, fueron corroboradas y localizados físicamente en las amplificaciones por PCR inversas. Posteriormente la localización de las dianas de restricción nos servirán para clonar de forma específica fragmentos.

Si discutimos cada uno de los porcentajes de similitud de cada ORF (Tabla 5.9.) Similitud de secuencias proteicas) encontramos las siguientes características particulares:

- ORF 1: Codificado por una región de DNA de unión putativa de DNA, RNA y Proteínas, con función específica desconocida, que por situación física en el extremo 3' puede tener funciones reguladoras del operón completo, como es el caso en otras especies bacterianas. Contiene hitos conservados en su secuencia (coloreados en azul,

Figura 5.13. Secuencias y dominios conservados), que pueden ser indicativos de regiones consenso necesarias en el proceso global de transcripción de procariontas.

- ORF 2: Tiene similitud pero muy baja, con regiones que codifican factores transcripcionales de choque térmico y con ATP sintasas, necesarias para procesos de unión y liberación de moléculas del DNA, que en definitiva se pueden considerar reguladores de la transcripción.

- ORF 3: Es idéntica en un 44% a una transferasa de azúcares de *Xanthomonas campestris* productora de xantano. Tiene valores de alta similitud con glucosiltransferasas de *Xylella fastidiosa* y *Shigella flexneri*. En el análisis de dominios conservados este ORF contiene un fragmento de su secuencia conservado (coloreado en verde Figura 5.13. Secuencias y Dominios conservados) que corresponde a una familia diversa, que transfiere azúcares UDP-glucosa, UDP-N-acetil-galactosamina, GDP-manosa o CDP-abequosa, a un rango de sustratos que incluyen celulosa, dolicol fosfato y ácidos teicoicos.

- ORF 4: Con similitud con moléculas transportadoras, translocasa o flipasa, como el gen *epsN* de *Lactobacillus delbrueckii* (Lamothe 2002), capaz de translocar unidades repetitivas.

- ORF 5: Es una secuencia de DNA reguladora, con homología con secuencias de inserción o secuencias de transposones putativos, lo cual pueda justificar la localización interna del promotor fuerte al final de su extremo 5' con varios sitios de inicio, que aseguran la expresión de los genes adyacentes hacia el extremo 5', dándole carácter esencial dentro del operón de biosíntesis a dichos genes.

- ORF 6- ORF 7: Estos ORF están separados por apenas 8 nt, el primero de ellos tiene homologías con proteínas implicadas en la biosíntesis de polisacárido capsular en otras especies bacterianas (*Vibrio cholerae* un 27% de identidad, *Bacillus halodurans* un 25% de identidad), también es similar en un 24% con una enzima con actividad epimerasa de azúcar de *Thermoanaerobacter tengcongensis*. El ORF7 es muy similar (40%) a actividades específicas Glicosiltransferasas, en este ORF existe una zona muy conservada que traducida a aminoácidos coincide con la descrita para el ORF 3. (Ver figuraX. Secuencias y dominios conservados. Se podría considerar un único ORF con dos partes bien diferenciadas en la secuencia proteica: el extremo aminoterminal con

actividad necesaria en la biosíntesis del polímero, concretamente puede actuar como epimerasa, según las necesidades y disponibilidad metabólica de azúcares (bibliografía) y el extremo carboxilo terminal que es el que tiene similitud con la actividad Glicosiltransferasa propiamente dicha.

- ORF 8-ORF 9: Separados por 25 nt entre los que hay un RBS putativo y una posible secuencia promotora. Se pueden separar sus actividades, siendo el primero de ellos codificante de una estructura necesaria para el plegamiento de la proteína sin especificidad funcional, o incluso de la unión a la molécula transportadora de lípidos (lipid carrier- bibliografía), que sirve de soporte y sobre la que se va a ir formando el oligosacárido o molécula repetitiva del polímero. El siguiente ORF (ORF9) es el que tiene mayor similitud con la actividad glicosiltransferasa específica, incluso contiene una región conservada, igual que la que existía para el ORF 3 pero de menor número de nucleótidos (color verde de la figura X).

- ORF 10: Existe una gran uniformidad de similitud, aunque con un valor intermedio del 25%, con Glicerofosforildiester-fosfodiesterasa (región conservada-color celeste-GDPD) de variadas especies (número de acceso a la GDPD de *Bacillus antracis* [NC_002758.1](#)), que tienen función liberadora de la cadena oligosacáridica formada sobre la molécula lipofílica, así facilitará también la exportación al medio externo, en otros operones (*P. solanacearum*- (Huang y Schell, 1995), una proteína homóloga (EPS P) podría estar envuelta en el ensamblaje o funciones complejas de polimerización exportación.

- ORF 11: Con similitud con una proteína de función desconocida aún, pero cuya estructura proteica está muy conservada en muchas especies bacterianas.

- ORF 12: Tiene un porcentaje de similitud muy alto con helicasas de otras Gram positivas, que son determinantes del proceso del inicio de la transcripción, replicación y todos los procesos que precisan de una separación de la doble hélice de DNA. De estos dos últimos ORF se puede decir que conservan su disposición contigua uno de otro y adyacente a un operon en otros microorganismos Gram positivos esporulados (operon *yer*) (*Bacillus subtilis*).

La posible transcripción de los genes *eps* es unidireccional en sentido 5'-3' ya que no existe la posibilidad de establecer ORFs coherentes en el sentido inverso (Figura

5.9.). En las tres fases de lectura +1,+2 y +3 de lectura encontramos ORF posibles, coherentes y con homologías de valores significativos.

La distribución de las homologías enzimáticas se mantienen respecto a otras distribuciones ya descritas (Becker *et al.*, 1998; De Vuyst, *et al.*, 2001), con variaciones ligeras, como es la situación interna entre transferasas de azúcares de un promotor más zona reguladora y un transportador, que normalmente en otros operones están en el extremo 3' de las transferasas, y donde éstas se disponen de forma adyacente, sin interrupción física.

De forma gráfica la organización genética respecto a la función podría expresarse según el siguiente esquema:

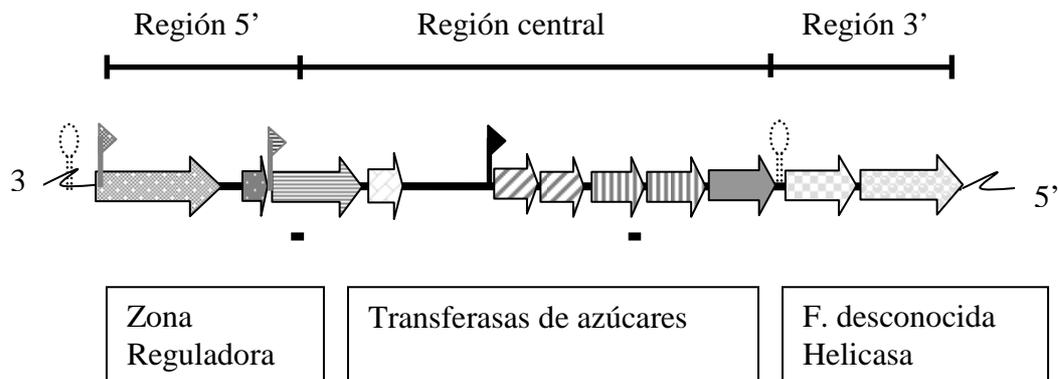


Figura 5.16. Estructura genética-función del operón de EPS en *Paenibacillus jamilae*.

El análisis y discusión detallada de los resultados obtenidos en este capítulo dan paso al establecimiento de nuevos objetivos a distintos niveles, como son el análisis funcional de las Glicosiltransferasas codificadas por la región central (Capítulo 6) y el análisis transcripcional de las mismas (Capítulo 7), todo ello con perspectivas biotecnológicas.

5.7. – Conclusiones

1.- Los genes de biosíntesis de EPS en *Paenibacillus jamilae*, cepa B.7, están localizados en una única región cromosómica.

2.- Todos los genes son transcritos como un único RNA mensajero policistrónico de aproximadamente 12Kb, lo que pone de manifiesto también que los genes *eps* están acoplados y orientados en la misma dirección (5'-3').

3.- La organización general de los genes *eps* se distribuye en tres regiones guardando una relación directa con otros operones de biosíntesis de EPS, siendo la región central la de mayor interés biosintético, la cual contiene además secuencias promotoras con varios sitios de inicio.

4.- Las funciones posibles de la mayoría de los genes *eps* se pueden asignar por similitud de secuencia en un porcentaje superior a 30% de identidades: funciones reguladoras, funciones glicosiltransferasas, y funciones exportadoras.

5.- Siete ORF de los descritos en el operón contienen secuencias de dominios conservados también presentes en otras proteínas esenciales para la biosíntesis de polisacáridos de interés biotecnológico.

Capítulo 6. Análisis Funcional del Operón del Exopolisacárido:

Capítulo 6. Análisis Funcional del Operón del Exopolisacárido:

6. 1. – Resumen

6. 2. – Introducción

6. 3. – Objetivos

6. 4. – Material y métodos

6. 5. – Resultados

6. 5.1. – Valores de PM, pI e hidrofobicidad de las glicosiltransferasas.

6. 5.2. – Filogenia de la proteínas glicosiltransferasas.

6. 5.3. – Construcción de un mutante eps negativo:

6.5.3.1. – Recombinación homóloga de los genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido.

6.5.3.2. – Disrupción de genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido.

6.5.4. – Análisis funcional de las proteínas codificadas por cada ORF, mediante clonación en vectores fusionados con el gen *lacZ*.

6.5.4.1. – Construcción plasmídica y clonación de los genes codificantes de las glicosiltransferasas.

6.5.4.2. - Análisis proteico de los clones recombinantes.

6.5.4.3. – Ensayos enzimáticos.

6.5.5. – Modelo biosintético del heteropolisacárido predicho para B.7 de *P.jamilae* .

6. 6. – Discusión

6. 7. – Conclusiones

6. 1. – Resumen

El análisis funcional de las proteínas presentes en el operón de biosíntesis de EPS de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* es un prerrequisito imprescindible para la bioingeniería de EPSs y oligosacáridos.

En este capítulo, se aborda el aspecto funcional real de las posibles proteínas transferasas de azúcares descritas en el capítulo anterior, en el que se asignaron actividades enzimáticas por similitudes con diversas proteínas ya descritas para otras especies bacterianas. Sobre esta base se han realizado estudios filogenéticos de las proteínas de mayor relevancia para la biosíntesis de polisacárido. La proximidad filogenética de determinadas proteínas de *Paenibacillus jamilae*-cepa B.7 con proteínas de especies de gran interés industrial por ser las mejores productoras de EPS, como *Xanthomonas campestris* y *Acetobacter xylinum*, lo cual podría ser predictivo de la calidad del polisacárido de *Paenibacillus jamilae* y su posible potencial industrial.

Se demuestra la implicación directa y esencial para la biosíntesis de EPS del gen *epsGal* (ORF8-9) descrito en el operón de la cepa B.7 de *P.jamilae* mediante disrupción del gen homólogo en una cepa de *E.coli*. Los ensayos enzimáticos de las posibles glicosiltransferasas se realizaron, una vez comprobada su sobreexpresión en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), tras clonar su secuencia nucleotídica en vectores fusionados con un promotor fuerte y expresándolos de forma controlada. Estos ensayos demostraron la presencia de enzimas específicas que transfieren diversos azúcares (marcados con [¹⁴C]) a una molécula lipofílica que actúa de soporte para la formación de un oligosacárido como unidad estructural fundamental del biopolímero. Las especificidades de las enzimas descritas en este estudio fueron Manosiltransferasa (gen *epsMan*), Glucosiltransferasa (gen *epsGlu*) y Galactosiltransferasa (gen *epsGal*). Entre los dos últimos genes existe la presencia de un gen que codifica una proteína muy similar a otras epimerasas ya descritas, lo que posibilita la incorporación indistinta de diferentes azúcares del medio como son la glucosa o galactosa, dependiendo de su mayor biodisponibilidad en el medio de cultivo, a pesar de la especificidad de la enzima transferasa. Planteamos finalmente, en base a los resultados, un modelo teórico de

biosíntesis del posible oligosacárido que compone la unidad estructural del EPS de *P.jamilae* .

6. 2. – Introducción

6.2.1.- Función natural de los eps.

Los microorganismos que producen EPS han sido aislados a partir de una gran diversidad de nichos ecológicos y es lógico establecer que el papel jugado por los EPS es dependiente del ambiente natural del microorganismo. Se ha sugerido que la capacidad de producir EPS es una respuesta lógica y directa a la presión selectiva del ambiente natural (Dudman, 1977).

Se cree que los polisacáridos extracelulares forman parte de un mecanismo primario que ha evolucionado para establecer y mantener asociaciones entre microorganismos y entre estos y su medio ambiente (Geesey, 1982)

Una de sus principales funciones es la de protección, aunque no es la única. La capacidad de un microorganismo de rodearse asimismo en una capa de EPS, tiene como consecuencia directa el aumento del carácter hidrofílico de la superficie celular, con gran capacidad de retener agua, protegiéndole de la desecación (Whitfield y Valvano, 1993).

Los EPS confieren a los microorganismos la capacidad de adherirse a las superficies y por lo tanto la posibilidad de colonizar distintos ecosistemas (Costerton *et al.*,1987). Un ejemplo es la formación de los llamados “biofilms”, la forma de EPS más común en ambientes acuáticos, como producto de la formación de agregados microbianos, donde prácticamente todas las superficies sumergidas desarrollan un recubrimiento limoso, dominado inicialmente por bacterias.

El concepto de “biofilm” se puede entender como una comunidad coherente, en la cual la asociación célula-célula y el reciclaje de nutrientes, son plenamente

operativos. Los EPS participan en este proceso fijando las células a superficies y permitiendo a los microorganismos mantener una existencia fija con respecto a su hábitat, aumentando las posibilidades de supervivencia (Geesey, 1982).

Los polisacáridos extracelulares, por otra parte, participan en el proceso de captación de minerales y nutrientes del medio, actuando como una resina de intercambio iónico, dada su naturaleza polianiónica, favoreciendo la concentración de las moléculas orgánicas e inorgánicas en el EPS, que se encuentran presentes en pequeñas cantidades en el exterior de la célula (Lange, 1976). Asimismo actúan como barreras protectoras con efecto sobre la penetración a través de la superficie celular de metales pesados, por su capacidad de formar complejos y favorecer el aprovechamiento de materiales insolubles, por su actividad emulsificante y surfactante (Brown y Lester, 1979; Weiner, 1997).

La formación de EPS, particularmente en la forma de cápsulas, está difundido en bacterias patógenas, constituyendo un factor de virulencia. La formación de la capa mucosa parece particularmente importante en bacterias cuya estrategia para sobrevivir en el hospedador depende de la evasión de la fagocitosis (Roberts, 1986).

La evasión de la respuesta inmune puede deberse a la semejanza entre las estructuras químicas de los EPS capsulares y los componentes de la superficie celular del hospedador, ya que muchos de estos EPS no activan el factor de complemento y enmascaran de forma efectiva a los componentes de la superficie bacteriana que sí lo hacen, aunque se piensa que es una función de las propiedades físicas de los polisacáridos capsulares, tales como hidrofilia, carga y viscosidad (Jann y Jann, 1987).

Por otra parte los EPS capsulares participarían en la adhesión a la superficie de los tejidos, esta unión es específica en muchos casos y se han detectado como un fenómeno de reconocimiento celular, como son los casos de infecciones estafilocócicas y fibrosis quística por *Pseudomona aeruginosa*, lo que sugiere una explicación a nivel molecular de la presencia de receptores de superficie (Doig *et al.*, 1987; Soell *et al.*, 1995).

En estudios *in vitro* se ha comprobado que antibióticos cargados positivamente, como los polipéptidos y aminoglucósidos, no penetran por los EPS de *Pseudomonas*; en cambio, antibióticos betalactámicos, quinolonas y macrólidos sí lo hacen (Kumon *et al.*,1994; Ichimiya *et al.*,1994). Esto tiene especial relevancia en tratamientos de infecciones provocadas por microorganismos productores de EPS cuya presencia se relaciona con el carácter virulento de los mismos.

De igual forma los polisacáridos extracelulares están implicados en los procesos de patogénesis de plantas, como es el caso de *Xantomonas campestris*. El establecimiento de la simbiosis de *Rhizobium*-leguminosas es dependiente, entre otros, de la presencia de EPS (Kannenber y Brewin, 1994).

Existe una alta especificidad, entre el EPS de las bacterias y receptores de superficie de las células de la raíz, lo que favorece la colonización de la planta. En estos procesos, además actúan como transportadores de enzimas extracelulares moléculas de señal decisivas para la unión de la bacteria a la planta y parecen tener cierto efecto sobre la supresión de la respuesta de defensa por parte de la planta (González *et al.*, 1993).

6.2.2.- Relación estructura química-función

Los usos industriales de los exopolisacáridos derivan de sus propiedades físicas. Las técnicas aplicadas para determinar sus atributos físicos, junto con el conocimiento de la estructura química han hecho posible la obtención de amplia información sobre la relación entre la estructura y función de los exopolisacáridos.

El amplio rango de propiedades físicas observados entre los distintos polisacáridos microbianos es un resultado directo de las diferencias en la naturaleza y proporción de sus unidades repetitivas fundamentales, que viene definido por la especificidad de las enzimas transferasas de azúcares. También depende de los sustituyentes en los monosacáridos (tales como grupos acetil o piruvato) determinado por otros enzimas del metabolismo general, de los enlaces entre las unidades repetitivas

y finalmente de las ordenaciones estereoquímicas de todos estos factores, que dan como resultado la agregación no covalente de las cadenas de polisacárido para formar estructuras de un alto orden espacial, estableciendo la conformación final del exopolisacárido (Glazer y Nikaido, 1995).

Los biopolímeros más comunes producidos comercialmente exhiben un amplio rango de propiedades físicas. Han sido extensivamente estudiados entre otros, el xantano a partir de *Xanthomonas campestris*, succinoglucano a partir de *Rhizobium* y otras especies, gelano[®] y un rango de polisacáridos de estructuras relacionadas a partir de cepas de *Sphingomonas paucimobilis* y alginatos bacterianos secretados por *Pseudomonas* sp., por *Azotobacter vinelandii* y *A. chroococcum*.

Parámetros estructurales que determinan la función de los EPS

- **Conformación.** La técnica de microscopía electrónica ha indicado la formación lineal alargada de las moléculas, así como información de que el polisacárido en solución se presenta en forma helicoidal. Sin embargo, existen muchas limitaciones sobre la interpretación de los datos obtenidos a partir de esta técnica. Estudios de difracción de rayos-X han demostrado que una consecuencia de la linealidad de los polisacáridos de alto peso molecular es su tendencia a formar estructuras helicoidales, las cuales pueden ocasionalmente ser de triple hélice o más comúnmente de doble hélice; las moléculas pueden variar considerablemente en su flexibilidad y algunas han demostrado ser muy rígidas. (Moorhouse, 1987).

En muchos polisacáridos se produce una aparente rigidez a elevada fuerza iónica, al estabilizar la conformación ordenada debido a la reducción de las repulsiones electrostáticas de los diferentes grupos sustituyentes, elevando así mismo la temperatura a la cual se produce el cambio conformacional (T_m). Los grupos acilo tienen una notable influencia sobre los cambios conformacionales de las moléculas de polisacáridos y se han encontrado diferencias según el contenido de los grupos acetato y piruvato en la molécula. La presencia de los grupos acetilo estabilizan la forma ordenada del

polisacárido, aumentando la temperatura de transición, mientras los grupos piruvato produce el efecto contrario, atribuido a la repulsión electrostática entre ellos. Contrariamente, las interacciones apolares del grupo metilo de los acetatos producen estabilización de la conformación, hecho estudiado en el exopolisacárido acetano de *Acetobacter xylinum*, además del xantano (Sutherland, 1994).

- **La masa molecular** de los exopolisacáridos influye directamente sobre otras propiedades físicas por lo tanto en las potenciales aplicaciones de los EPS. A una temperatura constante y a una concentración y velocidad de cizalla determinadas, la viscosidad específica de las soluciones acuosas de EPS depende del peso molecular de éste. Los exopolisacáridos obtenidos de diferentes microorganismos varían ampliamente en su peso molecular y dependen de las condiciones de crecimiento empleados. El nivel de oxígeno suministrado al cultivo tiene un efecto marcado sobre este. Por ejemplo, la viscosidad intrínseca (una medida del peso molecular) del xantano, producido en fermentaciones sobre medio complejo es considerablemente más baja cuando la temperatura de fermentación es 35°C en lugar de 30°C. El valor de la masa molecular de los EPS es por lo general muy grande con respecto a otras biomoléculas, estando entre un rango de 10^5 a 10^6 .

La conformación y la masa molecular determinan las propiedades reológicas, las soluciones de la mayoría de exopolisacáridos muestran un comportamiento pseudoplástico, con una aparente disminución de la viscosidad a medida que aumenta el esfuerzo de cizalla o deformación. Presentan además una conducta tanto viscosa como elástica denominada viscoelástica, ya que regresan a su estado original luego de cesar la fuerza que se le aplica (Sutherland, 1990). Las propiedades reológicas de un exopolisacárido pueden verse afectadas grandemente por pequeños cambios en su estructura (Rinaudo y Milas, 1987).

- **La capacidad de interacción cooperativa de la estructura química** del polímero entre las cadenas que conforman el polímero determina la capacidad de formación de geles (Rinaudo y Milas, 1987). Así mismo, la capacidad de gelificación sinérgica se ha demostrado en bacterias patógenas de plantas, como es el caso de *Xanthomonas*

campestris, donde hay evidencias de interacciones intermoleculares con polisacáridos de origen vegetal (Morris et al. 1977b). Una mezcla en solución de xantano con galactomananos de plantas provoca la formación de geles firmes, lo que demuestra una fuerte interacción específica, teniendo en cuenta que el xantano no gelifica por sí mismo. Hecho similar ocurre con especies de *Rhizobium*, que colonizan las raíces a través de la interacción específica del exopolisacárido con los polisacáridos de la planta (Powell, 1979). Esta gelificación sinérgica tiene un gran potencial de aplicación en la industria.

- **La capacidad del polisacárido de unir ácidos grasos covalentemente a través de enlaces éster determina su actividad emulgente.** Se ha llegado a determinar que algunos exopolisacáridos poseen actividad surfactante, pasando a formar parte del grupo de compuestos de origen biológico con actividad de superficie, denominados biosurfactantes. Los biosurfactantes de naturaleza polimérica mejor estudiados son el emulsano, biodispersano (*Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg et al.,1988)), alasan (cepa KA-53 de *Acinetobacter radioresistens* (Navonvenezia et al.,1995), liposano, manoproteínas y otros complejos polisacárido-proteína. Este biosurfactante es muy efectivo a bajas concentraciones (Rosenberg et al.,1979). Otros microorganismos productores de bioemulgente son la levadura *Candida lipolytica* (Cirigliano et al.,1985), varias especies del género *Pseudomonas* Desai et al.,(1988).

- **La naturaleza polianiónica** de muchos polisacárido determina su capacidad de interacción con cationes. Contiene grupos funcionales capaces de formar complejos coordinados con ellos. La presencia de diferentes cationes afectan marcadamente la conformación de los exopolisacáridos, como es el caso del xantano. Los alginatos interactúan fuertemente con algunos cationes divalentes y son más selectivos en su enlace que otros como la pectina. Algunos polisacáridos microbianos, como la producida por especies del género *Zoogloea* se une fuertemente a iones, jugando un papel importante en el fenómeno de la floculación. Sin embargo, el mecanismo exacto de enlace por este tipo de polímeros no está todavía claro (Kaplan et al.,1987). Así mismo Corzo et al. (1994), han demostrado la capacidad de precipitación de cationes metálicos por parte del exopolisacárido producido por *Bradyrhizobium japonicum* y por

la cepa BGA-1 de *Bradiryzobium*.

Investigaciones realizadas por Loaëc *et al.*,(1997), señalan la importancia de esta propiedad en el proceso de captación de metales pesados en medios ambientes naturales expuestos a contaminación por los mismos.

6.2.3.- Aplicaciones de los EPS.

Los exopolisacáridos constituyen hasta el momento un componente minoritario en el mercado de los polímeros solubles en agua; pero características tales como su biocompatibilidad, biodegradación, hidrofiliidad y no-toxicidad, así como nuevas y mejores propiedades fisico-químicas los hacen competitivos frente a los polímeros sintéticos e inorgánicos y los de origen vegetal, además del continuo incremento de los precios.

Se han descrito alrededor de 20 EPS diferentes con mercado potencial, pero la mayor parte corresponde al xantano, con una producción aproximada de 20,000 toneladas por año, de aquí el interés en la búsqueda de nuevos EPS, con nuevas o mejores características físico-químicas. Dicho interés ha estimulado el desarrollo de microorganismos modificados genéticamente y el desarrollo de procesos de producción más eficientes, con el consiguiente descenso de los costos de fermentación, lo que ha permitido el mantenimiento de mercados y la creación de nuevos en otros (Yalpani y Sanford, 1987).

La utilidad de los EPS está basada en un amplio espectro de características funcionales. Unas derivadas de sus propiedades fisico-químicas, como su habilidad para modificar el comportamiento fluido de las soluciones acuosas o dispersiones, tales como su capacidad espesante, gelificante, estabilizante, emulsificante, quelante, formadora de biofilms y membranas; otras basadas en la capacidad de interactuar con otros materiales de origen sintético o biológico, así como su papel en diversos procesos biológicos.

Observando las diversas áreas en las cuales los EPS son empleados corrientemente, es posible hacer algunas predicciones acerca de su futuro uso. El incremento del interés en las propiedades físicas de estos polímeros, junto con un mejor entendimiento de las relaciones entre las propiedades físicas y su estructura química, inevitablemente permitirán el descubrimiento de nuevos EPS, con características apropiadas para nuevas aplicaciones o mejorar las ya existentes. No debe ser olvidado que los EPS son biodegradables y son producidos a partir de recursos renovables y son intrínsecamente productos seguros, lo que permite su uso en lugar de materiales no renovables, así contribuir al mantenimiento del medio ambiente.

6.2.4.- Relación organización genética-función

La organización genética que controla la codificación de enzimas implicadas en la biosíntesis de EPSs en muchas bacterias está conservada parcial o totalmente (Glucksmann *et al.*,1993; Huang & Schell 1995; Stinglele *et al.*,1996; 1999; van Kranenburg *et al.*,1996), indicio de que el exopolisacárido es un producto celular derivado de una estructura común y esencial para la supervivencia de estos procariontes en determinados nichos ecológicos. Los estudios de homologías demuestran la existencia de dominios conservados en todas las proteínas transferasas de azúcares que están presentes en las diferentes formas de vida procaritas e incluso también eucariotas productoras de polisacáridos (Moreira, 1999).

Las actividades enzimáticas funcionales implicadas en el proceso global de biosíntesis de un EPS abarcan todo el metabolismo, desde el metabolismo primario

nucleotídico, hasta enzimas necesarias para cubrir los requerimientos energéticos, que son muy altos en este proceso. Pero las de mayor relevancia o implicación directa se pueden resumir en tres actividades globales que definen varias especificidades enzimáticas:

- Las enzimas implicadas en la biosíntesis del oligómero que forma la estructura fundamental del biopolímero (cintazas, glicosiltransferasas), además existen otras proteínas sin las cuales el polímero como tal no se formaría (polimerasas, liberadoras-esterasas), ni se exportaría al exterior de la célula (enzimas transportadoras). También la síntesis de moléculas proteicas reguladoras del proceso general de transcripción son de gran importancia. Para la síntesis y exportación de EPS se necesita de esta gran variedad de enzimas que deben estar agrupadas, coordinadas y controladas bajo las mismas señales metabólicas, que responderán a la composición del medio externo. Las de mayor interés en este estudio son las glicosiltransferasas, cuyas características principales las describiremos a continuación.

A pesar de la importancia fisiológica de las glicosiltransferasas (Glucksmann 1993; Kolman *et al.*, 1996), envueltas en la unión de moléculas de azúcar a determinados sustratos, para formar EPS, es muy poco lo conocido sobre su proceso catalítico y sobre las relaciones estructura-función. Sólo avanzando en este campo se podrán realizar mejoras biotecnológicas con implicaciones industriales, los microorganismos son los más susceptibles para realizar este tipo de estudios, de hecho los avances más espectaculares en estos últimos años, se han realizado sobre bacterias productoras de EPS con interés industrial, como el xantano, producido por *Xanthomonas campestris*, que ha sido objeto de continuas revisiones (Becker *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1999;), las bacterias del ácido láctico, como *Streptococcus thermophilus* (Stingele *et al.*, 1996; De Vuyst 2001), *Lactococcus lactis* (Kranenburg 1997; 1999; 2000), *Lactobacillus delbrueckii* (Jolly *et al.*, 2002).

La biosíntesis de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos implican la acción de cientos de diferentes glicosiltransferasas (EC 2.4.x.y), enzimas que catalizan la transferencia de azúcares desde moléculas donadoras activadas a moléculasceptoras específicas formando enlaces glucosídicos. Las Glicosiltransferasas pueden ser

clasificadas de acuerdo a estequiometrías de la reacción de los sustratos y productos como enzimas invertidas o retenidas (Sinnott 1990). Las recomendaciones de la IUBMB (Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular) no indican las características intrínsecas estructurales de las enzimas, ya que no tienen bien ubicadas aquellas enzimas que actúan sobre diferentes sustratos. Existen otros autores que proponen una clasificación de las glicosiltransferasas que utilizan diferentes azúcares activados (difosfo, monofosfo y fosfatos (EC 2.4.1.x)) y las proteínas similares en diferentes familias según su secuencia, como describió por primera vez Campbell et al., en 1997. Los mismos plegamientos tridimensionales se espera que ocurran entre cada familia. Como ocurre con las hidrolasas glicosidasas, las familias de proteínas definidas sobre las bases de similitud de secuencias pueden tener estructuras tridimensionales parecidas y así formar agrupaciones definidas.

- Mecanismo catalítico de glicosiltransferasas:

Para las glicosiltransferasas, por analogía con las glicosidasas, hay dos mecanismos catalíticos principales para las glicosiltransferasas: uno dirige la **inversión** de la configuración anomérica (UDP-glucosa \rightarrow beta) y el otro dirige la **retención** (por ejemplo UDP-glucosa \rightarrow alpha).

La inversión de la configuración anomérica sigue mayoritariamente un mecanismo único de desplazamiento donde el aceptor realiza un ataque nucleofílico al C1 del azúcar activado donador.

La retención de la configuración anomérica corresponde probablemente a un mecanismo de dos pasos que implica primero la formación de alguna clase de glicosiltransferasa intermedia y la liberación del nucleótido difosfato y el ataque subsecuente de la glicosil-enzima por el aceptor.

6.4. Objetivos

Justificación y planteamientos de objetivos:

La estructura genética que codifica las proteínas y enzimas de biosíntesis del EPS de *Paenibacillus jamilae*, se llevó a cabo en el capítulo anterior, mediante la localización, identificación y caracterización de todos sus elementos. La asignación de funciones enzimáticas se realizó mediante un análisis bioinformático, de acuerdo a resultados de homologías con otras estructuras genéticas bacterianas ya descritas.

Destacamos la zona central del operón de biosíntesis de EPS de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* (Figura 6.1), que también está conservada como en numerosas especies bacterianas productoras de EPS y que constituyen el núcleo de las transferasas de azúcares, responsables principales de la especificidad de síntesis de la unidad fundamental del biopolímero.

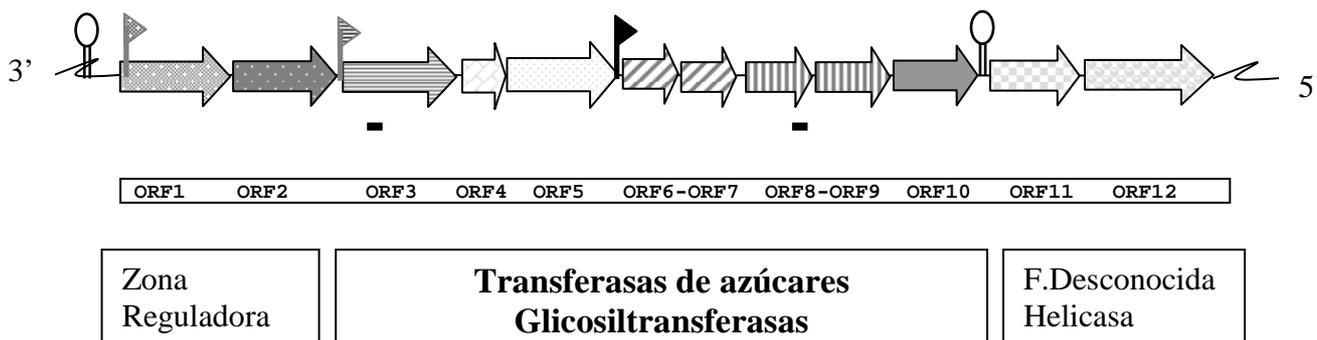


Figura 6.1.- Esquema resumen Estructura genética-Función del operón de biosíntesis de EPS en *Paenibacillus jamilae*.

Debido al hecho de que las proteínas o enzimas codificadas por los genes de biosíntesis de EPS no son susceptibles de sobreexpresarse, aislarse y purificarse desde la cepa madre salvaje, cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*, en las concentraciones necesarias y suficientes para realizar un estudio de funcionalidad de las mismas, planteamos la alternativa de clonarlas y expresarlas de forma heteróloga en cepas adecuadas de *E.coli* (carentes de dichas actividades) para realizar su estudio bioquímico.

El sector genético elegido para el trabajo de análisis funcional, fueron los genes que codifican los ORF3, ORF6-7, ORF8-9 y ORF-10, que eran presumiblemente los

responsables directos en la biosíntesis del oligosacárido fundamental del EPS de *Paenibacillus jamilae* y además determinantes de la naturaleza del mismo.

Una vez conocidas las bases teóricas y experimentales necesarias para abordar el análisis funcional de las proteínas implicadas en la biosíntesis de EPS de la cepa B.7 de *P.jamilae* procedemos a plantear los objetivos que desarrollaremos para este fin:

1.- Analizar las características generales de las secuencias proteínicas de las glicosiltransferasas.

2.- Determinar la implicación directa de los genes descritos del operón de *Paenibacillus jamilae* en la biosíntesis de EPS.

3.- Determinar las especificidades enzimáticas de cada glicosiltransferasa.

4.- Establecer un modelo teórico de biosíntesis de EPS en *Paenibacillus jamilae*.

6. 4. Material y métodos

6.4.1.- Cálculo de valores teóricos de peso molecular (PM), punto isoelectrico (pI) e hidrofobicidad de las glicosiltransferasas.

Estos valores fueron predichos por un análisis bioinformático con un programa disponible en internet, en la página <http://dante.studentenweb.org/bioinfo/>, que conecta con el servidor EXPASY.

Introduciendo los aminoácidos de la proteína obtenemos el valor teórico de PM en KDa y su punto isoeléctrico.

Las proteínas a las que se le realizó este análisis fueron las que tenían similitud con Glicosiltransferasas y contenían dominios conservados, correspondientes a los siguientes ORF 3, ORF 6-7 y ORF 8-9, descritos en el capítulo anterior.

Las secuencias de aminoácidos son las siguientes:

- ORF 3: Transferasa de azúcares, la denominamos “GTF1”

>ORF 3

MVFNLNKYSCKEGASMFKTITILIPAYNEEEVIYQLYSRLTRVIDSITGYHFELLFVNDGSKD
 NTVEILKNLGGKDRRISLVDLSRNFVKEVAMIAGLDFSVGNVVIDADLQDPPELIVEMIK
 YWEQGYDDIYAKRATRAGETWLKKTASSFYKLLQRMSRIPIQENTGDFRLLDRRCIEAL
 KQLRETQRYTKGMFSWIGFNKKEILFNRSRAAGETKWNYYKLLDLAIEGTSFTTAPLRL
 SAMLGVFISIGAFFYMFIIITRTRTLIFGGSVAGYASLMTVILFLGGIQLLSLGIIGEYLGRVFNET
 KSRPLYFVKEYNDGKGAISEQKYMENRFSRGRI

- ORF 6-7: Glucosiltransferasa, “GTF2”

>ORF 6-7

MDVSILVVNYNTCQLTLDCLQSVYASKSQYRYXVIVIDNHSSDGSVEAIRAAYPDITLIANKD
 NTGFAKANNQGMENVASGRYVLLNSDTLVQPDTLDTMIQFMDTHPEMGASGCKVILPDGS
 LDKACKRGFPTPSASFYYAFGWSKRYPDNPKYNQYQLGHLSPMTSILDVLVGAFMLVRE
 TIDQVGGLEDTEFFMYGEDIDWCXRIKQAGWGIYYPRTYIIHIKGG SARRRPLKIIYEFHRA
 MWVFHRKHYYKQYQSWITNMAVYAGITVKFGMAFLKNKLSAPVKPDSGQSRTGKHDQ
 KSAFFNPIIYCGGFRGHSVLSDRLVFQI

- ORF 8-9: Gluco/Galactosiltransferasa “GTF3”

>ORF8-9

MLFSLYSPKRKKRFADDVFRVTQIHIVGLFVLLSVMFFVKQIDISRSYLAIYMGVNVLLILFY
 RFFLKQVLKALRQKGYNKQFMLILGAGTLGQRFYHNLGQYDLYEVVGLDDKRHWSE
 EEAAHFRPILGGLDQLEATLSRLMIDEVILALPLDAHDKYPKIINMCEKAGVRTLIIPDFDY
 LPARPYFDNFAGIADD*CTGYFHWWRGIDCLNRLFRYFYSLSRIFWTFSDHCWQWRIG
 CMITFQRGPFIFKPRTGGFESXQPFMYQIRSMKVLPPGTEDTGWTANDPRRTRFGTFIR
 KTSDELDPQFFNVLLGDMSVVGPRPERPYVDQFREEIPKYMVKHHVRLESQAGHRATAC
 VEIHLRNLGSLMTSSILRTGRSYLILKLSARFATVSRTRINTEAPFGLAGGCFCVWQLF

6.4.2.- Análisis filogenético de la proteínas glicosiltransferasas.

En primer lugar se realizó un alineamiento local (BLAST) de cada una de las proteínas de *Paenibacillus jamilae* y posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias proteicas elegidas del listado del BLAST, con el programa CLUSTALX. Este mismo programa permite la realización de una matriz que genera un archivo con el que podemos realizar un filograma, que se visualiza con el programa Treeview versión TREEV32.

6.4.3. - Disrupción de genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido. Obtención de un mutante negativo para la producción de EPS.

Para realizar la interrupción hicimos la elección del gen, considerando que cualquier ORF con similitud con glicosiltransferasas era una buena diana a interrumpir y con efecto sobre la biosíntesis de EPS. Así, sería eficaz actuar sobre los genes del ORF3, ORF6-7 ó ORF8-9. Elegimos los ORF 8-9 por ser más similar a otras GTF primarias esenciales en el proceso de síntesis por su actividad.

6.4.3.1. - Recombinación homóloga de los genes de glicosiltransferasas esenciales para la síntesis de exopolisacárido.

6.4.3.1.a. - Recombinación homóloga en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*

El objetivo de este planteamiento es la realización de una recombinación por doble entrecruzamiento (crossover) en el cromosoma de *Paenibacillus jamilae* insertando una resistencia a antibiótico kanamicina o cloramfenicol entre el gen elegido para disrumpir de *P.jamilae* , amplificado por PCR y clonado, que actuará como marcador genético del operón para seleccionar las cepas recombinantes.

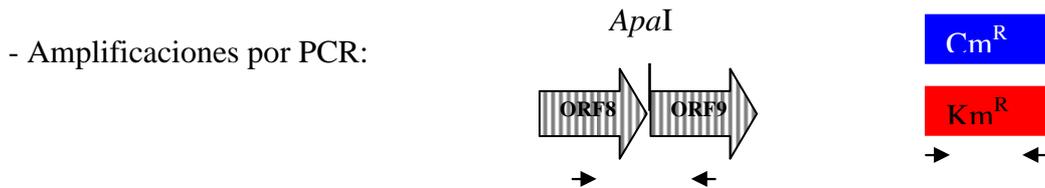
Las construcciones plasmídicas se realizaron en pUC19 que no contiene origen de replicación compatible con gram positivas, de forma que la selección de antibiótico propia del Plásmido fuerza la recombinación de las zonas homólogas. Fueron necesarios los siguientes pasos:

- Se amplificó el fragmento que contiene los ORF8-9 por reacción de PCR con oligonucleótidos internos a estos ORFs, se concentró por el sistema Microcon y se clonó en pUC19 preparado previamente por corte en el MCS con una enzima de restricción de extremos romos SmaI (New England Biolabs) y posterior defosforilación con SAP (New England Biolabs). La ligación se realizó con ligasa T4 (New England Biolabs) durante toda la noche a 16° C.

- Una vez obtenida la primera construcción plasmídica en pUC19 se cortó con *ApaI* (diana interna a los ORF 8-9) y se defosforiló para posterior ligación con la resistencia al antibiótico, cloramfenicol o kanamicina contenidas en diferentes vectores, que

amplificamos con oligonucleótidos específicos y con extremos *ApaI*, posteriormente cortamos con *ApaI* y ligamos con el vector mas inserto ORF8-9 cortado con *ApaI*.

La transformación se realizó en *E.coli*, selección blanco/azul. El análisis de la clonación se realizó mediante corte de restricción con *ApaI* y el análisis de orientación por amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos, uno externo en el final del fragmento ORF9 y otro interno en el principio de la resistencia al antibiótico.



- Clonación en pUC19

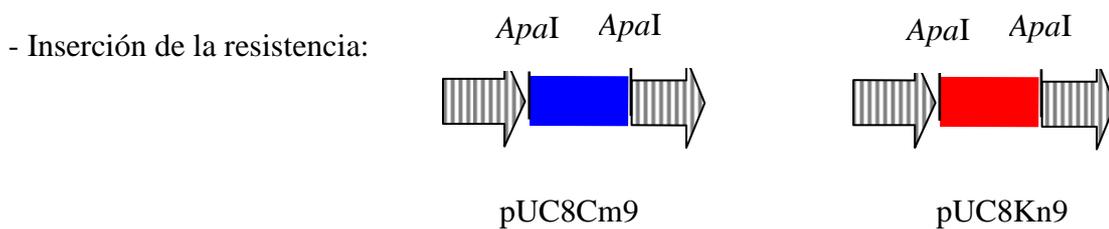
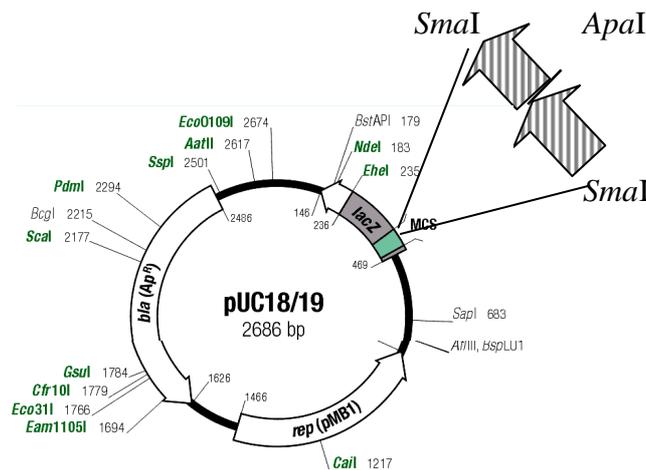


Figura 6.2. Proceso de construcción de plásmidos recombinantes con antibiótico.

Las células de *P. jamilae* fueron transformadas por electroporación, con los plásmidos recombinantes (pUC8Cm9 y pUC8Kn9) junto a un control positivo (*P. jamilae* con 1µg de pLSE1) y un control negativo (*P. jamilae* sin vector). Las células

transformadas fueron crecidas en medio YM-Azul de toluidina, que favorecían visualización de la síntesis de EPS, con los antibióticos respectivos, cloramfenicol o kanamicina.

6.4.3.1.b. - Recombinación homologa en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* y en la cepa 168 de *B.subtilis*

Se clonaron los distintos ORF de glicosiltransferasas (ORF 3, ORF6-7, ORF 9) en pGEMT (Promega). Una vez preparados los clones recombinantes que denominamos pGEM3, pGEM6-7 y pGEM9.

Estas construcciones plasmídicas fueron las que se utilizaron para la transformación de *P.jamilae* y *B.subtilis* electrocompetentes.

6.4.3.2. - Interrupción de la transcripción de genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido.

Utilizamos un sistema que funciona de forma eficiente en otras bacterias gram positivas, *S.aureus*, induciendo la síntesis de un RNA antisentido que puede disminuir la expresión de genes cromosómicos.

Para entender el objetivo de este experimento hay que atender a las características del vector que utilizamos, pYJ355:

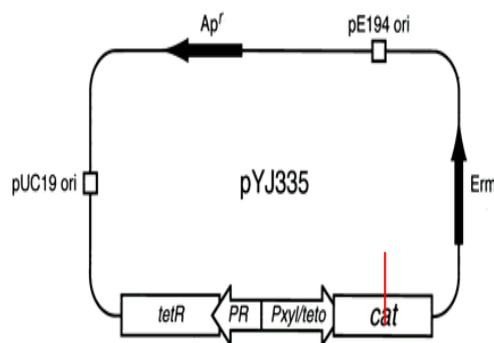


Figura 6. 3. Vector pYJ355

- El vector pYJ355 es un vector lanzadera inducible por Tc, con orígenes de replicación de pUC19 (para gram negativas) y pE194 (para gram positivas). Contiene un sitio único EcoRV hacia el extremo 3' del promotor *xyl/tet* y 22 nucleótidos hacia el

extremo 5' del punto de inicio de traslación del gen *cat*. Cuando el inserto entra en orientación invertida sintetiza un RNAm antisentido a la secuencia nucleotídica específica insertada, que inhibe la expresión de dicho gen y la síntesis de la proteína (Ji, *et al.*, 1999).

6.4.3.2.a. - Disrupción del gen que codifica el ORF8-9 en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* utilizando el vector pYJ355.

- En primer lugar amplificamos por reacción de PCR el ORF 9, con oligonucleótidos específicos con extremos *EcoRV*, una vez obtenido este producto se cortó con la enzima de restricción *EcoRV* y se ligó al vector previamente cortado y fosfataseado con ligasa T4. Se realizaron distintas diluciones o proporciones vector: inserto 1:3, 1:5 y 1:10. Se transformaron las cepas de *P.jamilae* electrocompetentes con las ligaciones y se sembraron en YM-Em. Posteriormente se siembra mediante réplica en placa de YM-Em-Tc, las colonias no mucosas, si aparecen serán nuestros clones positivos y blanco de estudio.

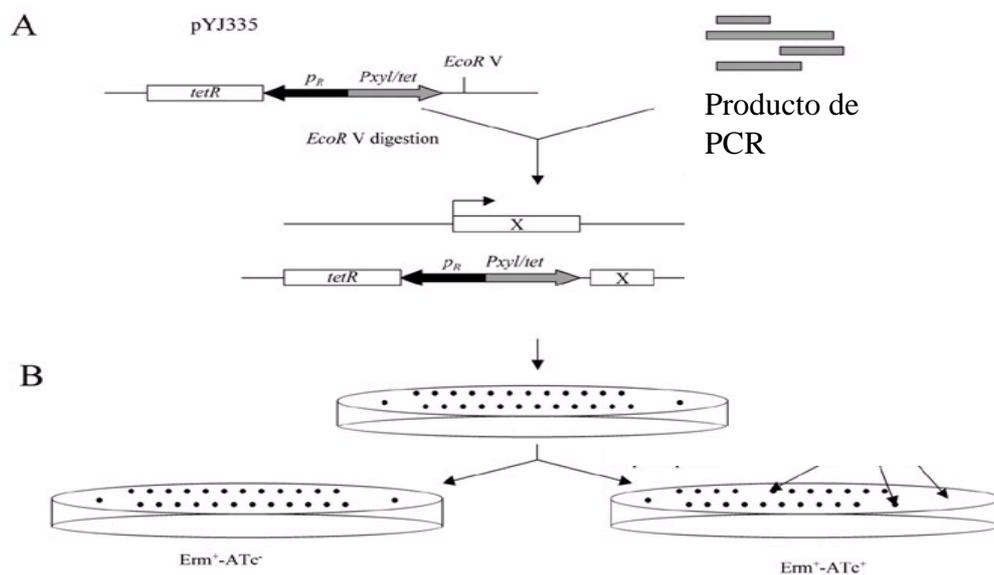


Figura 6.4. Obtención de recombinantes con vector pYJ335

6.4.3.2. b.- Disrupción del gen homólogo en *E.coli* XL1Blue al codificado por el ORF8-9 de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* utilizando el vector pYJ355.

- El protocolo de actuación fue el mismo que el del anterior apartado para la preparación del ligado, lo único que variamos fue la cepa receptora, que en este caso sería *E.coli*, elegida por reunir las condiciones que presumíamos habían determinado el fracaso del experimento anterior, como son la alta eficiencia de transformación por electroporación de *E.coli*, tiene un origen de replicación compatible con el origen del vector pUC19 y con un gen homólogo al que constituye un inserto.

6.4.4. -Análisis funcional de las proteínas codificadas por cada gen de glicosiltransferasas, mediante clonación en vectores fusionados con el gen *lacZ*.

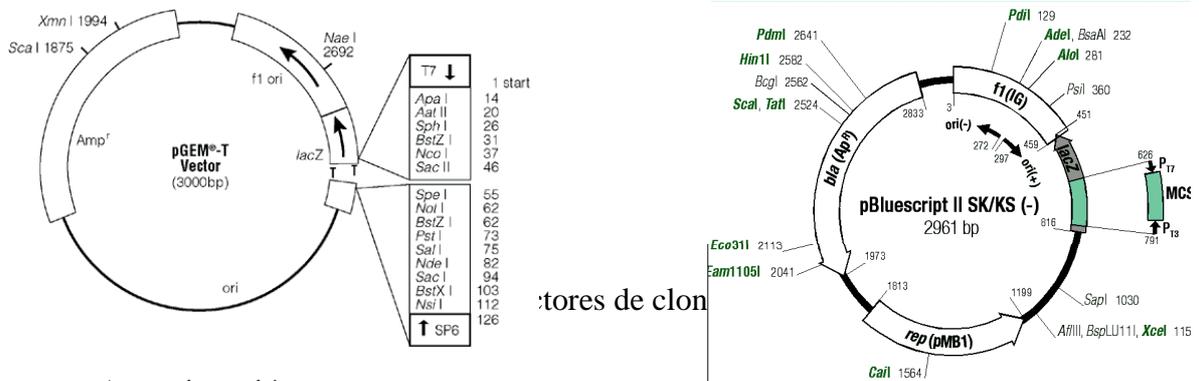
6.4.4.1.- Construcción plasmídica y clonación de los genes codificantes de las enzimas glicosiltransferasas.

Para realizar este análisis, clonamos los genes que tenían similitud con GTF, utilizando el DNA de la cepa B.7 de *P.jamilae* como molde. Las amplificaciones se realizaron utilizando los oligonucleótidos de la tabla 6.1. y polimerasa de alta fidelidad (Amplitaq-Perkin-Elmer), con las temperaturas citadas en cada caso que fueron las óptimas, resultando los amplicones del tamaño esperado de forma única y específica, finalmente se concentraron en microcon(Millipore). Se ligaron los insertos con Ligasa LT4 a cada vector purificado, cortado con la enzima de restricción (si procedía) y defosforilado previamente (si procedía) y con las construcciones plasmídicas se transformaron las células de *E.coli* XL1Blue. Los clones positivos fueron detectados mediante el sistema de colonias azul/blanco, creciendo las colonias en medio con Xgal e IPTG.

Los oligonucleótidos utilizados para este estudio (Tabla 6.1) fueron diseñados sin colas de restricción enzimáticas, para los fragmentos que iban a ser clonados en pGEMT y con colas de restricción para los fragmentos que iban a ser clonados en pKK232-8, pASV4, pBlueScript, pUC19. En el diseño de los cebadores se tuvo en cuenta la fase de lectura correcta para fusionarlo con *lacZ*. Los vectores de clonación utilizados para la fusión con el *LacZ* fueron pGEMT (Promega), pUC19, pBluescript.

Los vectores pKK232-8 y pASV4 se utilizaron para clonar el sector con posible promotor (Analizado y explicado en el capítulo 7).

Los nombres de los clones responden al vector en el que está clonado y nombre del ORF, por ejemplo, el ORF3 está clonado en pGEMT y se llama pGM3.



- A continuación presentamos un esquema general que ilustra los fragmentos con los que se van a hacer las construcciones plasmídicas de la zona esencial del operón y sus nombres respectivos. Estas construcciones se utilizarán para los ensayos de GTF y la comprobación de zonas promotoras.

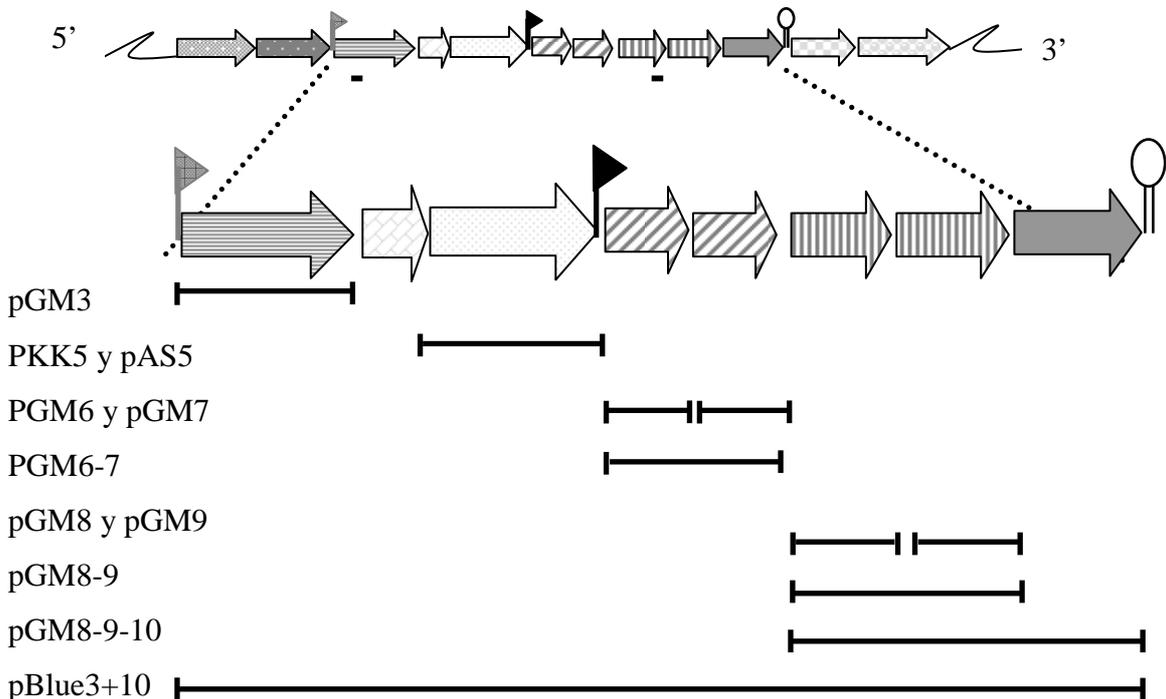


Figura 6.6. Fragmentos del operón de *Paenibaillus jamilae* para clonación.

La orientación adecuada, en el mismo sentido que el gen *lacZ*, la comprobamos mediante cortes de restricción, en cada caso, situados en el vector (Figura 6.5.) y en el

interior la secuencia nucleotídica que componía cada ORF en una posición alejada del centro del ORF que permita discernir la orientación (Figura 5.12), eligiendo entre las posibles enzimas de restricción aquellas que permitan utilizar el mismo tampón de reacción con la máxima eficacia (Compatibilidades en el catálogo de New England Biolabs).

Tabla 6.1. Oligonucleótidos para construcciones de plásmidos recombinantes

	AAATAAAT
	GAATCTAT
	ACTGGTCG
	CCCCAACCT
	GACGAAACC
	AAAAACC
	ACTGGTCG
	AAAAACC
	TATTCGC
	ATCGGC
	CGATTG
	ATACGC
	TATTCGC
	ATACGC
	TATTCGC
	TGGTATTT
	AAATAAAT
	TGGTATTT

6.4.4.2.- Análisis proteico de los clones recombinantes.

- Una vez clonados los genes *eps* GTF1 (ORF3, construcción plasmídica pGM3), *eps* GTF2 (ORF6, ORF7 y ORF6-7, construcciones plasmídica pGM6, pGM7 y pGM6-7), *eps* GTF3 (ORF9, construcción plasmídica pGM9). La construcción plasmídica pGM8-9 no era viable, por lo que no pudimos realizar su análisis proteico. Se expresaron todas las construcciones plasmídicas en *E.coli* DH5 α (cepa de *E.coli* sin actividad GTF medible) induciéndolas con IPTG. Como controles negativos utilizamos la no inducción con IPTG de los clones recombinantes respectivos en cada caso y la cepa salvaje sin plásmidos.

- Se realizó un análisis de la concentración total de proteínas de las cepas recombinantes mediante el método de Bradford.

Posteriormente las proteínas totales de los clones recombinantes fueron separadas en un gel de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y teñidos con Azul de Coomassie.

6.4.4.3.- Ensayos enzimáticos.

Los ensayos enzimáticos de la actividad de las GTF fueron realizadas de acuerdo al método de Kolkman et al., de 1996. Utilizando células permeabilizadas por ciclos de congelación-descongelación. Las células de *E.coli*DH5 α recombinantes fueron inducidas por IPTG sometiéndolas al mismo proceso que para el análisis proteico mediante SDS-PAGE. Como control negativo introdujimos en todos los ensayos una cepa de *E.coli* DH5 α salvaje.

Utilizamos como precursores de las GTF los azúcares marcados: UDP-[¹⁴C]-glucosa, UDP-[¹⁴C]-galactosa y UDP-[¹⁴C]-manosa sintetizados por Amersham Pharmacia Biotech.

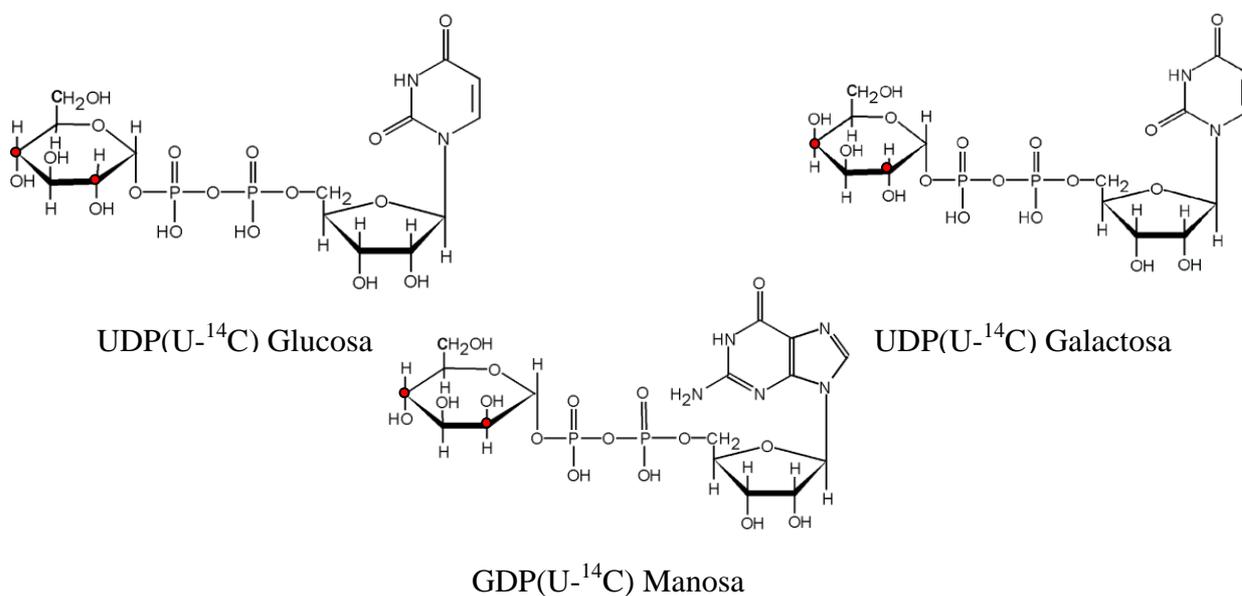


Figura 6.7. Azúcares activados utilizados en los ensayos de Glicosiltransferasas

Los oligosacáridos unidos a las moléculas lipídicas fueron hidrolizados parcial o totalmente, separados y analizados por cromatografía en capa fina.

6. 5. – Resultados

6.5.1. - Valores de PM y pI predichos de las posibles GTF

- ORF 3: Transferasa de azúcares, la denominamos “GTF1”

PM: 39494,83 Da

pI: 9,21

Valores de hidrofobicidad, según Kyte-Doolittle

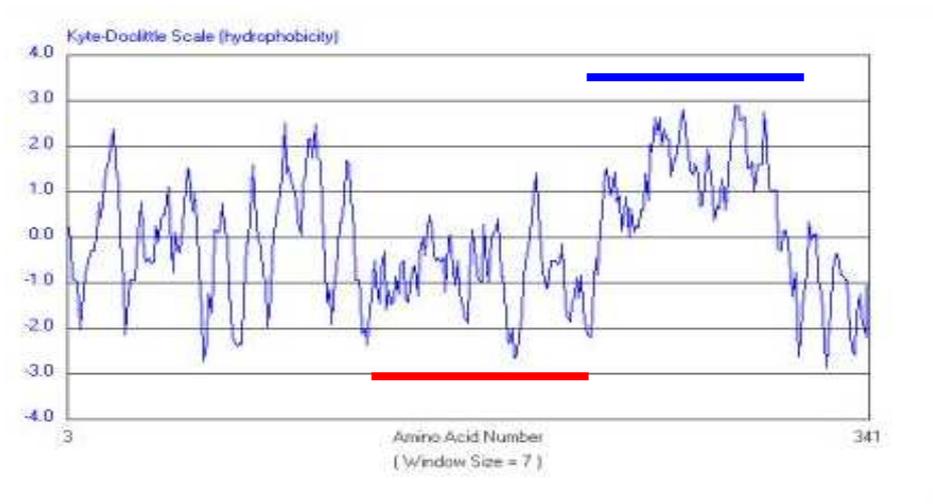


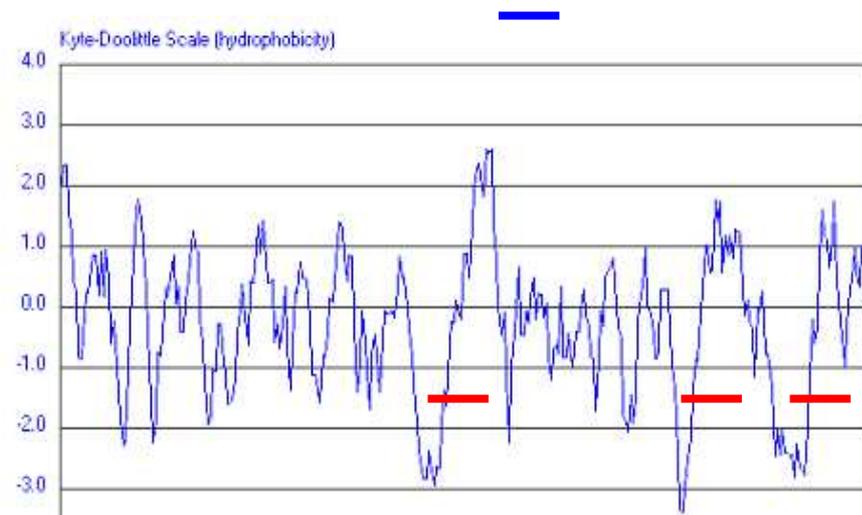
Figura 6.8. Análisis de hidrofobicidad del ORF3

- ORF 6-7: Glucosiltransferasa, “GTF2”

PM: 37812,80 Da

pI: 8,84

Valores de hidrofobicidad, según Kyte-Doolittle



- ORF 8-9: Gluco/Galactosiltransferasa “GTF3”

PM: 49732,72 Da

pI: 9,48

Valores de hidrofobicidad, según Kyte-Doolittle

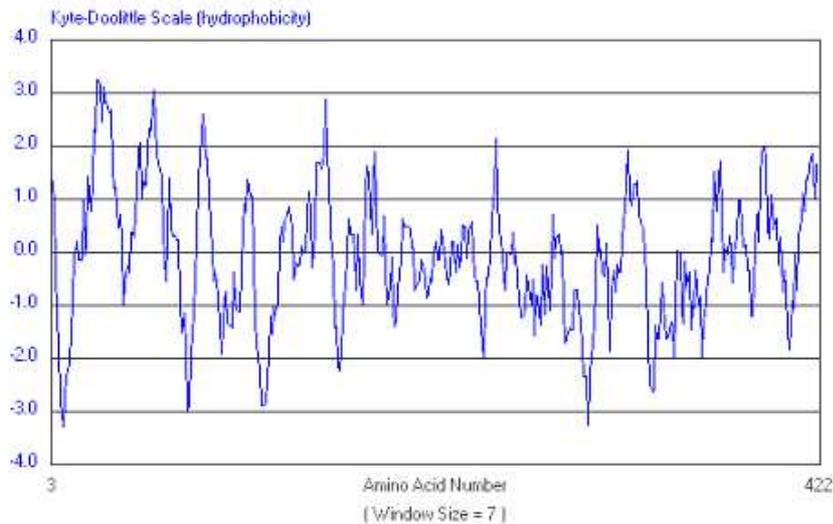


Figura 6.10. Análisis de hidrofobicidad del ORF8-9

Si la consideramos como dos proteínas, los valores teóricos calculados son:

- ORF8:

PM: 25637,19 Da

pI: 8,64

- ORF9:

PM: 26424,35 Da

pI: 9,90

6.5.2.- Filogenia de las proteínas de las probables Glicosiltransferasas.

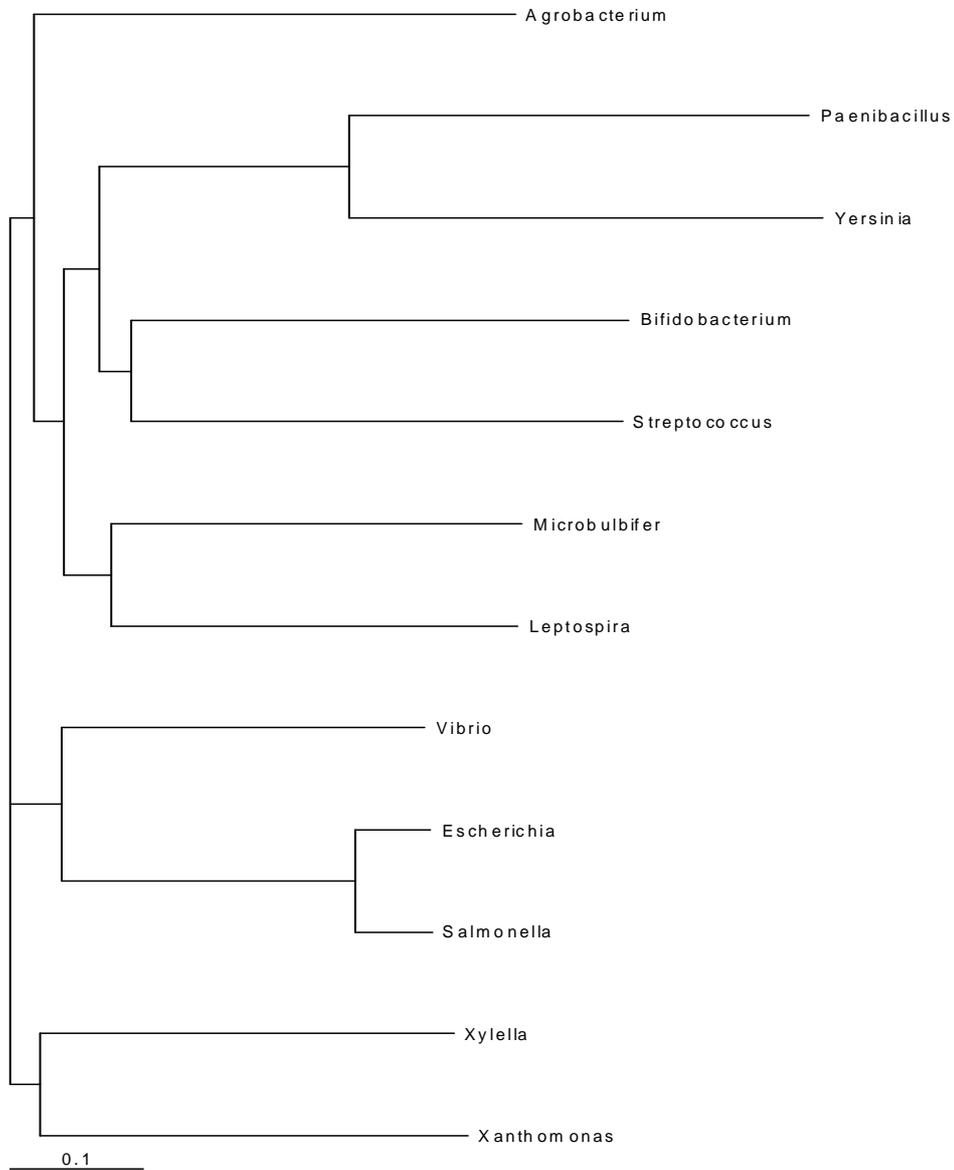


Figura 6.11. Filograma de proteínas homólogas ORF3

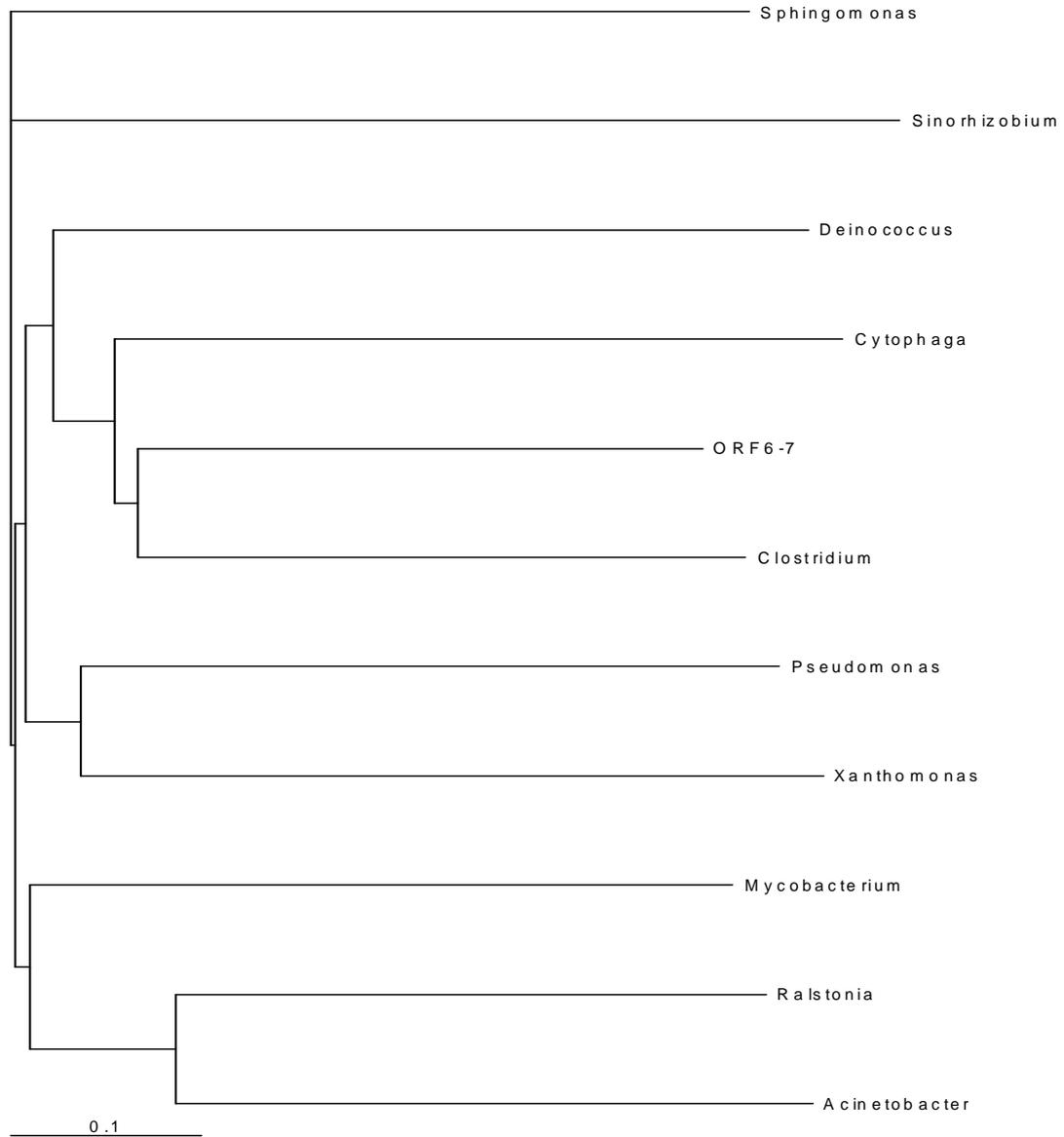


Figura 6.12. Filograma de proteínas homólogas ORF6-7

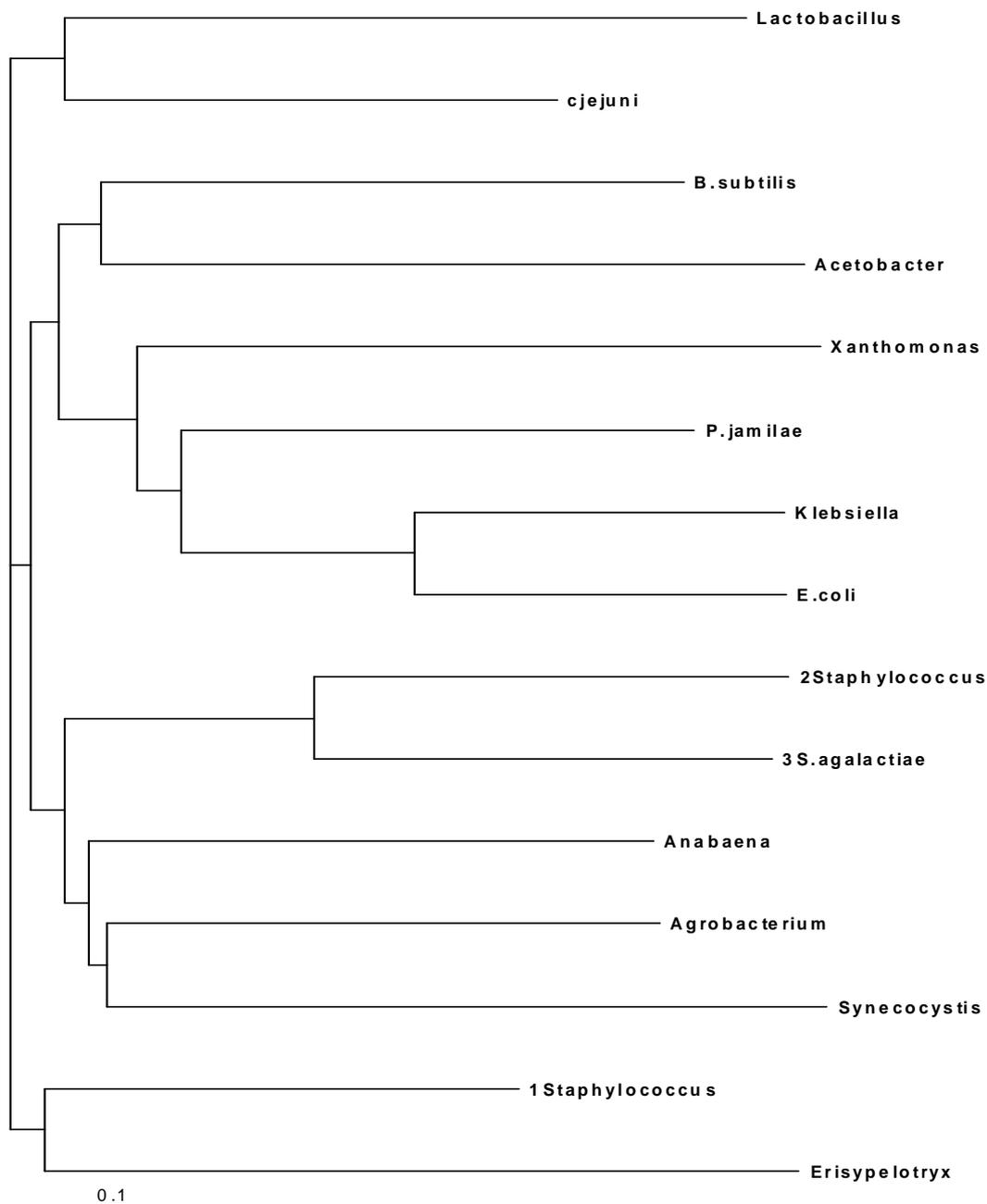


Figura 6.13. Filograma de proteínas homólogas ORF9

6.5.3.- Disrupción de genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido en *P.jamilae*, *B.subtilis* y *E.coli* (pJLA505, pYJ335)

El objetivo de este apartado fue demostrar la implicación directa de los genes de glicosiltransferasas en la biosíntesis del EPS en *Paenibacillus jamilae*. Para ello había que tener en cuenta los siguientes parámetros:

- La elección de un gen de relevancia o con carácter esencial en la biosíntesis del EPS de entre todos los descritos. Elegimos el gen que codificaba el ORF8-9 como diana para la disrupción en todos los experimentos.

- La elección del sistema genético adecuado para abordar la disrupción en una cepa bacteriana gram positiva en la que los fenómenos de transformación, transposición y recombinación son complejos.

a.- Recombinación homóloga en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*

Las construcciones plasmídicas con las que transformamos las cepas de *Paenibacillus jamilae* electrocompetentes fueron denominadas pUC8Cm9 y pUC8Kn9.

La comprobación de la clonación y orientación correcta se realizó por cortes de restricción:

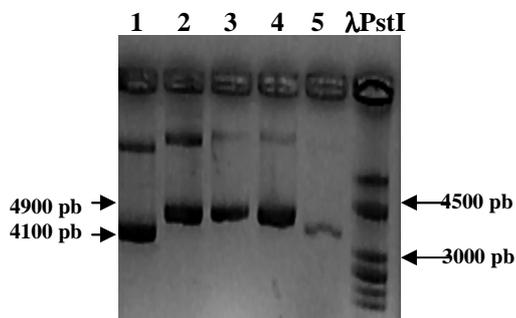


Figura 6.14. Clones recombinantes. 1: pUC8-9; 2: pUC8Cm9; 3: pUC8Kn9
4: control positivo; 5: control negativo

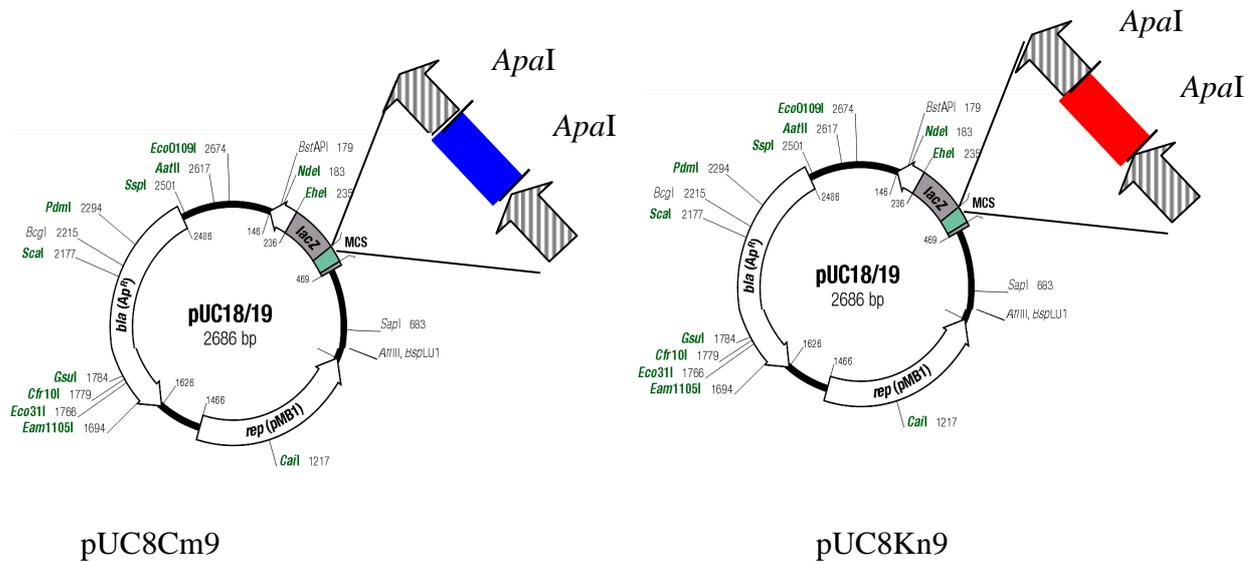


Figura 6.15. Clones recombinantes. pUC8Cm9; pUC8Kn9

Los resultados de la disrupción abordada de este modo no fue concluyente. Debido a la baja eficiencia de transformación unida a la baja probabilidad de recombinación en los géneros de bacterias gram positivas, se generó un número muy bajo de colonias que en todos los casos fueron falsos positivos.

b.- Recombinación homologa en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* y en la cepa 168 de *B.subtilis* .

Con el fin de paliar los fenómenos que podían ser limitantes para obtener un resultado positivo, en este experimento utilizamos además de cepas de *P.jamilae* , *Bacillus subtilis* cepa 168, cepa con mayor eficiencia de transformación. Por otro lado realizamos el experimento con los tres ORFs de glicosiltransferasas ORF3, ORF6-7, ORF8-9 clonados en pGEMT.

Es una recombinación homóloga simple, que en caso de producirse inserta en el cromosoma el vector más inserto linealizado, cuya resistencia actuaría como marcador genético.

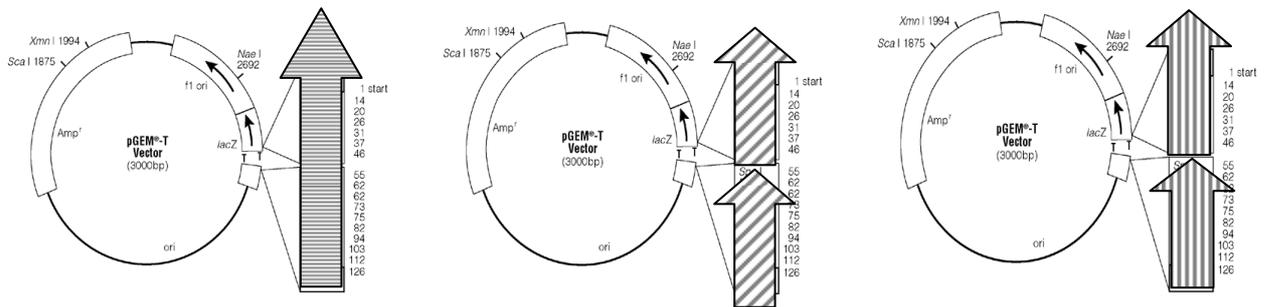


Figura 6.16. Clones recombinantes. pUC8Cm9; pUC8Kn9

Los resultados en este caso también fueron nulos, no aparecieron colonias resistentes a los antibióticos propios del vector (ampicilina).

6.5.3.2. - Interrupción de la transcripción de genes esenciales para la síntesis de exopolisacárido.

6.5.3.2.a. - Disrupción del gen que codifica el ORF8-9 en la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* utilizando el vector pYJ355.

- No apareció ninguna colonia como resultado de la transformación en el primer medio YM-Em, la explicación puede estar en la no compatibilidad del origen de replicación, a pesar, de que era compatible con otras gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, todo ello como en casos anteriores, unido a la menor eficiencia de transformación de *Paenibacillus jamilae*.

6.5.3.2. b.- Disrupción del gen homólogo en *E.coli* XL1Blue al codificado por el ORF8-9 de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* utilizando pYJ355.

- El resultado fue positivo, aparecieron tres colonias bacterianas en el medio con el antibiótico con pérdida de su EPS, mutantes *eps*negativos que chequeamos posteriormente para ver el estado del plásmido.

- La continuidad colonial al sembrarla masivamente frente a su cepa salvaje evidencia la pérdida de la cápsula y su función de la misma en la adherencia colonial.



Figura 6. 17. Disrupción de un gen homólogo necesario para la síntesis de EPS.

- Queda demostrado su papel imprescindible en la formación de la cápsula y en la producción de EPS en *E. coli* XL1Blue.

- Se realizaron ensayos de determinación de la producción de EPS en 100ml de medio líquido YM de las dos cepas de *E.coli* salvaje y transformada con pYJ355:ORF8-9, creciendo durante 36h, se obtuvieron 0,37g y 0,03g respectivamente.

- Otro experimento con el mismo objetivo que los anteriores fue la clonación del ORF8-9 en el vector de expresión pJLA505 en *E.coli*. Resultó en un proceso de recombinación inestable que aumentó puntualmente la capacidad de formación de EPS en las primeras generaciones, comprobada por ensayos de extracción y precipitación de EPS de cultivos de 100 ml de la cepa recombinante, comparándola con la producción de la cepa salvaje. Tras sucesivas resiembras de la cepa recombinante, se volvió al fenotipo normal. Evidenciando que los genes que codificaban los ORF8-9 estaban relacionados directamente con la formación de EPS.

6.5.4.- Análisis de las proteínas codificadas por cada ORF, mediante clonación en vectores fusionados con el gen LacZ y control de la expresión.

Todos los clones positivos tras chequear las posibles colonias mediante la extracción de su Plásmido por lisis alcalina (Sambrook) y con una orientación adecuada

fueron extraídos en grandes cantidades mediante el sistema MiniConcert de Gibco para posteriores análisis.

Fue posible clonar todos los fragmentos de PCR en la misma orientación que el gen *lacZ*, a excepción del clon que contenía el ORF 8 y el ORF 8-9, los cuales sólo se obtuvieron clones en orientación inversa. Como la probabilidad del método empleado de clonación era del 50 % en cuanto a orientación, dedujimos que la viabilidad de la célula no era posible con estos clones en orientación, porque dicha proteína sobreexpresada les era tóxica a la cepa aceptora *E.coli* XL1Blue.

6.5.4.1.- Análisis proteico *in vitro* de los clones recombinantes.

Destacamos la sobreexpresión clara de los genes *epsM* y *epsGlu*, dando lugar a proteínas de ≈ 40 KDa ambas, valor que es muy similar al valor teórico predicho para ambas (tabla 6.2). La expresión de esta última proteína EpsGlu da una señal más potente porque se suman las actividades del promotor del gen *lacZ* y su propio promotor interno situada su posición +1 a 42 nucleótidos del codon ATG de inicio de la proteína (Figura 5.10. Secuencia nucleotídica completa 5'-3').

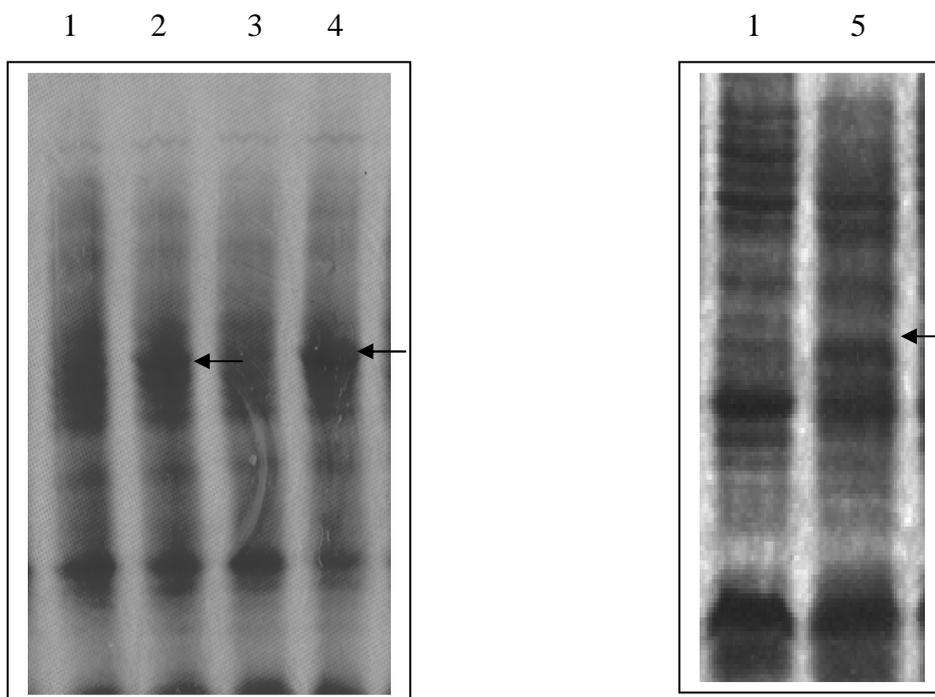


Figura 6.18. Análisis de proteínas SDS-PAGE

6.5.4.2. - Ensayos enzimáticos de las GTF.

- Los resultados que se observan en esta gráfica sólo fueron posibles

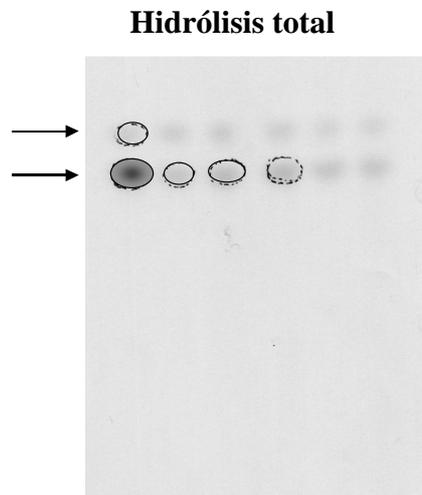


Figura 6.19. Clones recombinantes. pUC8Cm9; pUC8Kn9

- **Actividad de las hexosiltransferasas. Integración de azúcares marcados con 14C.**

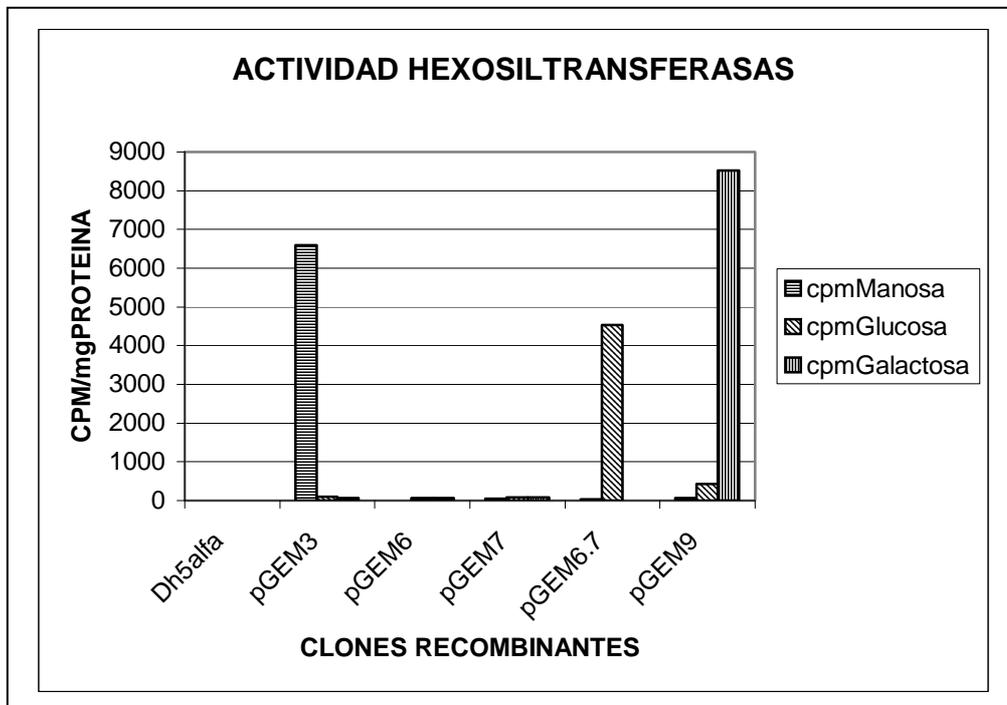


Figura 6.20. Actividades específicas hexosiltransferasas.

- Nombres de cada una de las proteínas implicadas en la transferencia de azúcares activados para la formación de la unidad fundamental del biopolímero:

Tabla 6.2.- Propiedades de las Glicosiltransferasas de *Paenibacillus jamilae*

Gen	ORF	Nombre de la Proteína	PM (Da)	pI	Actividad enzimática
<i>eps3</i>	ORF3	EpsMan	39494,83	9,21	Manosiltransferasa
<i>eps6-7</i>	ORF6-7	EpsGlu	37812,80	8,84	Glicosiltransferasa
<i>eps8-9</i>	ORF8-9	EpsGal	49732,72	9,48	Gluco/Galactosiltransferasa

MODELO DE BIOSÍNTESIS TEÓRICO DEL HETEROPOLISACÁRIDO DE *Paenibacillus jamilae*

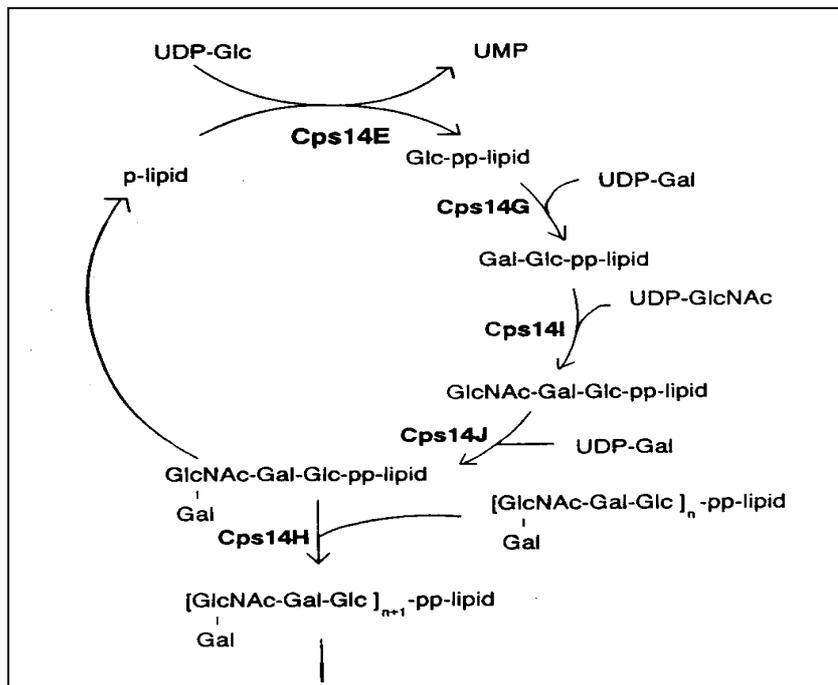


Figura 6.21. Modelo teórico de biosíntesis de EPS.

6. 4. – Discusión

El análisis funcional de las Glicosiltransferasas presentes en el operón de biosíntesis de EPS de las cepas bacterianas de interés es un prerrequisito fundamental para el futuro de la bioingeniería del EPS y oligosacáridos.

En este estudio hemos realizado el análisis funcional de los genes que codifican para GTF *epsMan*, *epsGlu* y *epsGal*, situados en la región central del cluster genético de EPS de la cepa B.7 *P.jamilae*. Los productos proteínicos de los genes EpsMan, EpsGlu, EpsGal estaban envueltos en procesos de biosíntesis secuencial de la unidad repetitiva oligosacáridica.

La filogenia de la proteína EpsGal de *P.jamilae* demuestra su gran relación con las proteínas codificadas por los genes de *Xanthomonas campestris* y *Acetobacter xylinus*, bacterias productoras de EPS de gran interés industrial (bibliografía), con operones de biosíntesis de EPS muy complejos, dada la gran cantidad de enzimas implicadas en el proceso global. Agrupados en el mismo cluster destacamos la presencia de proteínas homólogas de *Bacillus subtilis* y *E.coli*, a pesar de que la estructura en forma de operón de biosíntesis de EPS difiere bastante de los agrupamientos genéticos característicos (Bibliografía). Ambas cepas nos servirían para experimentos de recombinación genética en uno de los genes que habíamos considerado esencial, *epsGal*.

A pesar de la notoria promiscuidad en la transferencia genética bacteriana en general, los procesos de recombinación en bacterias gram-positivas es mucho más complejo que en gram-negativas y concretamente la frecuencia de recombinación homóloga decrece paralelamente con la distancia evolutiva o divergencia entre el donador y receptor. Los resultados de los intentos de recombinación y disrupción de genes esenciales para la biosíntesis de EPS en *P.jamilae* han sido prácticamente nulos, al igual que en *B.subtilis*, frente a la disrupción exitosa del gen homólogo en *E.coli*, que dio lugar a un fenotipo colonial liso (Figura 6.17), con la consiguiente pérdida de la capacidad de agrupamiento. Según Majewski y Cohan, 1999, los mecanismos moleculares de recombinación en *Bacillus* no han sido elucidados totalmente, lo que sí está claro es que difieren de los observados para *E.coli*, que sólo necesita una única secuencia conservada (Shen y Huang 1986), frente a los requerimientos para *Bacillus*

de regiones cortas de secuencias conservadas en ambos extremos de los DNAs donador y receptor.

Una vez que demostramos la implicación directa de los genes descritos en *P.jamilae* con la formación de EPS, comprobamos *in vitro* cada una de las actividades enzimáticas predichas por similitudes, de acuerdo a los métodos descritos por Kolman *et al.*, 1996. EpsGal era capaz de transferir *in vitro* Galactosa-P a un transportador lipídico. Para las bacterias gram-negativas la molécula transportadora lipídica ha sido caracterizada como undecaprenilfosfato (Whitfield 1993; Shimizu y Ogura 1997; Crick *et al.* 2000; Pan *et al.* 2000), no así para bacterias gram-positivas. Estudios realizados para algunas bacterias del ácido láctico es insensible a la bacitracina, por lo que se ha considerado la posible presencia de transportadores alternativos (Stingele F y Nesser).

Así podemos considerar que EpsGal es una GTF con especificidad Galactosiltransferasa. Probablemente pertenece a un tipo de fosfoglicosiltransferasas, enzimas con dos dominios, en el que el dominio C-carboxilo terminal contiene la actividad Glicosiltransferasa, o bien constituye una enzima de un solo dominio que correspondería por homología al dominio C-terminal de las enzimas de dos dominios (Stingele *et al.* 1999). En nuestro estudio consideramos la proteína EpsGal completa constituida por los dos ORF8-9, con un total de 400 aminoácidos con unos valores de pI de 9.48, un peso molecular 49KDa teóricos, y unos valores alternativos de hidrofobicidad según Kittle y Doolittle, sin ninguna zona característica a reseñar. El ORF9 constituiría el dominio C-terminal que contiene la actividad Glicosiltransferasa, Galactosiltransferasa mayoritaria (Figura 6.20.), según los resultados de la determinación de su actividad enzimática con los distintos azúcares marcados, aunque los datos obtenidos en la cromatografía en capa fina de la hidrólisis total (Figura 6.19) revelaba que además de incorporar galactosa activada, era capaz de incorporar glucosa activada cuando era el único azúcar añadido, así puede tener una débil actividad glucosiltransferasa que puede ser detectada *in vitro* en *E.coli*.

El ORF8 formaría el dominio o extremo amino N-terminal de la proteína EpsGal, cuya función puede estar relacionada con el plegamiento correcto o estabilidad conformacional de la proteína completa, ya que nos es posible detectar la sobreexpresión en gel de poliacrilamida mediante SDS-PAGE (Figura 6.18) del clon con ORF9 sólo, por el contrario sí obtenemos datos de actividad enzimática del mismo

clon, por lo que dedujimos que no se ve afectado su carácter funcional cuando no tiene el extremo N-terminal. Otra posible función de este dominio N-terminal (ORF8) de aproximadamente 200 aminoácidos sea la de mantener el contacto con la unidad repetitiva creciente para incrementar el ritmo de liberación de ésta y facilitar a nivel de la membrana celular del reciclado de la molécula transportadora lipídica (Wang et al. 1996; Liu et al. 1996). La función real no está totalmente definida, pero ésta última hipótesis podría apoyar la imposibilidad de clonar en orientación positiva en un vector de alto número de copias o con un promotor fuerte delante el ORF8 sólo o el ORF8-9. Ambas construcciones plasmídicas le resultan tóxicas a la bacteria receptora, porque producen probablemente una alteración de la estructura de su membrana.

De acuerdo a la estructura química de la unidad repetitiva, otro azúcar constituyente del oligosacárido es la glucosa, la unión de ambas requiere la acción de una Glucosiltransferasa, función hexosiltransferasa, que se detectó *in vitro* en el clon recombinante que contenía el ORF6-7 que codifica la proteína EpsGlu (Figura 6.20). Puede transferir una glucosa a la galactosa ligada al transportador lipídico. Su expresión en SDS-PAGE muestra un tamaño aproximado de 40KDa que coincidía con el predicho mediante programas informáticos. La señal es más fuerte que la de otra proteína sobreexpresada en el mismo vector, lo que se puede explicar porque la secuencia clonada contiene un inicio del promotor propio además del promotor del vector, sumándose así sus efectos.

La manosa también es parte del oligómero, así la EpsMan podría actuar uniendo manosa al dímero o trímero ya formado y unido al transportador lipídico. La actividad específica encontrada *in vitro* es manosiltransferasa, ya que incorpora de forma mayoritaria manosa activada (Figura 6.20). La sobreexpresión del clon con el ORF3 pone de manifiesto el tamaño de la proteína $\approx 40\text{KDa}$, que coincide prácticamente con el de la proteína EpsGlu.

Si nos basamos en las similitudes de secuencia EpsGlu y EpsMan contiene dominios homólogos muy conservados. Ambas podrían pertenecer a una extensa familia de α -glicosiltransferasas (Geremia et al., 1996; Campbell *et al.*, 1997), que tienen sus homólogos también en eubacterias gram-negativas, como describe Stinglee et al. 1999 (por ejemplo, RfaK para la síntesis de la capa interna del núcleo del LPS en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*), en arqueobacterias (por ejemplo, proteínas

probables MJ1069, MJ1178, y MJ1059 de *Methanococcus jannaschii*), cianobacterias (ej., la proteína posible sll1971 de *Synechocystis* sp.) e incluso en eucariotas (ej., Gpi1 humana y Gpi3 de *Saccharomyces cerevisiae*). No existe representatividad de estas proteínas entre los micoplasmas.

Las β -glicosiltransferasas entre las que podemos agrupar a la proteína EpsGal contiene también motivos típicos de la familia de enzimas de tipo 2 (Saxena 1995; Campbel *et al.*, 1997). Es la única de las tres Glicosiltransferasas descritas que contiene la secuencia señal consenso EXXXXXXXXXE que había sido propuesta para ser centro catalítico (Geremia *et al.*, 1996; Nota breve 2000).

La influencia del orden estructural de los genes *epsMan*, *epsGlu* y *epsGal*, en la cepa B.7 de *P.jamilae* no está muy clara. Como en todos los operones están también situados en la región central del cluster, pero éstos no coinciden con la disposición genética de otras bacterias, en las que se cumple la correlatividad de los genes y su estructura química, indicando o implicando la necesidad de ser coexpresados para mantener la estructura, como por ejemplo en *Streptococcus thermophilus* Sfi6, para obtener el disacárido GalNAc-Gal se deben coexpresar los genes *epsE* y *epsG*. En el caso de *P.jamilae* podemos decir que todas Glicosiltransferasas forman un complejo biosintético no ordenado para mejorar la procesitividad y versatilidad de la unidad fundamental que constituirá el biopolímero, cuya expresión puede estar controlada por la disponibilidad de nutrientes del entorno microambiental, ya que contiene además un promotor con regulador interno delante del *epsGlu*.

La presencia hacia el extremo 3' del gen de GDEP (glicerofosfodiesterasa) ORF10 adyacente al final del gen *epsGal* induce a pensar que podría tratarse de la enzima encargada de liberar la unidad repetitiva formada sobre el transportador lipídico, como el gen *epsJ* de *Lactococcus lactis* NIZO B40 (Kranenburg *et al.* 1999). La expresión del resto de enzimas del operón permitirán la polimerización y el transporte hacia el medio externo circundante.

El alto coste energético y la producción aparente de EPSs en *Paenibacillus jamilae* hace emerger un punto de vista interesante sobre el papel de la producción de EPS para dichas bacterias. En la mayoría de ambientes naturales, la asociación con una superficie en estructura de biofilm es el estilo de vida microbiano que prevalece

(Watnick and Kolter 2000), si tenemos en cuenta la procedencia de estas cepa, un residuo tóxico, alpechín, la teoría anterior se refuerza. Las asociaciones superficiales es una forma eficiente de persistencia en un microcosmos favorable antes que ser barrido por la corriente. El papel del EPS en bacterias podría constituir una forma de colonizar nichos ecológicos determinados. Otro papel propuesto, es ser un mecanismo de defensa contra la intrusión intracelular de sustancias tóxicas para el metabolismo de la célula, en el caso del alpechín y alpeorujo, el EPS es capaz de formarse por la disponibilidad de carbohidratos del medio (López *et al.*,2001) y como respuesta al efecto tóxico. El EPS formado por la bacteria actuará de barrera física, impidiendo el paso de ácidos fenólicos en el interior de la célula. Por su composición y estructura macromolecular puede tener también una función de reserva nutritiva.

6. 7. – Conclusiones

1. El gen principal en la síntesis del heteropolisacárido de *Paenibacillus jamilae* está filogenéticamente muy próximo al de *Xanthomonas campestris*.
2. La implicación del gen *epsGlu* (ORF8-9) en la formación de EPS es esencial.
3. La parte aminoterminal de la proteína EpsGlu (ORF8) es una proteína transmembrana cuya sobreexpresión le es tóxica a células de *E.coli* y es necesaria para el plegamiento de la proteína completa, no así para su función.
4. Las tres actividades detectadas han sido manosiltransferasa, glucosiltransferasa y galactosiltransferasa para EpsMa (ORF3), EpsGlu (ORF6-7)y EpsGal(ORF8-9) respectivamente.
5. Existe una función epimerasa entre los ORF6-7, que permite la utilización indistinta de glucosa o galactosa por la proteína que codifican.

6. Confirmamos que la GTF primaria es la proteína codificada en el ORF8-9, EpsGal con especificidad galactosiltransferasa.

7. El modelo de biosíntesis teórico predicho genera un oligosacárido: [Gal-(Glu)₂-Man] que tiene concordancia con la composición química mayoritaria de los azúcares del biopolímero.

Capítulo 7. Análisis transcripcional del operón del exopolisacárido

Capítulo 7. Análisis Transcripcional del operón del exopolisácarido:

7. 1. – Resumen

7. 2. – Introducción

7. 3. – Objetivos

7. 4. – Material y métodos

7. 5. – Resultados

7.5.1.- Northern Blot

7.5.2.- Localización de las zonas promotoras dentro del operón

- Comprobación del carácter de un posible promotores en vectores específicos para la selección de promotores.

- Primer extensión

7.5.3.- Zonas reguladoras. Comparación de las secuencias adyacentes al promotor en 3' con las secuencias de otros promotores internos de genes de biosíntesis de EPS.

7. 6. – Discusión

7. 7. – Conclusiones

7.1. – Resumen

A continuación describimos los detalles de un análisis transcripcional que engloba la localización general de promotores en la secuencia del operón de biosíntesis del EPS mediante análisis informático. Los genes que codifican para las proteínas implicadas en este proceso están predominantemente transcritos como un único RNA mensajero que es de un tamaño aproximado de 12-14 Kb. Hay un promotor al inicio del operón y existen además zonas promotoras con sus sitios de inicio de transcripción en el interior del operón, delante de los genes que codifican glicosiltransferasas, garantizándose la transcripción y expresión de estas enzimas esenciales para la biosíntesis del polímero. Hemos determinado el carácter fuerte de un promotor que potencia la transcripción interna de los genes esenciales *epsGlu* y *epsGal* y *epsGDEP* mediante su clonación en vectores de fusión específicos, pKK232-8 y pASV4. Hemos determinado también dos posibles sitios de inicio St1 y St2 claramente definidos y un posible sitio más de inicio más débil de dicha zona promotora mediante “primer extensión”.

Planteamos la hipótesis de regulación de los promotores internos del operón del EPS, por homología de secuencias con las ya descritas para otras especies bacterianas productoras de EPS.

La existencia de genes adyacentes al operón que codifican para una helicasa y una proteína de función desconocida en el extremo 3' puede también constituir un elemento de regulación en la transcripción de dicha zona del operón, así como las topoisomerasas localizadas en la zona 5' del mismo.

7. 2. – Introducción

La regulación de la expresión de los genes de EPS es compleja y envuelve una gran cantidad de factores; dependiendo de cada especie bacteriana, el tipo de control es diferente.

Los niveles de síntesis de EPS está delimitado, en relación directa, por el nivel de transcripción de los genes *eps* (Trisler & Gottesman 1984).

La producción de EPS en distintas especies bacterianas (como algunas exoenzimas) está controlada de forma potente por una red o cascada de más de 10 genes reguladores (Schell, M. A., 2000). En determinadas especies, la inactivación de dichos genes reguladores, como en *Rasltonia solanacearum*, causa un alto porcentaje de reducción de la transcripción del promotor de EPS, conduciendo a la consiguiente pérdida de producción de EPS. Otra forma de controlar la expresión es la afectación directa que ejercen determinadas proteínas codificadas por genes localizados hacia el extremo 3' del operón por interacción directa con la unión de la RNA polimerasa con el promotor de Eps (Hoch, J.A., & Silhavy 1995; Huang, 1995). Las proteínas de unión directa al DNA también constituyen un potencial elemento regulador de la transcripción de EPS. Así mismo es absolutamente necesario conocer y definir la región 5' adyacente al promotor, ya que es la que permitirá la unión de las distintas proteínas reguladoras. Dicha región varía en tamaño, desde un centenar de pares de bases, de forma común a incluso un millar de pares de bases, de forma excepcional (Burger & Geider, 1995).

La biosíntesis de EPS de alto peso molecular en diferentes bacterias es modulada por una red de proteínas reguladoras llamada Rcs (siglas inglesas de Regulación de la síntesis capsular). Ejemplos adestacar son la síntesis de ácido colánico y determinados antígenos K en *Escherichia coli* (Keenleyside *et al.*,1992), *Klebsiella aerogenes* (Wacharotayankun *et al.*,1992) y *Salmonella typhi* (Virlogeux *et al.*,1996). También en bacterias patógenas de plantas, la regulación de la síntesis de EPS mediante Rcs ha sido demostrada (Poetter, K & Coplin, D. L., 1991; Bereswill, S., & Geider, K., 1997).

La biosíntesis de EPS se induce supuestamente por la percepción de señales externas, gracias a las proteínas sensoras localizadas en la membrana, como la proteína RcsC. La señal podría ser traducida como una fosforilación de la respuesta al regulador RcsB, ambas proteínas representan un típico sistema bacteriano de control de señales de dos componentes (Stout & Gottesman 1990).

Altos niveles de biosíntesis de EPS requieren la coinducción por proteínas inestables, como la RcsA (Stout *et al.*, 1991) y RcsB que están agrupadas en genes de clase LuxR, junto a los reguladores organizados según la secuencia de su hélice-giro-hélice C-terminal, como motivo de unión específico a DNA.

Las unidades transcripcionales de los operones de EPS pueden contener grandes regiones implicadas de función aún desconocida. Se han descrito las uniones de proteínas reguladoras en *Escherichia coli* y *Erwinia amylovora* a unas zonas localizadas a unos quinientos nucleótidos del primer gen del operón de biosíntesis de EPS.

Actualmente existen muchos estudios para definir las regiones esenciales de unión de proteínas Rcs, como constituyentes de la ruta de regulación de la biosíntesis de EPS (Wehland *et al.*, 1998; Garga *et al.*, 2000).

La autoinducción o “quorum-sensing” es una forma de regulación dependiente de la densidad de población, que también puede controlar la producción de EPS, por ejemplo en *Pantoea stewartii*, una bacteria patógena de plantas, cuyo EPS constituye un factor de virulencia (Beck von Bodman & Farran 1995).

7. 3. – Objetivos

Tras localizar la región genómica que contiene los genes implicados en la biosíntesis de EPS de la cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae* y confirmar las funciones enzimáticas de dichos genes, es necesario el planteamiento de un análisis transcripcional preliminar que

nos permitirá definir los elementos reguladores que controlan la transcripción del operón.

Objetivo general:

Localizar e identificar elementos reguladores de la transcripción en la regulación genómica que contiene el “cluster” *eps* implicado en la biosíntesis de EPS en *Paenibacillus jamilae*.

Objetivos específicos:

1. Localización de los elementos reguladores de la transcripción en la región genómica en estudio.
2. Estudio de la región promotora-reguladora del cluster *eps*.
3. Localización bioinformática de repeticiones invertidas en la región genómica en estudio

7. 4. – Material y métodos

Las bacterias son organismos altamente versátiles y de respuesta rápida ya que perciben los niveles de muchos metabolitos, y utilizando una amplia variedad de mecanismos, regulan sus patrones metabólicos.

El control de la expresión genética es crítico para determinar el patrón de los procesos celulares. Así por ejemplo *E.coli* puede contener alrededor de 10 copias de las proteínas más escasas y hasta un 10^5 copias de las más abundantes. Además, la velocidad de síntesis de algunas proteínas varía en un rango aproximado de 1000 veces en respuesta al suministro de nutrientes o a cambios ambientales.

La actividad genética se regula fundamentalmente a nivel de la transcripción. La transcripción coordinada de los genes de un operón se puede activar por activadores o reprimir por represores.

La transcripción empieza junto a centros promotores y finaliza en los centros de terminación. Los DNA moldes contienen regiones llamadas centros promotores que se unen específicamente a la RNA polimerasa y determinan dónde comienza la transcripción. En las bacterias, son muy importantes las dos secuencias situadas cerca del primer nucleótido que va a ser transcrito y ubicadas hacia el extremo 5' (Fig7.1). Una de ellas es la secuencia Pribnow o caja TATA, por contener la secuencia consenso **TATAAT** y está centrada a -10 (diez nucleótidos hacia el lado 5' a contar desde el primero transcrito, que se designa como +1). La otra, llamada *región -35*, tiene la secuencia consenso TTGACA. El primer nucleótido transcrito es normalmente una purina.

Hemos analizado la secuencia que contiene los genes del operon implicados en la biosíntesis de EPS de la cepa B.7 de *P.jamilae* (Figura 7.1). Secuencia nucleotídica completa 5'-3') obtenida como secuencia borrador, buscando las secuencias probables promotoras con sus posiciones de las cajas TATA posición -10, sus secuencias -35 y el nucleótido +1.

Tabla 7.1. Secuencias promotoras putativas dentro de la región genética de biosíntesis de EPS de *Paenibacillus jamilae*

Gen	Promotor	Secuencia -35	Secuencia -10	Sitio de Inicio+1
EpsORF1	P1	TGAGTG-214	TATAAT-230	A
EpsORF3	P2	TTATCG-1960	TATAAT-1982	A

EpsORF5	P3	TTCTAA-3526 TTATGG-3877 TTGCGC-4344	TATAAT-3547 TATAAT-3893 TATAAT-4371	G G A
EpsORF6	P4	TGTAAG-4429	TATAAT-4451	A
EpsORF8	P5	TGTGAA-6019	TATAAT-6045	T
EpsORF10	P6	TTGTCC-7362	TATAAT-7386	T
SecConsenso		TTATAG	TATAAT	Purina preferente
SecConsenso <i>E.coli</i>		TTGACA (15-19)	TATAAT	ND

- La posible zona promotora-reguladora de mayor interés en la biosíntesis de EPS de la cepa B.7 de *P.jamilae* responde a la siguiente secuencia, localizada entre las posiciones 5'-3414 y 4323-3' de la secuencia nucleotídica final:

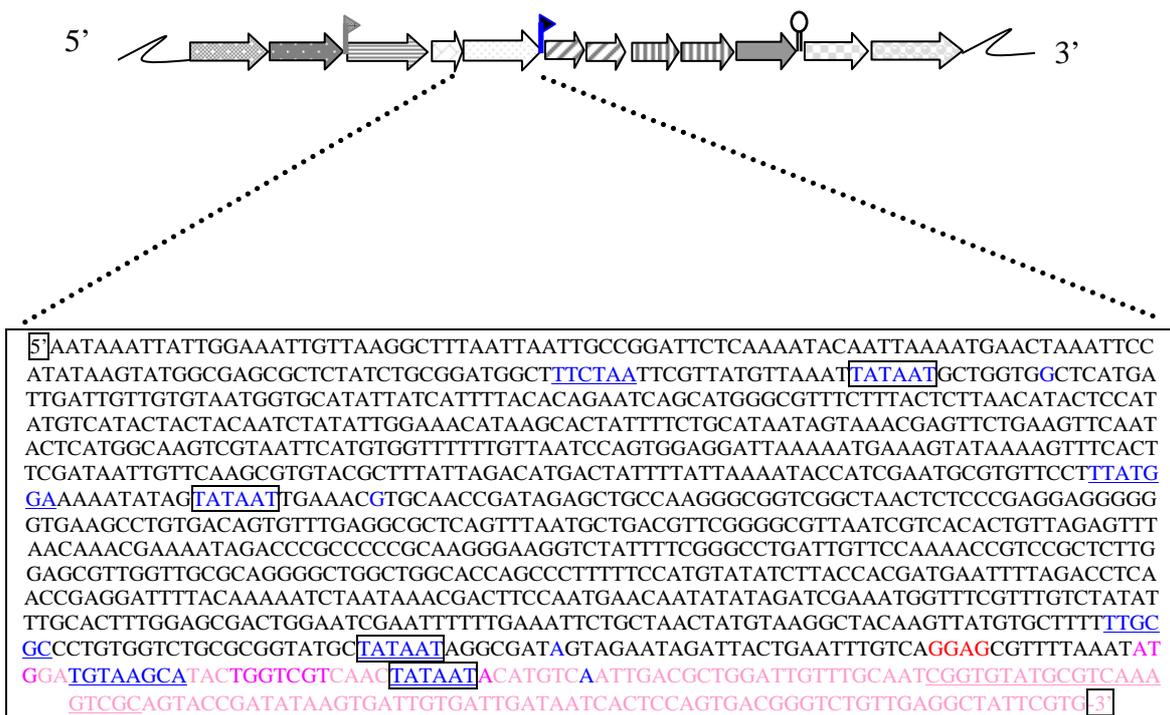


Figura 7.1. Secuencia nucleotídica promotora-reguladora putativa.

Los promotores difieren considerablemente en su eficacia. Los promotores fuertes producen frecuentes iniciaciones de la transcripción (cada dos minutos). En

cambio los genes que tienen promotores muy débiles se transcriben una vez cada diez minutos. Las regiones -10 y -35 de los promotores más fuertes tienen secuencias que coinciden exactamente con las secuencias consenso, mientras que los promotores débiles tienden a tener múltiples sustituciones en estas secuencias (Stryer-3ª Ed.). De hecho una mutación en una sola base de la secuencia -10 o de la -35 puede originar la pérdida de actividad del promotor. La distancia entre ambas secuencias conservadas es también importante: la separación óptima es de 17 nucleótidos. La frecuencia de transcripción de muchos genes está también notablemente influenciada por proteínas reguladoras que se unen a determinadas secuencias próximas a los centros promotores e interaccionan con la RNA polimerasa.

La síntesis de RNA se realiza en dirección $5'-3'$, la elongación tiene lugar en burbujas de transcripción que se desplazan a lo largo del molde de DNA hasta encontrar la horquilla de terminación, seguida de varios residuos de uridina, o bien por la participación de la proteína ρ .

La RNA polimerasa discurre a lo largo del molde de DNA y transcribe una de sus hebras hasta alcanzar la señal de terminación. Esta señal en *E. coli* consiste en una horquilla de bases emparejadas en la molécula de RNA recién sintetizada. Esta horquilla se forma por emparejamiento de bases de secuencias autocomplementarias, ricas en G y en C. El RNA naciente se disocia espontáneamente de la RNA polimerasa cuando a la horquilla le sigue una hilera de residuos U. Otras veces la síntesis de RNA puede terminar por la acción de la proteína ρ (ρ). Algunas de las secuencias de terminación descritas en *Bacillus subtilis* (Bibliografía-Secuenciación completa) son las siguientes, en general tienen aproximadamente 20 nucleótidos:

Tabla 7.2. Terminadores transcripcionales

Posición relativa en el cromosoma	Secuencia 5'-3'
5161-5175	CGCATCCG TGTTT CGGATGCG
11612-11636	GAACGCATTCCAA TTGGATGCGTTC
14875-14893	CCCGG CTTCAAA CCGGGA
18940-18959	AGCCGC CTGCCC GCGGCTC
19139-19161	ACACCTGAGCAAACAGGTGT C
23725-23742	CCCTCT ATCA AGAGGGA
43094-43115	CGCGCC TCCCTAAA GGCGCG A

La secuencia del terminador transcripcional en la cepa B.7 de *P.jamilae* reconocida en el operón de biosíntesis de EPS está situada de forma adyacente al extremo 3' del ORF10 (GDEP). Tiene también 22 nucleótidos:

⦿
|| Posiciones 7684-7707: 5'-AACGCAT CTGGTTGT ATGCGTT-3'

El desenrollamiento favorece que se ligue la RNA polimerasa. El superenrollamiento negativo de los moldes de DNA circular favorece la transcripción de muchos genes. Así pues, la inyección de superhélices negativas en el interior del DNA por la DNA girasa (DNA helicasa), puede aumentar la eficacia de promotores situados en centros distantes. Sin embargo no todos los promotores se estimulan por el superenrollamiento negativo. Una excepción notable es el promotor de la DNA girasa. La velocidad de transcripción de este gen disminuye por un superenrollamiento negativo, lo que constituye un buen control feedback que asegura que el DNA no se superenrolle en exceso. Modificando el ángulo entre las regiones -10 y -35, el superenrollamiento negativo podría disminuir la eficacia de este promotor.

La transición del complejo promotor cerrado (en el que el DNA está en forma doble helicoidal) al complejo promotor abierto (en el que un segmento de DNA está

desenrollado) es un suceso clave en la transcripción. En ese momento está todo preparado para la formación del primer enlace fosfodiéster de la nueva cadena de RNA.

Podemos deducir que la importancia de las enzimas que inducen el enrollamiento, desenrollamiento y relajación del DNA para el control de la transcripción del DNA es primordial.

En nuestro estudio detectamos la presencia de secuencias con homologías con topoisomerasas en el extremo 5' de las Glicosiltransferasas y de una helicasa muy conservada en secuencia y disposición junto a un gen *pcrB* de función desconocida, hacia el extremo 3' de las GTF.

Una vez localizadas y reconocidas las secuencias de mayor interés implicadas probablemente en los procesos de transcripción y regulación de los genes del operón de biosíntesis de EPS de *P.jamilae*, sabiendo además el mecanismo e importancia de estos elementos por analogía en otros operones, analizamos el impacto real de cada uno de los elementos encontrados mediante ensayos experimentales o por similitudes, cuyos resultados presentamos a continuación.

7.5. – Resultados

7.5.1. Northern Blot

La extracción de ARN se realizó de cultivos de *Paenibacillus jamilae* crecida en medio LB, LB con un 10% de glucosa; LB con un 10% de galactosa; LB con un 10% de manosa. Para ver que regulación ejercían sobre los promotores los diferentes azúcares.

Las sondas utilizadas fueron N1 (ORF2), N2 (ORF3) y N3 (ORF6-7) obtenidas por PCR con oligonucleótidos específicos y marcadas con ^{32}P , de acuerdo a MyM.

La dirección de transcripción de los genes de EPS son predichos por análisis computacional, que podemos observar según la dirección de las flechas en la figura 7.1. Organización genética del operon).

Los resultados de homologías de los ORF coherentes de secuencias proteicas demostraron la única dirección 5'-3' codificante. Aparentemente no encontramos orientaciones antisentido.

Demuestra la existencia de un promotor, P1, muy fuerte al principio del operón de biosíntesis del EPS en la cepa B.7 de *P.jamilae*, genera el predominio su RNA mensajero completo frente a otros que están controlados por promotores más débiles y cuyos transcritos son más lábiles.

7.5.2.- Zonas promotoras primarias dentro del operón

Distinguimos entre promotores primarios y secundarios, dependiendo del grado de control de transcripción que ejerzan sobre los genes, muy fuerte o débil, respectivamente.

Hemos centrado nuestro análisis transcripcional completo en la secuencias probables promotoras primarias con características especiales, por su localización dentro del operón, (Figura 7.1) P.3, que precede a genes esenciales para la biosíntesis de EPS en *P.jamilae*, como epsGlu y epsGal y a su vez la secuencia promotora está precedida por una secuencia que se podría considerar como zona reguladora ya que no codifica para ninguna proteína concreta.

7.5.2.1.- Comprobación del promotor probable en vectores de fusión específicos para su selección.

Los vectores utilizados se caracterizan por tener una zona de clonación en el extremo 3' de un gen de resistencia a antibiótico, gen *cat*, carente de promotor: pKK232-8 (Brosius, J. 1984) y pASV4 (Suárez *et al.*, 1997).

La clonación en orientación adecuada del fragmento con el promotor y posible regulador (≈ 1000 pb) la obtuvimos sólo en pKK232-8, clon con el que obtuvimos los siguientes resultados.

Características del vector **pKK232-8** (Brosius, J. 1984) las señalamos a continuación:

- Es un plásmido derivado de pBR322 conteniendo un inhibidor del promotor del gen *cat* Cloramfenicol acetiltransferasa con un sitio múltiple de clonaje (MCS) en su extremo 5'-terminal. La transcripción del gen *cat* permite ser utilizado para asegurar la fuerza de promotores insertados en el plásmido. Los terminadores RNA T1 y T2 distales al gen *cat* permite la clonación de promotores fuertes. Un terminador transcripcional adicional en el extremo 3' del MCS previene lecturas desde los promotores de pBR322. Tres códon de parada entre el MCS y el AUG del gen *cat* prohíbe lecturas translacionales dentro del gen *cat*.

- Clonación: MCS contiene cuatro únicos sitios de restricción.
- Análisis del Promotor: Los fragmentos que contienen insertado un promotor in el MCS sirve como promotor para el gen *cat* sin promotor. La fuerza del promotor es medida por la transcripción de *cat*. Los niveles son dependientes de la fuerza del promotor insertado.
- Hospedador : *E.coli*
- Marcador seleccionado: Plásmido que confiere resistencia a Ampicilina.
- Amplificación Recomendada.

Con oligonucleótidos específicos (Tabla 7.1. Oligonucleótidos) que se unen a regiones que flanquean y contienen la zona del promotor ORF5 (Figura 7.1.) amplificamos mediante PCR dicho fragmento de $\cong 1000$ pb y cortamos con la enzima de restricción *HindIII* (NewEnglandBiolabs) que clonamos en el vector pKK232-8, cortado con la misma enzima de restricción y defosforilado previamente con Fosfatasa alcalina. Utilizando Ligasa T4 en la reacción y posteriormente transformando en *E. coli* XL1Blue.

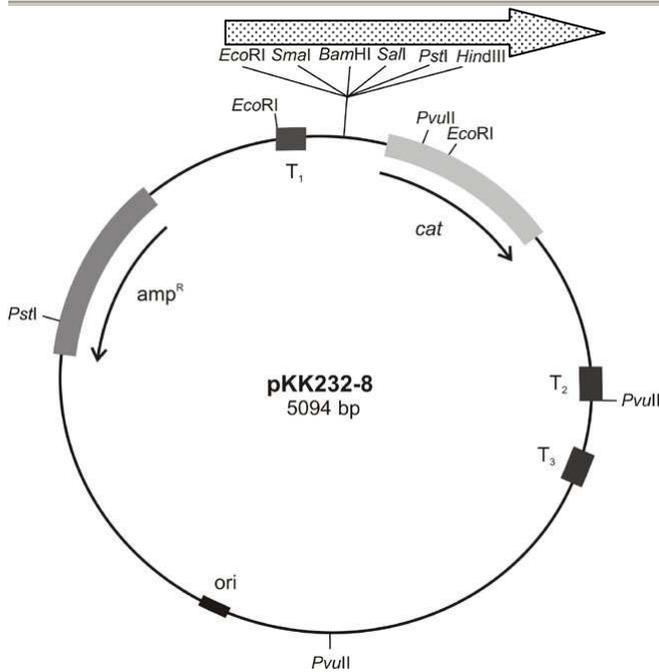


Figura 7.2. Vector pKK232-8 más inserto de la zona promotora-reguladora.

Los transformantes seleccionados como positivos fueron aquellos que eran resistentes a Amp y a Cm. Una vez seleccionados se extrajo el Plásmido para confirmar mediante cortes de restricción la orientación correcta.

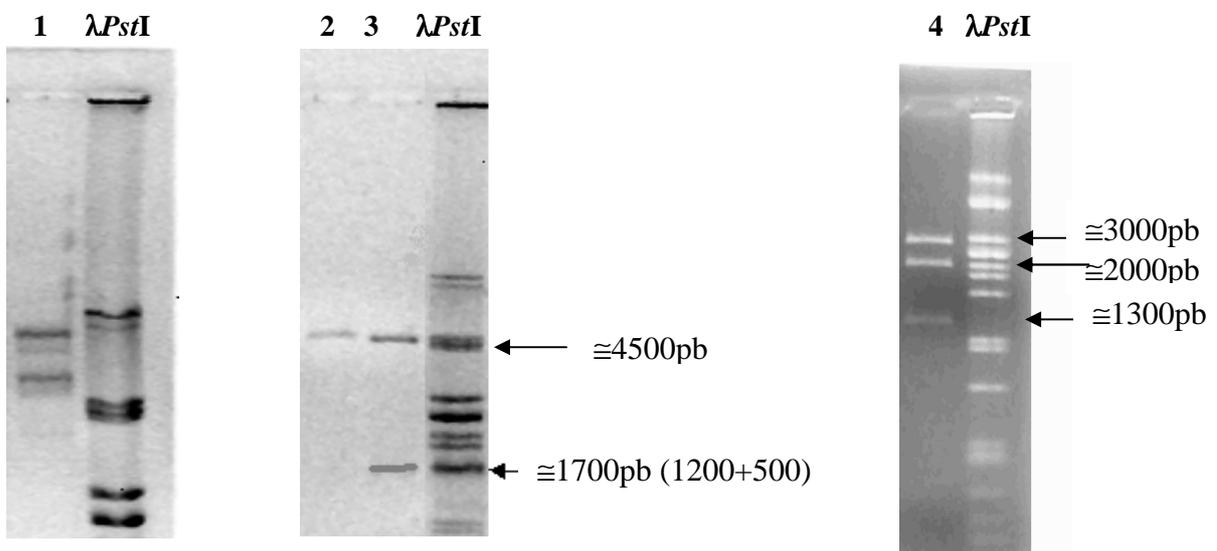


Figura 7.3. 1: Clon + pKK5. 2 y 3 respectivamente: Cortes con *EcoRI* de pKK232-8 y pKK5. 4: corte con *EcoRI* y *NdeI*

El tamaño del clon + es de $\approx 6000-6200$ pb, los cortes permiten visualizar la orientación correcta. 2: vector cortado parcialmente con *EcoRI* con un tamaño de 5094

pb y el clon pKK5 cortado con *EcoRI*. Clon en orientación, cuando cortamos con *EcoRI* en el vector y con *NdeI*, una Enzima de restricción que tiene diana específicamente en el interior del fragmento clonado (fragmento de 1300, únicamente si la orientación es +).

7.5.2.2. Establecimiento del carácter del promotor

La fortaleza del promotor se podía medir empíricamente por la capacidad de crecimiento de la cepa en medios que contenían concentraciones muy altas de Cloramfenicol, realizamos un espectro de crecimiento de los clones recombinantes, mediante la técnica de réplica en placa, para determinar la fortaleza del promotor. En todos los medios el resultado fue positivo, incluso el desarrollo de las colonias era más visible en las concentraciones más altas.

Tabla 7.3. Ensayo de crecimiento de las cepas de *E. coli* transformadas con pKK5 en medio LB-agar-Cm

Concentración de Cm (xmg/l)	Crecimiento
10	+
20	+
50	+
100	++
200	+++

Con este ensayo demostrábamos que el carácter del promotor que hay delante de las Glicosiltransferasas esenciales para la biosíntesis del polisacáridos era muy fuerte, ya que activaba la transcripción del gen *cat*. En estas condiciones se produce una gran cantidad de Cloramfenicol acetil transferasa que es capaz de metabolizar el cloramfenicol del medio y desarrollarse así la bacteria sin ningún problema, es más, se amplifica su respuesta a las señales medioambientales, puede tratarse de una forma de quorum sensing, que podría utilizarse como un sistema de expresión de genes inducibles (Ruyter buscar).

7.5.3- Determinación de los sitios de inicio del promotor P3. Primer extensión.

Esta técnica nos permitió llevar a cabo el estudio del extremo 5' de los distintos ARNm obtenidos mediante expresión diferencial de genes, de forma que podamos determinar cuál es el punto de inicio de la transcripción (posición +1 respecto a la caja TATA del promotor). Esta técnica también permite determinar cuántos puntos de inicio hay y cual de ellos es predominante.

El marcaje del oligonucleótido se realizó con radiactividad γ -³²P: Oligo Primer Extension que es complementario a la hebra que codifica el gen *epsGlu*: GCGAACTTTGACGCATACACCG), según MyM. El resultado del marcaje en el contador de centelleo fue de **122452 CPM**, valor por encima del mínimo requerido para continuar el experimento (10⁵). Se realizó con el RNA total obtenido de la cepa B.7 de *P.jamilae* en medio YM y se obtuvieron dos productos de extensión claramente definidos y otros dos de carácter muy débil (Figura 7.4.Primer extensión)

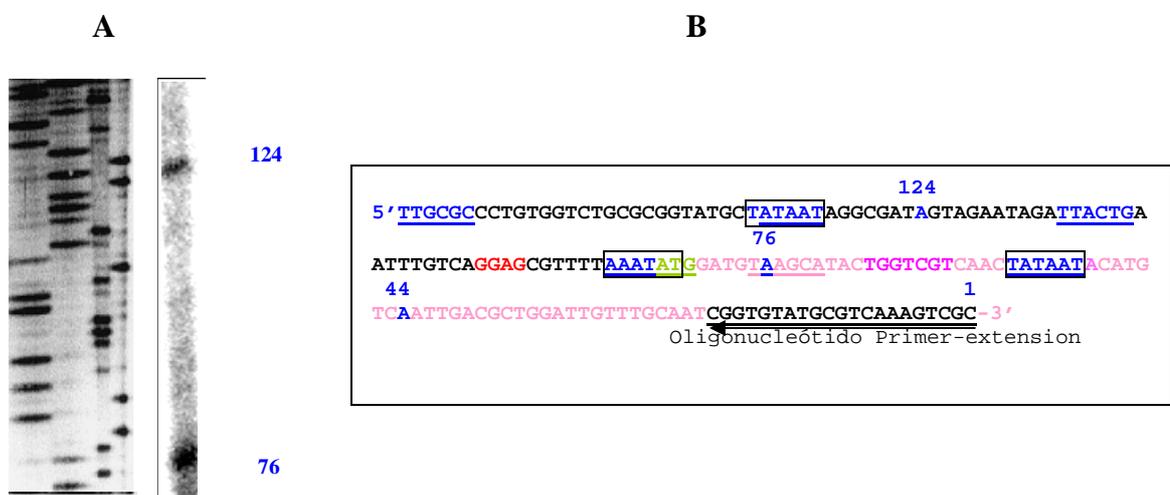


Figura 7.4. Primer extensión. A: Posiciones relativas de los productos de extensión frente al Oligonucleótido específico utilizado. B: Secuencia nucleotídica que contiene los puntos de inicio de la transcripción.

El punto de inicio mayoritario, si asumimos que es la banda de mayor intensidad y nitidez, está situado a 40 nucleótidos hacia el extremo 3' del códon de inicio ATG. Los

otros puntos de inicio están dentro de la secuencia del gen *epsGlu* a 9 nucleótidos y 42 nucleótidos respectivamente del ATG.

Con esta prueba quedaba corroborada la localización de los puntos de inicios del promotor fuerte que transcribe los genes esenciales para la biosíntesis de EPS.

7. 6. – Discusión

El análisis transcripcional realizado demuestra que el tamaño del transcrito principal de RNA mensajero de los genes específicos de biosíntesis de EPS en la cepa B.7 *P.jamilae* es de aproximadamente 12-14 Kb y mayoritario, lo que implica la existencia de un promotor predominante hacia el extremo 5' del primer gen del operón, que denominamos P1. De forma secundaria existen secuencias promotoras internas perfectamente definidas hacia el extremo 3' de las Glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis del EPS, P2, es el promotor que controla la transcripción del gen *epsMan*, P3, es el promotor que controla la transcripción conjunta de *epsGlu*, *epsGal* y *epsGDEP*. Esta misma organización transcripcional de promotores prioritarios y otros internos más débiles la tienen muchos operones de biosíntesis de EPS, por ejemplo, los de *Xanthomonas campestris* y *Xylella fastidiosa* (Katzen *et al.*, 1996)

El promotor interno P3 que precede a los genes *epsGlu* y *epsGal* del operon de biosíntesis fue caracterizado y determinada su fortaleza por fusiones transcripcionales con genes sin promotor de *cat* en vectores específicamente diseñados para ello y expresados en *E.coli* (Casadaban y Cohen 1980; Brosius 1984). La fortaleza de este promotor a pesar de ser interno al operón es muy alta, lo que va a asegurar la transcripción de genes esenciales en el proceso de biosíntesis de la unidad repetitiva que compone el biopolímero, transfiriendo dos azúcares activados, glucosa y galactosa, que siempre van a estar presentes en la cadena lineal del EPS (Datos químicos no mostrados).

La expresión de los genes *epsGlu* y *epsGal* depende del control del promotor interno que los precede, ya que son genes contiguos y entre ambos genes no existe un terminador transcripcional. La posición del único posible terminador transcripcional está adyacente al gen homólogo a GDEP (Glicerofosfodiesterasa) hacia el extremo 3',

lo cual, implica que la transcripción de GDEP también está regulada por el mismo promotor. Dando lugar a una formación continua de proteínas que podrían formar parte del mismo complejo enzimático, disposición que es necesaria para una síntesis eficiente y procesativa del oligosacárido o unidad repetitiva del EPS.

Mediante primer extensión determinamos los puntos de inicio del promotor, que pueden ser hasta cuatro, aunque sólo dos son productos de extensión mayoritarios. Todos los puntos de inicio son Adenina. Los puntos de inicio claramente definidos están situados a las distancias marcadas (-10 nucleótidos) de la primera secuencia consenso que definen los promotores en procariotas, que además está totalmente conservada, lo cual es indicativo de la fortaleza del promotor (Vos y Simons, 1994). La distancia a la segunda secuencia (-35 nucleótidos) y la propia secuencia no están totalmente definidas por la ausencia de la conservación de dicha secuencia en *P.jamilae*.

La zona que precede a este promotor secundario, la consideramos que es una zona de unión a moléculas reguladoras ya que no codifica para ninguna proteína determinada, sino que se trata de una zona de secuencias de unión a DNA, proteínas, contiene secuencias IS, con fragmentos de secuencia similares a una proteína de transposición (Tabla 4.X), lo cual implica que la inserción de la secuencia promotora ha podido ser producto de una recombinación homóloga de otra región del cromosoma.

La comunicación celular en bacterias (Parkinson y Kofoid, 1992), sus señales de transducción (Stock *et al.*, 1990) y la importancia de determinadas proteínas reguladoras en sistemas de dos componentes (Wanner 1992), son parámetros de gran interés en todos los campos de la microbiología, en continua investigación y desarrollo.

En determinadas bacterias el control de la producción de exopolisacárido está mediado por mecanismos de autoinducción (quorum-sensing) (Beck-Bodman *et al.* 1998). La producción de EPS está implicado con seguridad en fenómenos de control de densidad celular y viceversa, de ahí su capacidad de colonizar nichos ecológicos.

La regulación de la expresión de EPSs (considerando éste en su definición más amplia, cápsulas y exopolisacáridos) es muy compleja y puede envolver un gran número de factores transcripcionales, por ejemplo los componentes de los sistemas clásicos de dos componentes (Gottesman 1995) y los activadores requeridos para la síntesis de ácido colánico en *E.coli* (Gottesman y Stout, 1991).

Suponemos que el control de la biosíntesis de EPS en la cepa B.7 de *P.jamilae* es un proceso complejo en el que están implicados altos requerimientos de la biodisponibilidad de precursores y la expresión de proteínas reguladoras, que están codificados por operones y genes externos al operón propio de biosíntesis de EPS, como ocurre, por ejemplo, para la regulación de un factor de patogenicidad de *Xanthomonas campestris* (Dow et al. 2000).

Los genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo basal de carbohidratos son comunes casi a todas las formas de vida, así también están implicados en el proceso de biosíntesis de EPS de *P.jamilae*. Hemos determinado la presencia de un gen similar a una ribokinasa en el genoma de *P.jamilae* cercano al operón de biosíntesis de EPS, que podría estar implicado en la regulación de la biosíntesis de exopolisacárido. En microorganismos, estos genes están regulados por procesos dirigidos a requerimientos específicos relacionados al habitat o cambios medioambientales y suelen estar organizados en agrupamientos genéticos. Respecto a la producción de EPS de *P.jamilae* en residuos tóxicos del aceite de oliva se puede justificar por la riqueza de estos residuos en carbohidratos, que también permite la producción de xantano (López 2001), aunque este se ve influenciado positivamente por las concentraciones de nitrógeno del residuo, contradiciendo lo estipulado de forma general.

La implicación directa en la transcripción de los genes PcrB y PcrA (Helicasa dependiente de ATP) no se puede demostrar, ya que los datos del Northern no son satisfactorios con la sonda N3, sólo podemos apoyar la hipótesis por la localización homóloga de estos genes en *Bacillus subtilis* (Bibliografía), cuya localización es exclusiva en el genoma, concretamente el interior de un operón de biosíntesis con genes

esenciales para dicha bacteria. La expresión de estas proteínas puede estar implicada en el control del enrollamiento o superenrollamiento de la doble hebra de DNA, de forma óptima para la acción del complejo proteico implicado en la transcripción.

El paso siguiente, una vez conocida la genética, demostrado el análisis funcional de las proteínas de los genes específicos y realizado el análisis transcripcional más relevante, es el estudio de la regulación y control general de la biosíntesis de EPS, teniendo en cuenta todos los operones, las enzimas, secuencias de DNA posibles implicadas en este complejo proceso.

7.7. – Conclusiones

1. Existe un transcrito de RNAm mayoritario y estable de un tamaño aproximado de 12-14 Kb, por lo que la expresión de los genes de biosíntesis de EPS en *P.jamilae* es correlativa.
2. El promotor interno P3 que precede al gen *epsGlu* es un promotor fuerte con varios puntos de inicio, dos de ellos bien definidos, uno anterior al codon de iniciación de la proteína y otro posterior.
3. El promotor interno P3 controla la expresión conjunta de los genes *epsGlu*, *epsGal* y *GDEP*, ya que son genes contiguos.
4. La regulación de este promotor se realiza mediante interacción de proteínas no determinadas hacia el extremo 3' del mismo.
5. La presencia de un posible terminador transcripcional determinaría el fin del operón, pero la proximidad física y la no existencia de un nuevo promotor delante de las proteínas homólogas con *PcrB* y *PcrA* (helicasa), nos hace hipotetizar la necesidad de éstas como proteínas reguladoras de la expresión compleja del operón de biosíntesis de EPS.

PARTE IV: DISCUSIÓN FINAL

Capítulo 8. Discusión final

La globalidad de los resultados obtenidos en la primera parte de nuestro estudio nos ha llevado a la descripción taxonómica de una nueva especie, *Paenibacillus jamilae*. Las cepas bacterianas que forman parte de dicha especie son viables para su utilización en procesos de biorremediación de alpechín y alpeorajo, produciendo exopolisacáridos solubles e insolubles en agua, que son recursos con utilidad industrial y biológica.

El estudio genético de la biosíntesis de exopolisacárido en *Paenibacillus jamilae*, pone de manifiesto la localización cromosómica de un conjunto de genes agrupados y transcritos de forma policistronica. Los genes y pseudogenes constituyentes del operón de biosíntesis están dispuestos de forma contigua con separaciones nucleotídicas mínimas. Hay diversos promotores fuertes internos que anteceden los genes que codifican enzimas glicosiltransferasas y epimerasas implicadas directamente en la constitución de azúcares del oligosacárido, estructura fundamental del biopolímero. Sólo existe un terminador transcripcional hacia el extremo 3' de genes que intervienen en la liberación y transporte de la unidad fundamental del exopolisacárido. Hemos localizado una zona de unión a proteínas y ácidos nucleicos inmediatamente anterior a uno de los promotores internos, que presumiblemente actúa como región reguladora de la expresión.

La localización y determinación de la estructura coherente de todos los elementos genéticos: genes, promotores, terminadores transcripcionales, secuencias de unión al ribosoma y regiones reguladoras en el cromosoma de *Paenibacillus jamilae*, permitirán la manipulación genética de dichas cepas para optimizar en última instancia el proceso de biorremediación de los residuos de la obtención del aceite de oliva. También se pueden expresar y controlar dichos genes de forma heteróloga en bacterias de interés comercial.

En definitiva, se han determinado las bases genéticas en la nueva especie *Paenibacillus jamilae*, necesarias para mejorar la cepa bacteriana mediante ingeniería de polisacáridos.

PARTE V: CONCLUSIONES

Capítulo 9. Conclusiones

1. Proponemos la descripción de una nueva especie bacteriana dentro del género *Paenibacillus*, *Paenibacillus jamilae*, con un total de 10 cepas que tienen capacidad de crecer en residuos de la obtención del aceite de oliva y producir exopolisacáridos solubles e insolubles en agua, con potencial industrial y biológico.
2. La cepa B.7 de *Paenibacillus jamilae*, elegida por las características funcionales de su exopolisacárido, soluble en agua, para realizar un estudio genético del mismo, contiene los genes responsables de la biosíntesis del biopolímero en un operón con localización cromosómica.
3. Se definen tres regiones principales dentro del operón de biosíntesis del exopolisacárido a las que asignamos funciones probables mediante un análisis bioinformático. Hemos localizado e identificado la región genómica que codifica un transportador de membrana, para las enzimas hexosiltransferasas y la enzima glicerofosforildifosfodiesterasa, que tienen carácter esencial en el proceso de síntesis del polímero en *Paenibacillus jamilae*.
4. Definimos las actividades enzimáticas de cada una de las proteínas hexosiltransferasas codificadas por los genes de la región central del operón: EpsM es una manosiltransferasa, EpsU es una glucosiltransferasa y EpsL es una galactosiltransferasa, actividades que concuerdan con la composición cualitativa en azúcares del biopolímero.
5. Definimos la existencia de una unidad transcripcional completa constituida por un Promotor *Pesp*, que controla la transcripción de los genes *epsU*, *EpsL* y *epsG*, que codifican para las actividades glucosiltransferasa, galactosiltransferasa y glicerofosforildifosfodiesterasa, respectivamente y una repetición invertida que actuaría como terminador transcripcional probable hacia el extremo 3' del operón.

PARTE VI: BIBLIOGRAFÍA

Capítulo 10. Bibliografía

Alami Y, Achouak W, Marol C, Heulin T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol.* Aug;66(8):3393-8.

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**,3389-3402.

Anderson A. J. y Dawes E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews*, **54**, 450-472.

Ash C., Farrow J.A.E., Ealbanks S., Collins M.D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analyses of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology.* **13**, 202-206.

Ash C., Priest F. G., Collins M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**, 253-260.

Balis C., Chatzipavlidis J. y Flouri F. (1996). Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 169-178.

Bambalov, G. S., Tanchev, S. & Israelidis, C. J. (1989). Alcohol fermentation in olive oil extraction effluent. *Biol. Wastes*, **27**, 71-75.

Baptist, J. N., Mandel, M., Gherna, R. L. (1978). Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **28**, 229-244.

Battelle y Columbus. (1990). Estado actual de la problemática del alpechín en los países mediterráneos. Evaluación del impacto medioambiental. *Reunión Internacional "Tratamiento de alpechines"*. Córdoba.

Bernhard F, Coplin DL, Geider K. 1993. A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to cps genes in *Erwinia stewartii*. *Mol Gen Genet.* **239**(1-2):158-68.

Borja, R., Martín, A. y Fiestas, J. A. (1990). Estudio cinético de la depuración anaerobia del alpechín en presencia de diversos soportes para inmovilización de los microorganismos responsables del proceso. *Grasas y Aceites* **41**, 347-356.

Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7 th edn, 1094pp. The Willians and Wilkins Co., Baltimore.

Brouillard R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. En *Anthocyanins as foods colours*. Edited by Markakis P. Academic Press, New York.

Buciumeanu, E., Grecu, C. & Bejan, C. (1994). La teneur en polyphénols chez les vignestteintes de maladies virales. *Polyphénols Actualités*, **11**, 69.

Capitulo 10. Bibliografía.

Cegarra J., Paredes C., Roig A., Bernal M. P. y García D. (1996). Use of olive-mill waste water compost for crop production. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 193-203.

Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Rewies.* **87**, 113-130.

Cerning, J. (1994). Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques, p. 309-329. In H. de Rossartand and F.M. Luquet (ed) . Bacteries lactiques, vol. I. Lorica, Uriage, France.

Claridge, M. F., Dawah, H. A., Wilson, M. R. (1997). Species; the units of biodiversity, Chapman & Hall, Londres.

Clark F. E. (1937). The relationship of *Bacillus siamensis* and similar pathogenic spore-forming bacteria of to *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **33**, 435-443.

Claus D., Berkeley R.C.W. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. The Willians and Wilkins Co., Baltimore.

Clayton R.A., Sutton G., Hinkle P.S., Bult C., Fields C. (1995). Intraespecific variation in small-subunit ribosomal RNA sequences in genebanl-chy single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**, 595-599.

Cohn, F. (1872). Untersuchungen über Bakterien, *Beitr. Biol. Pflanz.* **1**, 127-224.

Cohn F. (1876). Untersuchugen über Bacterien. Beiträge zur Biologie der Bacillien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 2. Heft II. 249-276. In *Milestones in Microbiology* (Brock, T.D. ed), pp 49-56. Prentice hall Inc. , Englewood Cliffs, N.J. 1961.

Colwell R.R. (1970). Polyphasic taxonomy of genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*. **104**, 410-433.

Curi K., Veliogen S. G. y Diyamandogen V. (1980). Treatment of olive oil production wastes. En Treatment and disposal of liquid and solid industrial wastes. Edited by K. Curi. *Pergamon Press, New York*, pp. 189-205.

Dalis, D. (1989). Anaerobic biological treatment of liquid wastes for the production of biogas. In *Treatment of Wastes from Olive Oil Factories*, Conference of the Geotechnical Chamber of Greece. Procc., Heraklion, Crete, pp. 42-52.

Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. 1988 High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145

Duguid J. P. (1951). The demonstration of bacterial capsules and slime. *Journal of Pathology and Bacteriology* **63**, 257-267.

Escolano Bueno A. (1975). Ensayos de eliminación de alpechines por vertido en balsas o lagunas para su infiltración y evaporación. *Grasas y Aceites*, **26**,387-390.

Fahmy, F., Flossdorf, J., Claus, D., (1985). The DNA base composition of the type strains of the genus *Bacillus*. *System. Appl. Microbiol.* **6**, 60-65.

Felsenstein, J. (1989). Phylip - Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.

Fernández-Bolaños J., Fernández M. J., Rivas M., Gil A. y Pérez T. (1983). Azúcares y polioles en aceitunas verdes. III. Determinación cuantitativa por cromatografía gas-líquido. *Grasas y Aceites* **4**, 63-67.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. (1953). Estudio del alpechín para su aprovechamiento industrial. I. Concentración de los azúcares y demás sustancias que lleva en emulsión y disolución por tratamiento con óxido de calcio. *Grasas y Aceites*, **4**, 63-67.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. (1958). Características y eliminación de aguas residuales de las almazaras. *Boletín de Oleicultura Internacional* **46**, 11.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. (1959). Estudio del alpechín para su aprovechamiento industrial. Separación de alguno de sus componentes e identificación de los ácidos orgánicos por cromatografía de partición. *Grasas y Aceites*, **28**, 113-121.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. (1966). Estudio del alpechín para su aprovechamiento industrial. VIII Instalación comercial para la obtención de levaduras de pienso. *Grasas y Aceites*, **17**, 41

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. (1977). Depuración de aguas residuales en las industrias de aceitunas y aceites de oliva. *Grasas y Aceites*, **28**, 113-121.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. y Borja Padilla R. (1990). Tratamientos de alpechines mediante procesos biológicos. *Reunión Internacional "Tratamiento de alpechines"*. Córdoba.

Fiorelli F., Passetti L. Y Galli E. (1996). Fertility-promoting metabolites produced by *Azotobacter vinelandii* grown on olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **34**, 165-167.

Fitch, W. M., Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees: a method based on mutational distances as estimated from cytochrome c sequences of general applicability. *Science* **155**, 279-284.

Forsyth G., Logan N.A, De Vos P., (1998). Revue Taxonomique du Genre *Bacillus*. Bull. Soc. Fr. Microbiol., 13, (2).

Fox G.E., Stackebrandt, E., Hespell R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W.E.(1981). The phylogeny of prokaryotes. *Science*. **209**, 547-463.

Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk P. (1992). How close is close-16S ribosomal RNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**, 166-170.

Fox, G. E., Peckman, K. J., y Woese, C. R. (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**, 44-57.

Franziona G., Telch C. y Vigilia A. (1986). Cryogenesis applied for vegetation water: treatment and nutritional value of the final product. *International Symposium on Olive oil Products valorization*. FAO eds. **pp.** 285-298.

García Ribera R., (1999). Estudio de producción de polihidroxicanoatos por bacterias capaces de desarrollarse en alpechín transformadas con el plásmido pSK2665 de *Alcaligenes eutrophus*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

García-Barrionuevo A., Moreno E., Quevedo Sarmiento J., González López J. and Ramos Cormenzana A. (1992). Effect of waste waters from olive oil mills on *Azotobacter chroococcum* nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 281-283.

Georgakakis, D. (1989). Application of anaerobic digestion of katsigaros and possible disposal of liquid wastes. Conference of the Geotechnical Chamber of Greece. Procc., Heraklion, Crete, **pp.** 53-74.

Gibson T., Gordon R.E. (1974). *Bacillus* Cohn 1872 In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. **8th edn.** (Buchanan R.E., Gibbons N.E., eds), **pp**529-550. The Willians and Wilkins Co., Baltimore.

González M. D. (1985). Estudio preliminar de los componentes de las aguas residuales de las almazaras con efecto inhibitor del crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Resumen del X Congreso Nacional de Microbiología*. Valencia. España.

González, M. D., Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J. & Ramos-Cormenzana, A. (1990). Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, **20**, 423-432

González-López J., Pozo C., Martínez-Toledo M. V., Rodelas B. y Salmeron V. (1996). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in

wastewater from olive oil mills (alpechín). *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 271-276.

Gordon R. E. (1940). Dissociation and bacteriophage in the classification of the aerobic spore-formers. *Journal of Bacteriology* **39**, 757.

Guerra V., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A. (1998) Isolation and partial characterization of an Extracellular Polysaccharide produced by a strain of *Bacillus* grown on olive mill waste waters. *International Symposium to link basic Science, biotechnology and Industry. Münster (Germany)*. P44.

Guerra V.(1999) . Producción y caracterización de un nuevo exopolisacárido obtenido a partir de alpechín. Tesis Doctoral.

Gray JX, Djordjevic MA, Rolfe BG. 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. *J Bacteriol.* **172**(1):193-203.

Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G., Logan N.A. (1998). *Virgibacillus* a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Night 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **48**, 808-817.

Heyndrickx M., Vandemeulebroeke K., Scheldeman P., Hoste B., Kersters K., De Vos P., Logan N.A., Aziz A.M., Ali N., Berkeley R.C.W. (1995). *Paenibacillus*(formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty et al. 1986) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus*(formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994: emended description of *P.validus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**, 661-669.

Hunger, W., and Claus, D. (1981). Taxonomic studies on *Bacillus megaterium* and on agarolytic *Bacillus* strains. The Endospore-Forming Bacteria: Clasification and Identification (R. C. W. Berkeley and M. Goodfellow, eds.), Academic Press, London, pp 217-239.

Ioniotakis, N., Israelidis, C., Katsaboxakis, K., Michailides, P., Oikonomou, D. y Papanicolaou, D. (1990). Ecological and economical utilization of wastewater olive production with physicochemical and biotechnological methods. *Symposium on Treatment and Use of Sewage Sludge and Liquid Agricultural Wastes, Athens.*

Israilides C. J., Scalon B., Smith A., Harding S. E. y Jumel K. (1994). Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. *Carbohydrates Polymers.* **25**, 203-209.

Janshekar H. y Fiechter A. (1982). On the bacterial degradation of lignin. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **14**, 47-50.

Jimenez-Zurdo JI, Frugier F, Crespi MD, Kondorosi A. 2000. Expression profiles of 22 novel molecular markers for organogenetic pathways acting in alfalfa nodule development. *Mol Plant Microbe Interact.* Jan;13(1):96-106.

Johnson, J. L., (1973), Use of nucleic acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal Systematic Bacteriology* **23**, 308-315.

Johnson, J. L., (1985 a), Determination of DNA base composition. *Methods in Microbiology*, Vol. 18 (G. Gottschalk, ed.), Academic Press, London. pp. 1-31.

Johnson, J. L., (1985 b), DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acids. *Methods in Microbiology*, Vol. 18 (G. Gottschalk, ed.), Academic Press, London. pp. 33 - 74.

Jukes, T. H., y Cantor, R. R. (1969). Evolution of protein molecules. En: *Mammalian protein metabolism*, Munro, H. N., (ed.), Academic Press, New York. 21-132.

Kadam, K. L. y Drew S. W. 1986. Study of lignin biotransformation by *Aspergillus fumigatus* and white rot fungi using ¹⁴C-labelled and unlabelled kraft lignins. *Biotechnology and Bioengineering*. **28**, 394-404.

Kageyama, A. & Benno, Y. (2000). *Coprobacillus catenaformis* gen. nov., sp. nov., a new genus and species isolated from human faeces. *Microbiol Immunol* **44**, 23-28.

Kaneda T.(1967). Iso- and anteiso- fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *Journal of Bacteriology*. **93**, 894-903.

Kang K. S. y Cottrell I. W. (1979). Polysaccharides. En *Microbial technology*. Peppler H. J. y Perlman D. 2nd ed. Vol. 1. Chapter **13**. Academic Press. London.

Kerstens, K., DeLey, J. (1980). Classification and identification of bacteria by electrophoresis of their proteins. *Microbiological Classification and Identification*. (M. Goodfellow and R.G. Board, eds.), Academic Press, London, **pp.** 273-297.

Konishi E, Fujii A. 2002. Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine*. Jan 15;20(7-8):1058-67.

Kunst,F., Ogasawara,N., Moszer,I., Albertini,A.M., Alloni,G., Azevedo,V., Bertero,M.G., Bessieres,P., Bolotin,A., Borchert,S., Borriss,R., Boursier,L., Brans,A., Braun,M., Brignell, S.C., Bron,S., Brouillet,S., Bruschi,C.V., Caldwell,B., Capuano,V., Carter,N.M., Choi,S.K., Codani,J.J., Connerton,I.F., Cummings,N.J., Daniel,R.A., Denizot,F., Devine,K.M., Dusterhoft, A., Ehrlich,S.D., Emmerson,P.T., Entian,K.D., Errington,J., Fabret,C., Ferrari,E., Foulger,D., Fritz,C., Fujita,M., Fujita,Y., Fuma,S., Galizzi,A., Galleron,N., Ghim,S.Y., Glaser,P., Goffeau,A., Golightly,E.J., Grandi,G.,

Guisseppi,G., Guy,B.J., Haga,K., Haiech,J., Harwood,C.R., Henaut,A., Hilbert,H., Holsappel,S., Hosono,S., Hullo,M.F., Itaya,M., Jones,L., Joris,B., Karamata,D., Kasahara,Y., Klaerr-Blanchard,M., Klein,C., Kobayashi,Y., Koetter,P., Koningstein,G., Krogh,S., Kumano,M., Kurita,K., Lapidus,A., Lardinois,S., Lauber,J., Lazarevic,V., Lee,S.M., Levine,A., Liu,H., Masuda,S., Mauel,C., Medigue,C., Medina,N., Mellado,R.P., Mizuno,M., Moestl,D., Nakai,S., Noback,M., Noone,D., O'Reilly,M., Ogawa,K., Ogiwara,A., Oudega,B., Park,S.H., Parro,V., Pohl,T.M., Portetelle,D., Porwollik,S., Prescott,A.M., Presecan,E., Pujic,P., Purnelle,B., Rapoport,G., Rey,M., Reynolds,S., Rieger,M., Rivolta,C., Rocha,E., Roche,B., Rose,M., Sadaie,Y., Sato,T., Scanlan,E., Schleich,S., Schroeter,R., Scoffone,F., Sekiguchi,J., Sekowska,A., Seror,S.J., Serror,P., Shin,B.S., Soldo,B., Sorokin,A., Tacconi,E., Takagi,T., Takahashi,H., Takemaru,K., Takeuchi,M., Tamakoshi,A., Tanaka,T., Terpstra,P., Tognoni,A., Tosato,V., Uchiyama,S., Vandebol,M., Vannier,F., Vassarotti,A., Viari,A., Wambutt,R., Wedler,E., Wedler,H., Weitzenegger,T., Winters,P., Wipat,A., Yamamoto,H., Yamane,K., Yasumoto,K., Yata,K., Yoshida,K., Yoshikawa,H.F., Zumstein,E., Yoshikawa,H. and Danchin,A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.

Lane, D. J. (1991). 16S, 23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: John Wiley.

Larkin J.M., Stokes J.L. (1967). Taxonomy of psychrophilic strains of *Bacillus*. *Journal of Bacteriology*. **46**, 76-80.

Lattanzio, V., Cardinali, A., Di Venere, D., Linsalata, V., Biondi, G., Bertolini, P., Pratella, G.C. & Salerno, M. (1994). Phenolics and postharvest diseases of fruits and vegetables. *Polyphénols Actualités*, **11**, 69.

Lee, J.C. 1993. Electrotransformation of *Staphylococci*. In: *Electroporation Protocols for Microorganisms* (Nickoloff, J.A., ed). pp. 209-216. Humana Press Inc., Totowa, NJ

Logan N.A., Berkeley R.C.W. (1981). Clasificación and identification of members of the genus *Bacillus*. The aerobic endospore-forming bacteria (Berkeley R.C.W., Goodfellow M. eds.), pp 105-140. Academic press, London.

López Aparicio F., García-Granados A. y Rodríguez M. (1977). Estudio del contenido en ácidos carboxílicos del alpechín y evolución de los mismos. *Grasas y Aceites* **28**, 393-401.

López López M. J. (1996). Producción de biopolímeros a partir del alpechín: Obtención de Xantano. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España.

López M. J. y Ramos-Cormenzana A. (1996). Xanthan Production from Olive-Mill Wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 237-243.

Low D, Ahlgren JA, Horne D, McMahon DJ, Oberg CJ, Broadbent JR. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl Environ Microbiol.* Jun;64(6):2147-51.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaimer, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.-H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis.* **19**, 554-568.

Markakis P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. En *Anthocyanins as foods colours*. Edited by Markakis P. Academic Press, New York.

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of DNA from microorganism. *J. Mol. Biol.* 208-218.

Marmur, J., y Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* **5**, 109-118.

Martín A., Borja, R., García, J. & Fiestas, J. A. (1991). Kinetics of methane production from olive mill waste water. *Process Biochem.* **26**, 101-107.

Martínez Nieto L., Garrido Hoyos S. E., García Pareja M. P. y Ramos Cormenzana A. (1991). Degradación biológica de aguas residuales de almazaras. V *Encuentro Galego-Portugués de Química*. Medio Ambiente. La Coruña.

Martínez Nieto L., Garrido Hoyos S. E., Peregrina Canalejo J., García Pareja M. P. y Ramos Cormenzana A. (1994). Depuración biológica de alpechines con distintas configuraciones de bioreactores. *Actas III Congreso Internacional de Química de la ANQUE "Residuos sólidos y líquidos: su mejor destino" II*: 301-313.

Martínez Nieto L., Ramos Cormenzana A., García Pareja M. P., y Garrido Hoyos S. E. (1992). Biodegradación de los compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*. *Grasas y Aceites* **43**, 75-81.

Montefusco, A., Nakamura, L. K. & Labeda, D. P. (1993). *Bacillus peoriae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 388-390.

Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A. & Russell, N. J.(1993). The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. *J Gen Microbiol* **139**, 1877-1884.

Morisot A. y Tournier J. P. (1986). Répercussions agronomiques des effluents et déchets de moulins a huill de olive. *Agronomie*, **6**, 235-241.

Nakamura, L. K. (1996). *Paenibacillus apiarius* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 688-693.

Nakamura, L. K., (1984) . *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. *International Journal Systematic Bacteriology* **34**, 224-226.

Nakamura, L. K., Blumenstock I., Claus, D. (1988). Taxonomic study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a proposal for *Bacillus smithii* sp. nov. *International Journal Systematic Bacteriology* **38**, 63-73.

Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, M. Kambe, and F. Tsuchiya. (1983). Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agriculture Biologycal Chemistry* **47**,1623-1625.

Owen, R. J., and Pitcher, D., (1985), Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization . *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (M. Goodfellow and D. E. Minnikin, eds.), Academic Press, London, **pp.** 67-93.

Page, R. D. M. (1996). treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci***12**, 357-358.

Pérez J. D., Gallardo F. y Esteban E. (1980). Aspectos a considerar en el empleo del alpechín como fertilizante. I. Evaluación de su efecto fitotóxico inhibitor de la germinación de semilla. Cuaderno de Ciencias Biológicas. **6-7**: 59-67.

Pérez Torres J. (1988). Transformación microbiana de compuestos aromáticos del alpechín. *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España.

Petrovics G, Putnoky P, Reuhs B, Kim J, Thorp TA, Noel KD, Carlson RW, Kondorosi A. 1993. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol Microbiol.* **8**(6):1083-94.

Pichinoty, F., Waterbury, J. B., Mandel, M., and Asselineu, J., (1986). *Bacillus gordonae* sp. nov., Une nouvelle espèce appartenant au second groupe morphologique, Dégradant Divers Acides Aromatiques et Phénols, *Ann. Microbiol.* **137** A:65-178

Pometto A. L., Crawford D. L. (1985). Simplified procedure for recovery of lignin acidolysis products for determining the lignin degrading abilities of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 879.

Priest, F. G., Goodfellow M., Todd C. (1988). A numerical classification of genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, **134**, 1847-1882.

Priest, F.G., (1981). DNA homology in the genus *Bacillus* . In “The aerobic endospore-forming bacteria” (Berkeley R.C.W., Goodfellow M. eds), **pp33-57**. Academic Press, London.

Quesada E., Bejar V., Calvo C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* **49**, 1037-1041.

Quevedo-Sarmiento J., López M. J. y García-Barrionuevo A. (1991). Producción de pululano por *aureobasidium pullulans* usando como sustrato el alpechín. *Resumen del XIII Congreso Nacional de Microbiología*. Salamanca. España.

Ramos Cormenzana A., Monteoliva Sánchez M. Y López, M. J. (1995). Bioremediation of alpechín. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **35**, 249-268.

Ramos-Cormenzana , A. (1989). Halobacterias y recuperación de residuos. En: *Nuevas fuentes de alimentos de animales para la producción animal III*. Eds. A. Gomez-Cabrera, E. Molina Alcaide y A. Garrido Baro. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca. **pp.** 469-484.

Ramos-Cormenzana A. (1986). Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. *International Symposium on Olive By-Products Valorization, Sevilla, España*. Ed. FAO 9-40.

Ramos-Cormenzana A. Taxonomía Bacteriana. Ed. 1979

Ramos-Cormenzana A., Juárez-Jimenez y García-Pareja M. P. (1996). Antimicrobial activity of olive oil mill wastewaters (alpechín) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 283-290.

Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sánchez, M. (2000). Biopharmaceutical potential of olive industrial wastes. *ARS Pharm***41**, 129-136 (in Spanish).

Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva Sánchez, M. & López, M. J. (1995). Bioremediation of alpechín. *Int Biodeterior Biodegrad***35**, 249-268.

Ramos-Cormenzana, A., Guerra del Aguila, V., Monteoliva Sánchez, M. (1997). Production of microbial polysaccharides in wastewater olive oil mills. *International Symposium on Environmental Biotechnology (eds. H. Verachter and Verstraete)*, **2**, 259-262.

Reimers Suárez G. (1983). Posibilidades de tratamiento del alpechín por ultrafiltración y ósmosis inversa. *Alimentaria*. 273-274.

Reuhs BL, Williams MN, Kim JS, Carlson RW, Cote F. 1995. Suppression of the Fix- phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J Bacteriol.* **177**(15):4289-96.

Rodríguez M, M., Pérez J., Ramos-Cormenzana A. y Martínez J. (1988). Effect of extracts obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology*, **64**:219-226.

Rozzi, A. et Di Pintoo, A.C. (1986). Anaerobic treatment of olive mill effluents as energy source. *International Symposium Olive By Products Valorization*, ed FAO, Madrid, pp. 181-93.

Ruíz-Bravo A. 2001. Biological Response Modifer Activity of an Exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.*, p. 706-710.

Russell N. (1994). Bioremediation of olive oil-mill wastes for use as fertilizer. 2nd European Recycling Workshop. Report of Project N° EVWA-CT920006.

Russel M. 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol.* Jun 12;279(3):485-99. Review.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51** 1691.

Saiz Jiménez C., Gómez Alarcón G. y Leeuw J. W. (1986). Chemical properties of the polymer isolated in fresh vegetation water and sludge evaporation ponds. *International Symposium On Olive By- products Valorization, Sevilla.* FAO ed. pp. 41-60.

Sambrook, J., Fritsch, E. K. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sánchez Villasclaras S., Martínez Sancho M. E., Espejo Caballero M^a. T. y Delgado Pérez A. (1996). Production of microalgae from olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 245-247.

Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.

Schleifer K. H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407-477.

Schleifer K. H., Stackebrandt E. (1983). Molecular systematics of prokariotes. *Annual Reviews in Microbiology.* **37**, 143-187.

Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Komagata K. (1996). Proposal for two new genera. *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **46**, 939-946.

Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Komagata K. (1997a). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **47**, 289-298.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki K., Nakamura, L. K., Komagata, K.(1997b). Emended description of *Paenibacillus amylophilus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **47**, 299-306.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. & Komagata, K. (1996). Proposal for two new genera. *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 939-946.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997b). Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 299-306.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997a). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlandolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 289-298.

Shute, L. A., Gutteridge, C. S., Norris, J. R., Berkeley, R. C. W. (1988). Reproducibility of pyrolysis mass thermophilic species of *Bacillus* species. *Journal Applied of Bacteriology*. **64**, 79-88.

Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P.H.A. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **30**, 225-420.

Slepecky, R. A. & Hemphill, H. E. (1991). The genus *Bacillus* - nonmedical. In *The Prokaryotes*, pp. 1663-1696. Edited by A. Balows, H. G. Tru\$ per, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer.

Smith, N. R., Clark, F. E. (1937). Aproposed grouping of the mesophilic, aerobic, spore-forming bacilli. Soil science society of America. *Proceedings* **2**, 255.

Smith, N. R., Gordon, R. E. and Clark, F. E. (1952). Aerobic Sporeforming Bacteria, U. S. Dept. Agr. Monogr. N° **16**, Wansington, D. C.

Smith, N. R., Gordon, R. E., Clark, F. E. (1946). Aerobic mesophilic spore- forming bacteria. Miscellaneous publication 559, 112pp. United States Department of Agriculture, Washington, D. C.

Sneath P. H. A. Mair N. S., Sharpe M. E. & Holt J. G. (1986). *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. Vol 2. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Sneath P. H. A. Mair N. S., Sharpe M. E. & Holt J. G. (1986a). *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. Vol 2 pp 1122 -1123. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E. & Holt J. G. (1986b). *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*. Vol 2 pp-1121 y 1124. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

Sokal, R. R. y Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* **38**, 1409-1438.

Spizizen, J., (1958). Transformation of biochemically deficient strain of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl, Acad. Sci. U.S.A.* **44**, 1072-1078.

Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M. C., Ventosa, A. & Schleifer, K.-H. (1996). *Halobacillus* gen. nov., with description of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus truperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophilia* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 492-496.

Stackebrandt E., Goebel B.M. (1994). A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 846-849.

Stackebrandt E., Ludwig W., Weizenegger M., Dorn S., McGill T.J., Fox G.E. Woese C.R., Schubert W., Schleifer K-H. (1987). Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. *Journal of General Microbiology*. **133**, 2523-2529.

Stackebrandt, E. & Liesack, W. (1993). Nucleic acids and classification. In *Handbook of New Bacterial Systematics*, pp.152-189. Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. London: Academic Press.

Stingele F., Neeser J-R., Mollet B.(1996). Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, **178**,6 p 1680-1690.

Stingele F, Newell JW, Neeser JR. (1999). Unraveling the function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol.* Oct;181(20):6354-60.

Stingele F, Vincent SJ, Faber EJ, Newell JW, Kamerling JP, Neeser JR. (1999). Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Mol Microbiol.* Jun;32(6):1287-95.

Strack D. (1990). Metabolism of hydroxycinnamic acid conjugates. *XV International Conference. Groupe Polyphenols. Strasbourg.*

Suresh K. Ghai, Makoto Hisamatsu, Akinori Amemura and Kuya Harada. (1981). *Journal of General Microbiology* **122**, 33-40.

Sutherland I. W. (1985). Biosynthesis and composition of gram negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology.* **39**, 243-270.

Sutherland I. W. (1990). *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides.* Cambridge University Press. London. UK.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Tomati U., Galli E., Fiorelli F. y Pasetti L. (1996). Fertilizers from composting of olive mill waste waters. *International Biodeterioration and Biodegradation.* **38**, 155-162.

Trojanowski A., Hutterman L. y Marcherczyk A. (1989). Conversion of industrial lignin by fungal cultures in pellet form. *Biomass Congress. Lisboa.*

Vaccarino C., Lo Curto R., Tripodo M. M., Lagana G., Patane R. y Munad F. (1986). Vegetation water treatment by anaerobic fermentation with fungi. *International Symposium on Olive Oil By-Products Valorization.* FAO Ed. **pp.** 147-154.

Valenzuela Ruíz G. (1986). Thermal concentration of vegetation water. *International Symposium On Olive Oil By-Products Valorization.* FAO eds. **pp.** 173-177.

Van De Peet Y., De Wachter R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computing an Application to Biosciences.* **10**, 569-570.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Kersters K., Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews.* **60**, 407-438.

Vázquez Roncero A., Maestro Durán R. y Graciani E. (1974). Componentes fenólicos de la aceituna. II Polifenoles del alpechín. *Grasas y Aceites,* **25**, 341-345.

Wachner, R. S., Mendez, B. A. & Giolietti, A. M. (1988). Olive black water as raw material for butanol production. *Biol. Wastes,* **23**, 215-220.

Wainø, M., Tindall, B. J., Schumann, P. & Ingvorsen, K. (1999). *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 821-831.

Walker P.D., Wolf J. (1971). Taxonomy of *Bacillus stearothermophilus*. In Spore research 1971. (Backer, A.N., G.W. Gould and J. Wolf, eds.), **pp** 247-262. Academic press, London and New York.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. y Trüper, H. G. (1987). Report of Ad Hoc Committee on Reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464.

Whitefield, C., and M. A. Valvano. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**:135-246.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6578-6583.

Winslow C., Broadhurs J., Buchanan R.E, Krumwiede C., Rogers L.A., Smith G.H.B. (1920). The families and genera of the bacteria. Final report of the committee of society of American bacteriologist on characterisation and clasification of bacterial types. *Journal of Bacteriology.* **5**, 191-229.

Wisotzkey J. D., Jurtshuk Jr. P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16 S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 263-269.

Wittmann-Liebold, B., Köple, A. K. E., Arndt, E., Krömer, W., Hatakeyama, T., y Wittmann, H. G. (1990). In *The Ribosome: structure, function and evolution*. Hill, W.E., Dahlberg, A., Garrett, R.A., Moore, P.B., Schlessinger, D., y Warner, J. R., (eds.). 598-616. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.

Woese, C. R., y Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kindoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 5088-5090.

Woese, C. R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*. **209**, 457-463.

Woese C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. **51**, 221-271.

Woese, C. R., Kandler, O., y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 4576-4579.

Wolf, J., Chowdhury M.S.U. (1971). The *Bacillus circulans* complex: biochemical and immunological studies. In *Spore research 1971*, (Baker A.N., Gould G.W., Wolf J., eds), pp.227-245. Academic Press, London.

Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonem, L., Lewis, B. J., Sthal, D. A., Leuhrsen, K. R., Chen, K. N., y

Yamada, K. & Komagata, K. (1970). Taxonomic studies on coryneform bacteria. II. Principal amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J Gen Appl Microbiol* **16**, 103-113.

Yumoto, I., Yamazaki, K., Sawabe, T., Nakano, K., Kawasaki, K., Ezura, Y. & Shinano, H. (1998). *Bacillus horti* sp. nov., a new Gram-negative alkaliphilic bacillus. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 565-571.

Zervakis G., Yiatras P. y Balis C. (1996). Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 237-243.

Ziemke, F., Höfle, M. G., Lalucat, J., y Rosselló-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 179-186.