



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Universidad de Granada

Máster en Investigación y Avances en Microbiología

**Análisis de mutantes afectados en
la producción de celulosa por
Starkeya sp.**

Trabajo Fin de Máster

Lidia Generelo Casajús

Curso académico 2022/2023

Dirigido por la Dra. Silvia Marqués Martin y la Dra. Sophie
Marie Martirani Von Abercron. Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Estación Experimental del Zaidín

Universidad de Granada

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Estación Experimental del Zaidín

Memoria de Trabajo de Fin de Máster presentada por la alumna Dña. Lidia Generelo Casajús, del Máster Universitario en Investigación y Avances en Microbiología por la Universidad de Granada y realizado en el Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Estación Experimental del Zaidín para optar al título del Máster.

Granada, 10 de julio de 2023

Fdo.: Silvia Marqués Martín

Fdo.: Sophie-Marie Martirani Von Abercron

Fdo.: Lidia Generelo Casajús

Agradecimientos

Primero me gustaría agradecer a Silvia por abrirme las puertas del laboratorio 316, aun sabiendo que mi formación en el campo de la genética molecular era limitada. Gracias por aceptarme, durante estos meses he aprendido mucho más de lo que cabría esperar.

Dar las gracias a todos los integrantes del grupo, en especial a Inés, Pacheco, Patri y Rocío por ayudarme y explicarme todo aquello que no entendía. También a mis amigas, Ana, Laura, Luis y Né, que me han escuchado y apoyado en los momentos más complicados, gracias por hacer de este año algo que siempre recordaré. Y a todos mis compañeros del máster, sin haber compartido estos momentos junto a ellos este tiempo no hubiera sido lo mismo.

Pero sobre todo a Sophie, por enseñarme tanto y ayudarme en todo momento. Gracias por el apoyo y la confianza recibidos durante estos meses.

Por último, a mi familia que me han dado esta oportunidad y siempre me han apoyado en cada decisión.

Índice

Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	V
Listado de abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VII
1. Introducción	1
1.1. Celulosa bacteriana	1
1.1.1. Síntesis y regulación de la producción de celulosa bacteriana.....	3
1.1.2. Regulación de la biosíntesis de celulosa: c-di-GMP y <i>quorum sensing</i>	6
1.2. <i>Starkeya novella</i>	8
1.2.1. <i>Starkeya</i> sp. STN1B: nueva bacteria productora de celulosa bacteriana	9
2. Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1 Diseño experimental.....	12
3.2 Material biológico	12
3.2.1 Cepas bacterianas de estudio.....	12
3.2.2 Otras cepas utilizadas	13
3.2.3 Plásmidos	13
3.2.4 Oligonucleótidos	14
3.3 Condiciones y medios de cultivo	15
3.3.1 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	15
3.3.2 Cultivo de cepas biosensoras.....	15
3.3.3 Cultivo de <i>Starkeya</i> sp.....	16
3.4 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	17
3.4.1 Extracción de ADN genómico	17
3.4.2 Extracción de ADN plasmídico.....	18
3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	18
3.4.4 Restricción de ADN	18
3.4.5 Ligación de ADN	18
3.4.6 Transformación de células competentes.....	19
3.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
3.4.8 Determinación de la T_m de los oligonucleótidos.	20
3.4.9 Purificación de producto de PCR.....	21
3.4.10 Cuantificación de la concentración de ADN.....	21
3.5 Mutagénesis al azar	21
3.6 Métodos de selección de mutantes	22

3.6.1	<i>Screening</i> con calcoflúor.....	22
3.6.2	<i>Screening</i> con rojo Congo.....	22
3.6.3	<i>Screening</i> de producción de N-acil homoserina lactonas.....	23
3.7	Caracterización fenotípica de mutantes.....	23
3.7.1	Estudio de la morfología de colonia.....	23
3.7.2	Caracterización del crecimiento de mutantes.....	24
3.7.3	Producción de celulosa en placa.....	24
3.7.4	Producción de AHLs en placa.....	25
3.8	Identificación de la inserción del Mini-Tn5 y secuenciación de ADN.....	26
3.9	Mutación dirigida y complementación del mutante al azar.....	26
3.9.1	Generación mutante <i>lexA</i>	26
3.9.2	Complementación mutante <i>lexA</i>	28
3.10	Análisis bioinformáticos y estadísticos.....	29
4.	Resultados y discusión.....	30
4.1	Mutagénesis al azar de las cepas STN1A y STN1B.....	30
4.2	Selección y caracterización fenotípica de mutantes de interés.....	31
4.2.1	Efectos de la mutación en la morfología de colonia.....	33
4.2.2	Producción de celulosa por los mutantes.....	36
4.2.3	Producción de N-acil homoserina lactonas por los mutantes en placa.....	37
4.2.4	Caracterización del crecimiento de los mutantes seleccionados.....	38
4.3	Mapeo de los mutantes seleccionados.....	39
4.4	Análisis del entorno génico de los mutantes mapeados.....	41
4.4.1	Mutante A44-86.....	42
4.4.2	Mutante B49-64.....	44
4.4.3	Mutante B50-59.....	46
4.4.4	Mutante B51-22.....	48
4.4.5	Mutante B52-19.....	50
4.5	Mutagénesis dirigida y sobreexpresión del gen <i>lexA</i>	52
4.5.1	Delección del gen <i>lexA</i>	52
4.5.2	Sobreexpresión del gen <i>lexA</i>	53
5.	Conclusiones.....	56
6.	Bibliografía.....	57
7.	Anexos.....	67

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de la molécula de celulosa.	1
Figura 2. Esquema de diversos sustratos comunes a partir de los cuales las bacterias pueden sintetizar celulosa.	4
Figura 3. Tipos de operones de celulosa sintasa bacteriana (bcs), junto a la especie bacteriana a la que pertenecen.	6
Figura 4. Estructura química del segundo mensajero intracelular c-di-GMP.	6
Figura 6. Grupo de genes implicados en la biosíntesis de la celulosa en <i>Starkeya</i> sp..	10
Figura 7. Diseño experimental	12
Figura 8. Esquema del proceso de generación del mutante <i>lexA</i> por delección del gen..	27
Figura 9. Esquema del proceso de complementación del mutante B49-64.....	28
Figura 10. Colonias seleccionadas en medio con calcoflúor.....	31
Figura 11. Colonias seleccionadas en medio rojo Congo..	32
Figura 12. Fotografías de las colonias seleccionadas en medio W glucosa 25 mM calcoflúor y el mismo medio con rojo Congo	35
Figura 13. Peso seco (mg) de la celulosa bacteriana producida por las cepas silvestres y las 10 cepas mutantes seleccionadas en 30 mL de cultivo.	36
Figura 14. Producción de AHLs en medio sólido por el mutante A44-86.....	38
Figura 15. Cuantificación de densidad óptica y consumo de fuente de carbono de STN1B, B49-64, B50-59 y B52-19.	39
Figura 16. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante A44-86.....	42
Figura 17. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B49-64.....	45
Figura 18. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B50-59.....	47
Figura 19. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B51-22.....	49

Figura 20. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B52-19.....	51
Figura 21. Geles de agarosa para la comprobación de la construcción génica del mutante <i>lexA</i>	53
Figura 22. Geles de agarosa para la comprobación de la construcción génica de la complementación del mutante B49-64.....	54
Figura suplementaria 1. Producción de AHLs en placa por las cepas mutantes	67
Figura suplementaria 2. Red de interacción de proteínas de la diguanilato ciclasa mutada (Snov_2223).	67
Figura suplementaria 3. Niveles de expresión (fpkm) de <i>recA</i> y <i>lexA</i> en las cepas silvestres STN1A y STN1B.....	68
Figura suplementaria 4. Red de interacción de proteínas de la pseudouridina sintasa mutada (Snov_2819).	68

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas durante el estudio.....	13
Tabla 2. Plásmidos utilizados en el estudio.....	14
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	14
Tabla 4. Antibióticos utilizados durante el cultivo de las diferentes cepas bacterianas.	17
Tabla 5. Composición de la mezcla de reactivos para la reacción de PCR.....	20
Tabla 6. Parejas de oligonucleótidos junto con el gradiente de temperatura estudiado y la T_m seleccionada para operar las PCRs.....	21
Tabla 7. Composición del medio modificado para la producción de celulosa.	25
Tabla 8. Recuento de UFC/mL de las conjugaciones de las cepas silvestres tras su almacenamiento a -80°C (recuento final).	30
Tabla 9. Mutantes seleccionados, clonados y secuenciados junto con su fenotipo y la proteína que codifica el gen mutado.....	40

Listado de abreviaturas

AHLs: N-acil homoserina lactonas

Bcs: *Bacterial Cellulose synthase* / celulosa sintasa

BC: *Bacterial cellulose* / celulosa bacteriana

c-di-GMP: bis-(3'→5')-diguanilato cíclico

CF: Calcoflúor

CR: Congo Red / rojo Congo

Fpkm: *fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments* / fragmentos por kilobase transcrita por millón de fragmentos mapeados

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

QS: *quorum sensing*

STN1A: *Starkeya* sp. STN1A

STN1B: *Starkeya* sp. STN1B

WT: *Wild type* / cepa silvestre

Resumen

La celulosa bacteriana es un biopolímero con grandes propiedades que le confieren multitud de posibilidades de aplicación y hacen de este polímero un producto de interés biotecnológico. *Starkeya* sp. STN1B es una bacteria capaz de crecer sobre multitud de sustratos, desde sustratos simples como glucosa, sacarosa o metanol, hasta sustratos de difícil degradación como el naftaleno, pasando por todo tipo de residuos agroalimentarios, como la glicerina cruda. Además, es capaz de realizar la fijación de CO₂ y producir celulosa con esta fuente de carbono. El estudio de la producción de este polímero por esta cepa tan versátil es de gran interés, ya que permitiría acoplar procesos de eliminación de residuos a la obtención de un producto de valor añadido.

En este trabajo se han seleccionado y estudiado una serie de mutantes generados por la inserción al azar del transposón Mini-Tn5. Diez de los mutantes seleccionados presentaban diferencias con respecto al silvestre en uno de estos caracteres: morfología de colonia, producción de celulosa en medio líquido y producción de moléculas señal. Además, se identificaron los genes afectados por la mutación, consiguiendo mapear la inserción del Mini-Tn5 en cinco de ellos. De estos se analizó su entorno génico y la expresión de los genes cercanos a la mutación por transcriptómica. Los mutantes identificados y la proteína afectada de cada uno de ellos fueron los siguientes: A44-86: diguanilato ciclasa, B49-64: represor LexA, B50-59: pseudouridina sintasa y proteína de la familia patatina, B51-22: formilmetanofurano deshidrogenasa y B52-19: triosa fosfato isomerasa. Estos mutantes afectados en la producción de celulosa no poseían la inserción del transposón en genes directamente implicados en la síntesis del polímero. Esto indica que para producción de celulosa se requiere el correcto funcionamiento de otras rutas relevantes en metabolismo celular, codificadas por genes cuya implicación en la producción de celulosa debemos dilucidar.

1. Introducción

1.1. Celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana (*Bacterial cellulose*, BC) es un biopolímero de gran interés biotecnológico debido a que puede tener multitud de aplicaciones industriales. Se trata de un homopolisacárido lineal cuya fórmula química es $(C_6H_{10}O_5)_n$, y está compuesto por monómeros de β -D-glucopiranosos unidos mediante enlaces β -1,4-glicosídicos (Fig. 1) (Sharma and Bhardwaj, 2019).

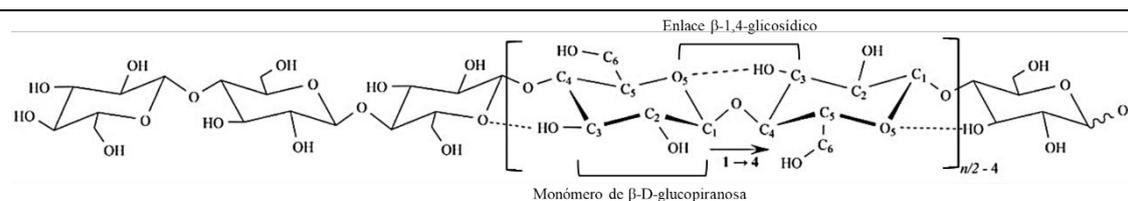


Figura 1. Estructura química de la molécula de celulosa (n =grado de polimerización). Adaptado de Zhong, 2020.

Este exopolisacárido fue descrito por primera vez en bacterias, en *Acetobacter xylinus* en 1886 por A. J. Brown, una bacteria aerobia y Gram-negativa, reclasificada como *Komagataeibacter xylinus* por Yamada *et al.*, en 2012. Además de esta especie, se han caracterizado muchas bacterias productoras de BC pertenecientes a géneros tan diversos como *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Rhizobium*, y *Sarcina* (Huang, Dufresne and Lin, 2019). Pero las mayores productoras a nivel industrial son las Acetobacteraceae, y especialmente las bacterias pertenecientes al género *Komagataeibacter*, que también son utilizadas como cepas modelo en el estudio de los aspectos moleculares de la ruta de síntesis y la optimización de la producción de celulosa bacteriana (Jacek *et al.*, 2019).

La celulosa bacteriana posee una estructura química idéntica a la celulosa vegetal. Pero a diferencia de esta última, la BC se sintetiza de forma pura, ya que su producción está libre de hemicelulosas y ligninas, que en la celulosa de plantas deben ser separadas durante el proceso de purificación, y además es metabólicamente inerte (de Amorim *et al.*, 2020). La BC posee dimensiones diferentes a la celulosa vegetal (13-22 μ m de diámetro de fibra), siendo las fibras de síntesis bacteriana de 10 a 100 nm de diámetro, y puede formar diferentes tipos de redes de nanofibras (Klemm *et al.*, 2011), por lo que posee numerosas ventajas frente a los polímeros de origen vegetal. En la celulosa bacteriana las moléculas de glucosa están giradas 180° respecto a las moléculas adyacentes debido a la

configuración β del C-1. La molécula posee carácter anfipático y las hebras que la conforman se asocian entre sí mediante enlaces de hidrógeno que permiten su estabilización (Abidi *et al.*, 2022).

Gracias a sus características químicas, este polímero posee propiedades únicas que le confieren gran interés ecológico y biotecnológico: puede contener hasta un 99% de agua, debido a que posee una gran capacidad de retención, y es insoluble en agua, posee una elevada microporosidad, alta resistencia mecánica y elasticidad, elevada cristalinidad y una estructura química moldeable (Salimi *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021). Posee un papel importante como barrera frente al estrés ambiental debido a que forma parte de la matriz polisacáridica de los biofilms (Omadjela *et al.*, 2013). Además su producción y uso industrial presentan multitud de ventajas ya que es un polímero biodegradable, posee baja toxicidad y gracias a su estructura molecular es biocompatible, por lo que se encuentra dentro de los productos reconocidos como seguros (GRAS) (Sharma and Bhardwaj, 2019).

Las cepas utilizadas en los procesos industriales de producción de celulosa son capaces de sintetizar este exopolisacárido utilizando multitud de sustratos como fuente de carbono, desde compuestos simples como la glucosa o la fructosa (Masaoka, Ohe and Sakota, 1993) hasta diferentes sustratos de bajo coste (Mohammadkazemi, Azin and Ashori, 2015; Jacek *et al.*, 2021), como diversos residuos agro-industriales (Abol-Fotouh *et al.*, 2020), residuos de la industria del tabaco (Dubey, Singh and Singh, 2018) e hidrocarburos (Marín *et al.*, 2019). Esto permite acoplar la eliminación de desechos a la obtención de un producto de valor añadido con multitud de aplicaciones, estableciendo un proceso de economía circular sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

Todas estas propiedades hacen que la BC tenga infinidad de aplicaciones biotecnológicas en campos muy diversos. En la industria biomédica este polímero se investiga su uso en la cicatrización y la regeneración celular, y como biomaterial para membranas, hidrogeles y en ingeniería tisular. (Fontana *et al.*, 1990; Xue, Mou and Xiao, 2017; Piasecka-Zelga *et al.*, 2021). Otra aplicación es su uso en la industria farmacológica y cosmética, donde este polímero es utilizado en la administración y liberación controlada de fármacos o como portador de principios activos (Salimi *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2021). También posee aplicaciones en la industria alimentaria donde se utiliza como agente espesante y como bioplástico en envases biodegradables (Azeredo *et al.*, 2019; Cazón and Vázquez,

2021). Además encuentra aplicaciones en otras industrias, como la textil, donde se utiliza en la producción de fibras de alta resistencia, en la industria papelera para producir papel de mayor calidad, y en la industria electrónica, donde se aplica en el desarrollo de pantallas, sensores y baterías (Nogi *et al.*, 2009; Fillat *et al.*, 2018; Nanollose Ltd, 2020).

Sin embargo, a pesar de la multitud de aplicaciones biotecnológicas y las ventajas que presenta la BC, la producción industrial es limitada debido a sus altos costes y la baja rentabilidad de los cultivos. Por este motivo los estudios en este campo se focalizan en la búsqueda de nuevas cepas superproductoras de BC, que en combinación con el uso de sustratos de bajo coste y la investigación de nuevas aplicaciones, permitan incrementar la producción y reducir los costes asociados a esta (Mohammadkazemi, Azin and Ashori, 2015; Jacek *et al.*, 2021).

1.1.1. Síntesis y regulación de la producción de celulosa bacteriana

1.1.1.1. Ruta de síntesis de BCN

El proceso de síntesis de este polímero se divide en tres etapas: 1) polimerización intracelular de las cadenas de β -1,4-glucanopiranosas que conforman la celulosa, a nivel de membrana citoplasmática; 2) secreción extracelular de las cadenas lineales de celulosa; y 3) autoensamblaje y cristalización del polímero (Brown Jr and Saxena, 2000).

La polimerización de celulosa comienza por la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato (G6P) por la glucoquinasa. La G6P se isomeriza a glucosa-1-fosfato mediante la enzima fosfoglucomutasa (Pmg). Después a partir de UTP y glucosa-1-fosfato se sintetiza la UDP-glucosa mediante la UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGP). Finalmente comienza la polimerización de las cadenas de celulosa a partir de las unidades de UDP-glucosa a través de la *Bacterial Cellulose synthase* o celulosa sintasa (Bcs), complejo enzimático que incorpora la UDP-glucosa a la cadena polisacárida naciente, liberando el UDP al citosol (Ross, Mayer and Benziman, 1991). La reacción limitante en este proceso es la catalizada por la UDPGP, enzima clave en la producción debido a que sintetiza el único sustrato que la Bcs utiliza para la polimerización de las cadenas de celulosa (Valla *et al.*, 1989). Por otra parte el metabolito clave es la G6P, que puede ser sintetizado mediante diversas rutas metabólicas (ruta de las pentosas-fosfato, ciclo de los ácidos tricarbónicos, gluconeogénesis, etc.) y a partir de diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, fructosa, etc.) según la cepa (Fig. 2) (Lee *et al.*, 2014; Mohammadkazemi, Azin and Ashori, 2015). A la reacción de síntesis de celulosa se

encuentra acoplada su secreción. Tras la polimerización que ocurre en la región citoplásmica de la Bcs, las cadenas de celulosa son excretadas a través de la envoltura celular hacia la matriz extracelular, donde se autoensamblan y cristalizan (Ruan *et al.*, 2016).

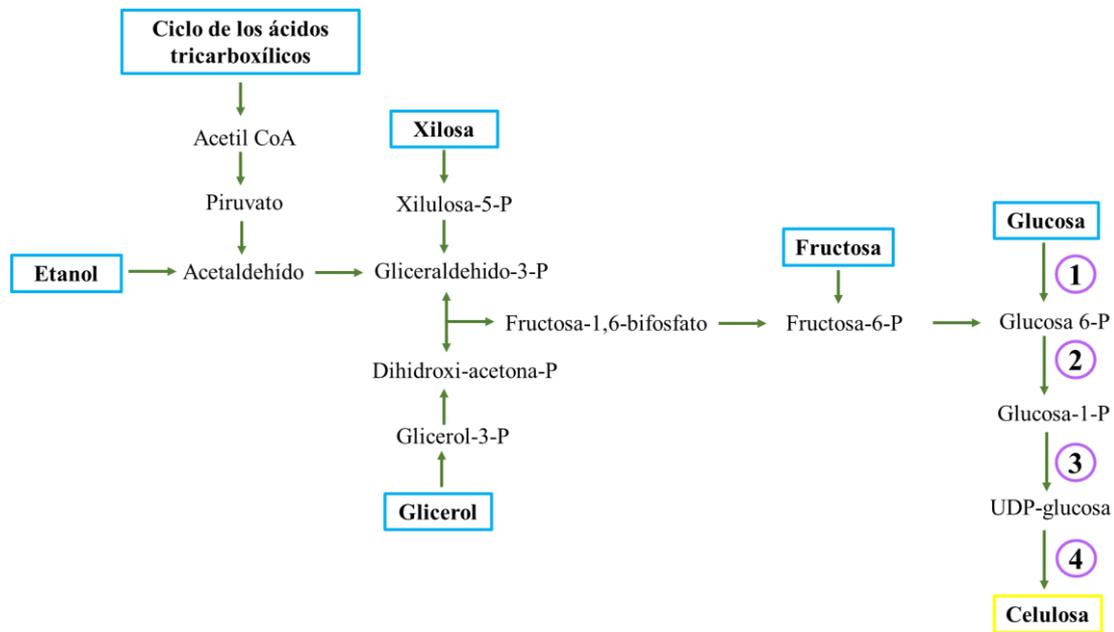


Figura 2. Esquema de diversos sustratos comunes a partir de los cuales las bacterias pueden sintetizar celulosa. En los círculos se indican las enzimas que participan en la ruta de síntesis de celulosa a partir de glucosa: 1) Glucoquinasa; 2) Fosfoglucomutasa (Pmg); 3) Pirofosforilasa (UDPGP); 4) Celulosa sintasa.

1.1.1.2. Sistema de síntesis de celulosa *bcs*

La biosíntesis de celulosa es un proceso energéticamente costoso, por lo que está muy regulada y los genes que codifican las enzimas involucradas en la ruta han sido bien caracterizadas. Como se ha mencionado anteriormente la polimerización de la BC se produce mediante la incorporación de unidades de UDP-glucosa a la cadena de celulosa mediante el complejo enzimático Bcs. Esta enzima en *K. xylinus* está codificada por el operón *bcsABCD*, el cual fue descrito por primera vez por Saxena *et al.*, en 1994.

El núcleo catalítico de este complejo enzimático está formado por el tándem BcsAB. Por un lado, BcsA es la subunidad catalítica, posee un dominio glucosiltransferasa, un módulo transmembrana (TM) para la exportación de celulosa a través de la membrana interna y un dominio PilZ de unión a bis-(3'→5')-diguamilato cíclico (c-di-GMP). Por otro lado, BcsB es una proteína periplásmica unida a BcsA y que permite su estabilización. BcsB contiene dos dominios de unión a carbohidratos (CBD) cuya función es guiar la cadena

de celulosa hacia el sistema de secreción (Morgan, Strumillo and Zimmer, 2013; Morgan, McNamara and Zimmer, 2014). Para la exportación y cristalización de este polímero *in vivo* también son necesarias las proteínas BcsC, una porina de membrana, y BcsD, una proteína periplásmica (Hu *et al.*, 2010; Taweecheep *et al.*, 2019). Además, este locus incluye tres genes más: *bcsZ* y *bglX*, que codifican para una endoglucanasa y una β -glucosidasa respectivamente, y *bcsH*. De estos genes, el producto de *bcsH* es el peor caracterizado; se sabe que es necesario para la síntesis de BC debido a que su expresión afecta a los niveles de BcsB y BcsC, interactúa con BcsD y está implicado en la cristalización de las cadenas de glucano (Deng *et al.*, 2013; Römling and Galperin, 2015).

Desde el descubrimiento de este operón se han identificado distintos sistemas de secreción en diversas cepas productoras de BCN. Estos se agrupan en cuatro tipos diferentes, que engloban a varios subgrupos (Fig. 3). El sistema de síntesis de tipo I, propio de *K. xylinus*, además de presentar los genes *bcsA* y *bcsB* se caracteriza por la presencia del gen *bcsD*, cuyo producto contribuye al empaquetamiento y cristalización de las cadenas de celulosa (Tajima *et al.*, 2022). El operón del sistema de tipo II, posee dos nuevas subunidades: BcsE (proteína citosólica de unión a c-di-GMP) y BcsG (transferasa periplásmica) (Krasteva *et al.*, 2017; Zouhir *et al.*, 2020). Por otro lado el sistema de tipo III, carece de las subunidades BcsD, BcsE y BcsG, y en lugar de BcsC, aparece BcsK, una proteína con un dominio TRP (repeticiones en tándem de tetratricopéptido) (Abidi *et al.*, 2022). Por último, existe el sistema de tipo IV, que se caracteriza por tener un operón similar a *bcs* que carece de *bcsB* y otros genes del operón, por lo que la unión de la cadena de glucano y su traslocación deben ser llevadas a cabo por otras proteínas aún sin identificar (Kawano *et al.*, 2011).

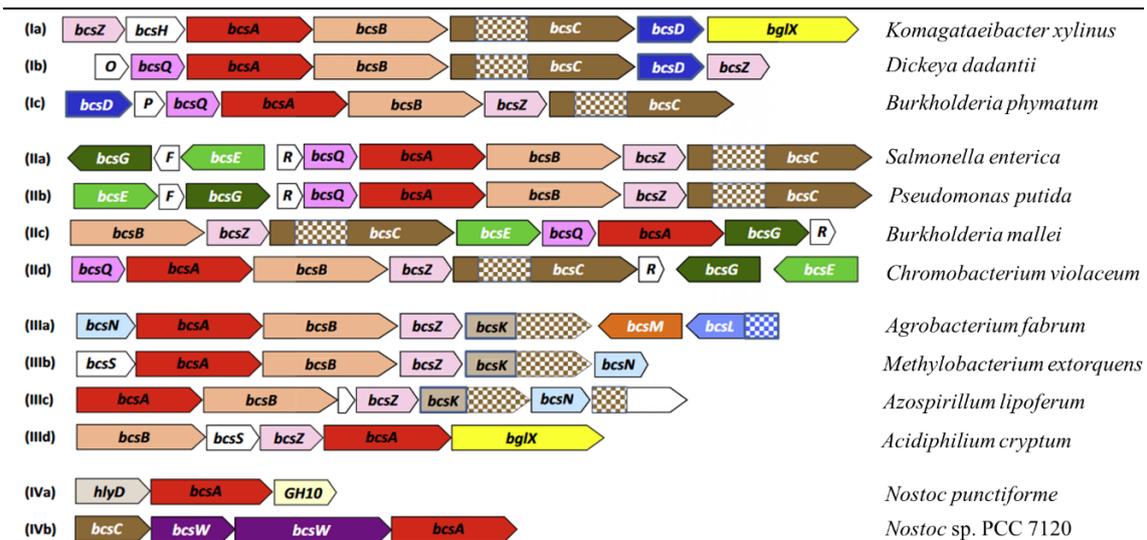


Figura 3. Tipos de operones de celulosa sintasa bacteriana (bcs), junto a la especie bacteriana a la que pertenecen. Patrón a cuadros indica el dominio de repetición de tetratricopéptidos (TPR). Modificado de Römbling and Galperin, 2015.

1.1.2. Regulación de la biosíntesis de celulosa: c-di-GMP y quorum sensing

La regulación de la biosíntesis de celulosa ocurre tanto a nivel transcripcional como postraduccional. Esta regulación está centrada en el funcionamiento del complejo BcsAB. La subunidad BcsA posee una conformación autoinhibitoria y cuando se encuentra inactiva su centro catalítico es inaccesible para la UDP-glucosa, y para cambiar de conformación requiere de una señal activadora (Jacek *et al.*, 2019). Un mecanismo de regulación es la activación alostérica por el segundo mensajero c-di-GMP (Fig. 4). Esta molécula es reconocida a través del dominio PilZ que se encuentran en el centro alostérico de la celulosa sintasa, el cual en presencia del segundo mensajero se une a él, provocando un cambio conformacional. Esto permite que el centro catalítico quede disponible para el sustrato y pueda ocurrir la síntesis de celulosa (Ross *et al.*, 1987; Römbling and Amikam, 2006).

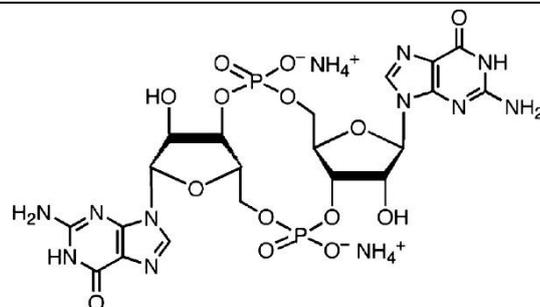


Figura 4. Estructura química del segundo mensajero intracelular bis-(3'-5')-di-GMP cíclico (c-di-GMP). Modificado de (Ryan *et al.*, 2006).

Este c-di-GMP fue descrito por primera vez por Benziman *et al.* en 1980 como regulador de la producción de celulosa. Es uno de los segundos mensajeros más comunes de bacterias y también regula otros procesos celulares, como la motilidad bacteriana, la respuesta ante oxígeno, la formación de biofilm y su dispersión, entre otros (Römling, Galperin and Gomelsky, 2013). Los niveles celulares de c-di-GMP están controlados por la acción antagonista de las enzimas diguanilato ciclasa (DGC), que sintetiza el c-di-GMP, y la c-di-GMP fosfodiesterasa (PDE), que lo hidroliza. La actividad de DGC está asociada con el dominio proteico GGDEF, mientras que la actividad de PDE está asociada a dominios EAL o HD-GYP, llamados así por incluir las secuencias de aminoácidos respectivas (Ryjenkov *et al.*, 2005; Römling, 2009). Sin embargo, aunque se haya estudiado ampliamente el papel del c-di-GMP, su regulación posee gran complejidad, ya que esta molécula se encuentra integrada dentro de otros sistemas de regulación como el *quorum sensing* (QS) (Ueda and Wood, 2009).

Las bacterias pueden comunicarse entre sí tanto intra- como inter-específicamente mediante moléculas extracelulares de señalización. Esto permite que las bacterias puedan responder a la presencia de otras mediante un mecanismo denominado *quorum sensing*. A través de este proceso modifican su comportamiento en función a los cambios en la densidad celular, en la diversidad de la comunidad microbiana o a cambios ambientales. Para que la comunicación se lleve a cabo deben producir, liberar y/o detectar moléculas señal extracelulares denominados autoinductores. Estas moléculas solamente son detectadas cuando la densidad celular aumenta hasta superar un umbral mínimo (Miller and Bassler, 2001; Hense and Schuster, 2015), ya que a la vez que se incrementa la densidad celular, los autoinductores se acumulan y es cuando pueden ser detectados (Lerat and Moran, 2004). Esto provoca cambios en la expresión génica, que se traduce en la activación de diferentes funciones biológicas, como la formación de biofilms, la síntesis de exopolisacáridos, la producción de toxinas, la bioluminiscencia o la inducción de la producción de más moléculas señal (Ohtani, Hayashi and Shimizu, 2002; Quiñones, Dulla and Lindow, 2005). Existe una gran diversidad de autoinductores, siendo muy variados en bacterias Gram-negativas, mientras que en Gram-positivas son más comunes aquellos de naturaleza peptídica (A. Lowery, J. Dickerson and D. Janda, 2008).

Destacan en las bacterias Gram-negativas las N-acil homoserina lactonas (AHLs); estas moléculas fueron identificadas en el sistema QS de bioluminiscencia LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri* (Fuqua, Winans and Greenberg, 1996). Este sistema utiliza las AHLs como

moléculas señal, sintetizadas por enzimas de tipo LuxI. Las AHLs están formadas por un anillo lactónico de homoserina lactona unido mediante enlace amida a una cadena de entre 4 y 18 carbonos (Fig. 5.A). Estos autoinductores poseen gran variedad estructural para poder interactuar con diversos reguladores de respuesta (Schuster *et al.*, 2013; Pappenfort and Bassler, 2016). En algunas bacterias también existe otro sistema QS mediado por factores de señalización difusibles (DSF) (Fig. 5.B), en el que también participa una proteína encargada de la síntesis de la molécula señal y otra proteína que la detecta. Pero a diferencia del sistema anterior, el sistema dependiente de DSF no ejerce su actividad directamente a nivel de la regulación transcripcional de genes, sino que modula los niveles celulares del segundo mensajero c-di-GMP. El primer sistema dependiente DSF fue descrito el de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), donde se identificó el clúster génico *rpf* (factores de regulación de la patogenicidad) que codifica para la proteína RpfF encargada de la síntesis de DSF y RpfC y RpfG encargados de la recepción y transducción de la señal (Fig. 5.B).

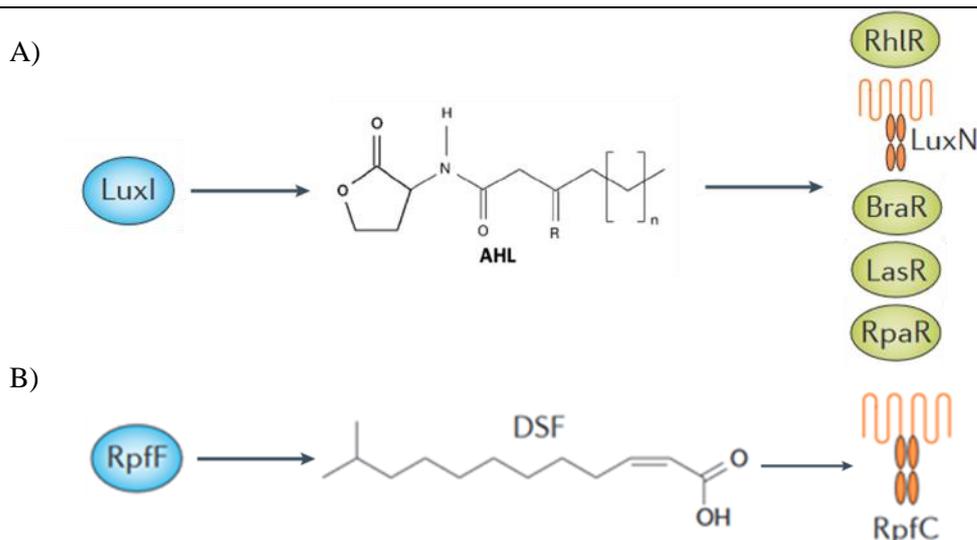


Figura 5. Sistemas de quorum sensing. A) Autoinductores de N-acil homoserina lactona, y varios receptores posibles según la estructura química. B) Estructura del factor de señal difusible (DSF) de *Xanthomonas campestris*. En los círculos azules se muestra la proteína de síntesis de los autoinductores, y en verde las proteínas receptoras de la señal. Modificado de Pappenfort and Bassler, 2016.

1.2. *Starkeya novella*

Starkeya novella, anteriormente conocida como *Thiobacillus novellus* y reclasificada por Kelly, McDonald and Wood, en 2000, es una α -Proteobacteria (familia *Xanthobacteraceae*), Gram-negativa, de morfología bacilar e inmóvil. Fue descrita por primera vez por Starkey, en 1934, siendo el primer microorganismo aislado capaz de crecer como quimiolitotrofo facultativo oxidador de azufre (Kappler *et al.*, 2012).

Esta bacteria se caracteriza por su versatilidad metabólica ya que, además de crecer como quimiolitotrofa oxidadora de azufre, puede crecer como heterótrofo sobre diversas fuentes de carbono, y como metilótrofo (Kappler *et al.*, 2012; Kappler and Nouwens, 2013).

Como heterótrofa es capaz de crecer en más de 39 sustratos diferentes, desde compuestos orgánicos simples como la glucosa o la fructosa, hasta el metanol, el formiato o el oxalato, e incluso compuestos orgánicos complejos. Como quimiolitotrofa puede utilizar CO₂ como fuente de carbono y compuestos reducidos de azufre como fuente de poder reductor mediante las vías Sor y Sox (Kappler and Nouwens, 2013; Dudášová *et al.*, 2014). Además, posee una gran capacidad de adaptación, ya que ha sido aislada en diversos ambientes; esta capacidad de adaptación podría estar relacionada con su capacidad de crecer en un rango de temperatura de entre 10 y 37°C y tolerar pHs entre 5,7 y 9 (Kelly, McDonald and Wood, 2000).

Es una bacteria cultivable en el laboratorio y manipulable genéticamente, por lo que ha sido utilizada en diversos estudios moleculares, con el fin de comprender mejor el metabolismo oxidativo del azufre y la regulación del metabolismo del carbono (Kappler and Nouwens, 2013). El poder degradar una gran diversidad de fuentes de carbono, incluyendo compuestos de difícil degradación y contaminantes, hace que esta bacteria sea de gran interés en la biorremediación de suelos y la descontaminación de aguas (Dudášová *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016). Esto la convierte en una bacteria de relevancia biotecnológica.

1.2.1. *Starkeya* sp. STN1B: nueva bacteria productora de celulosa bacteriana

En el estudio realizado por Martirani-Von Abercron *et al.*, 2017 se aisló la cepa *Starkeya* sp. STN1B (STN1B), capaz de formar biopelículas sobre cristales de naftaleno. Este microorganismo se encontró partiendo de una comunidad microbiana que se desarrolló en un cultivo de enriquecimiento microaerófilo a partir de agua de un acuífero contaminada por hidrocarburos. Durante este enriquecimiento se pudo favorecer la transferencia horizontal de genes, surgiendo así una cepa productora de polímeros capaz de degradar naftaleno a bajos porcentajes de oxígeno.

Para analizar su capacidad de producción de biofilm y degradación de naftaleno se realizó un segundo estudio utilizando este compuesto como única fuente de carbono. Los resultados mostraron que el polímero que producía esta cepa estaba compuesto

principalmente de celulosa. Se identificó el grupo de genes que codifican para cinco proteínas homólogas a las enzimas de síntesis de celulosa (Marín *et al.*, 2019) (Fig. 6). El operón es similar a los sistemas de secreción de tipo III, incluyendo los genes codificantes para las dos subunidades catalíticas principales de la celulosa sintasa (BcsA y BcsB). En lugar de la subunidad BcsC, se encontró el gen homólogo *bcsK*. El operón también incluía el gen *bcsZ* que codifica una endo- β -1,4-glucanasa periplásmica, y un gen homólogo a *bcsN*, que aparece únicamente en los operones de tipo III (Römling and Galperin, 2015; Marín *et al.*, 2019). Divergente a este operón se encuentra un gen codificante del regulador transcripcional de tipo LysR (LTTR). Los reguladores de esta familia participan en la regulación de muy diversos procesos, como la división celular o el *quorum sensing* (Maddocks and Oyston, 2008).

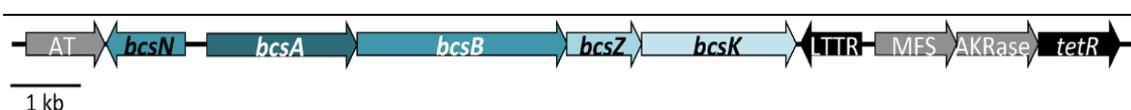


Figura 5. Grupo de genes implicados en la biosíntesis de la celulosa en *Starkeya* sp. En azul se representan los genes directamente implicados en la síntesis de celulosa; en gris se muestran los genes cuya participación en la síntesis de celulosa no ha sido confirmada; y en negro los genes con homología a genes reguladores transcripcionales (Marín *et al.*, 2019).

A partir de esta cepa y mediante selección con naftaleno como única fuente de carbono se aisló el mutante espontáneo *Starkeya* sp. STN1A, caracterizado por tener una morfología de colonia diferente y con una capacidad de síntesis de celulosa superior a STN1B. Al secuenciar el genoma de ambas bacterias se detectó una gran deleción y varias mutaciones puntuales con respecto a su parental STN1B; la deleción incluía un clúster *rpf* similar al de *X. campestris* ligeramente modificado, que codifica para el sistema de QS dependiente de factores de señalización difusibles. Para demostrar que esta deleción era responsable del nuevo fenotipo superproductor se inactivó mediante mutagénesis dirigida el gen *rpfC* en STN1B. Se comprobó que la ausencia del sistema *rpf* generaba el fenotipo de la cepa STN1A, probando por tanto que la ausencia del sistema *rpf* en la cepa superproductora era el responsable principal del incremento en la tasa de producción de celulosa.

En este trabajo se tratará de esclarecer la funcionalidad de diversos genes de la cepa potencialmente relacionados con la síntesis de celulosa y la regulación por QS mediante la selección y estudio fenotípico y genotípico de mutantes afectados en la biosíntesis de BC y la capacidad de producción de N-acil homoserína lactonas.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la ruta de síntesis de celulosa bacteriana por las cepas *Starkeya* sp. STN1A y STN1B mediante el análisis de una colección de mutantes al azar. Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar mutantes con fenotipos de interés para escoger mutaciones en genes involucrados en el proceso de síntesis de celulosa o afectados en el sistema de *quorum sensing*.
2. Analizar e identificar los genes mutados y estudiar su expresión e implicación en la síntesis de la celulosa bacteriana.
3. Caracterizar del crecimiento y la producción de celulosa por los mutantes seleccionados.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño experimental

Como se ha mencionado anteriormente el objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la ruta de síntesis de celulosa por la cepa bacteriana *Starkeya* sp. (Fig. 7). Para esto se generaron mutantes al azar de las cepas estudiadas en el laboratorio *Starkeya* sp. STN1A y *Starkeya* sp. STN1B. Tras esto se utilizaron tres métodos de selección para realizar un cribado de los mutantes y escoger aquellos que fueran de interés para el posterior estudio de su fenotipo y genotipo.

La selección se realizó en base a la producción o no de celulosa, la morfología de colonia y la producción de N-acil homoserina lactonas. Tras su selección se identificaron los genes mutados, estudiando posteriormente su funcionalidad mediante análisis bioinformáticos y elaborando el mutante complementario y la reconstrucción del mutante *lexA*. Además, para finalizar de caracterizar el fenotipo de los mutantes se estudió la producción de AHLs en placa y se cuantificó y analizó la producción de celulosa, así como su crecimiento y consumo de fuente de carbono.

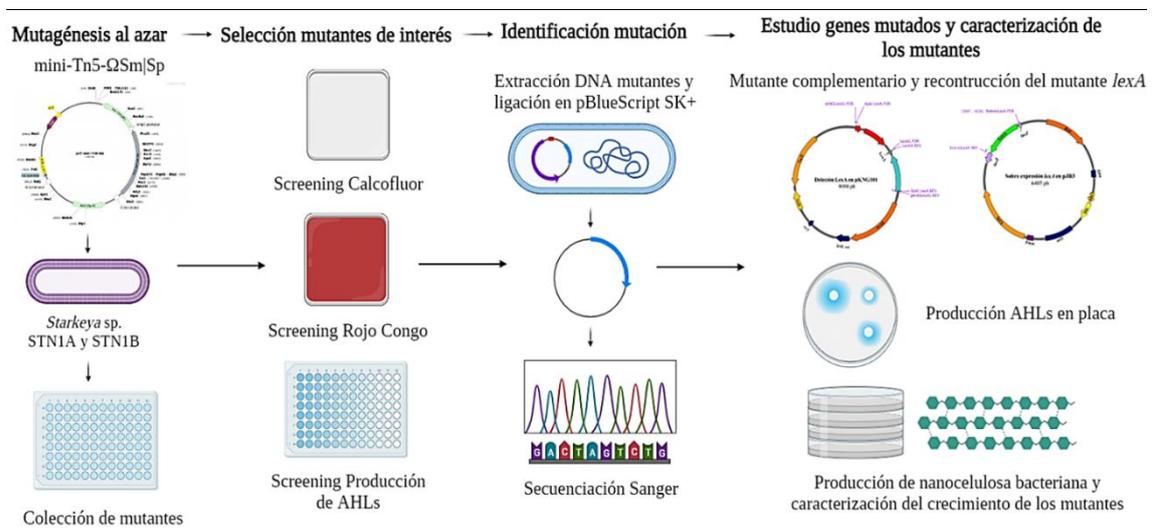


Figura 6. Diseño experimental, creado con BioRender.com.

3.2 Material biológico

3.2.1 Cepas bacterianas de estudio

Las cepas utilizadas durante este trabajo fueron *Starkeya* sp. STN1A y *Starkeya* sp. STN1B identificadas en estudios anteriores por integrantes del grupo de investigación. Por un lado, la cepa silvestre o *wild type* (WT) *Starkeya* sp. STN1B fue aislada

previamente a partir de un enriquecimiento micro-aeróbio con agua de un acuífero contaminado con hidrocarburos y enriquecido con naftaleno como única fuente de carbono (Martirani-Von Abercron *et al.*, 2017). Posteriormente, se aisló la cepa *Starkeya* sp. STN1A, un mutante super productor de BC con el sistema *rpf* delecionado (Marín *et al.*, 2019).

3.2.2 Otras cepas utilizadas

Durante el desarrollo de este trabajo también se utilizaron otras cepas bacterianas para los diferentes ensayos realizados (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas durante el estudio.

Cepa	Características genotípicas	Referencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	(TraG::LacZ) Gm ^R . Cepa biosensora. Actividad β-galactosidasa en presencia de AHLs exógenos de cadena larga (8 a 12 carbonos).	Luo, Clemente and Farrand, 2001
<i>Escherichia coli</i> cc118	(<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> (Sp ^R), <i>spoK</i> (Rif ^R) <i>argE</i> , <i>recA1</i>	Backwith J, m., 1985
<i>Escherichia coli</i> cc118 λpir	Rif ^R , Δ(<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (Am), <i>recA 1</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>)	Herrero <i>et al.</i> , 1990
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>endA 1</i> , <i>hshr17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> , Δ(<i>argF-lac</i>), <i>U169</i> , <i>depR</i> (φ80dlacΔ(<i>lacZ</i>)M15)	Sambrook and Russell, 2001

Gm^R: resistencia a gentamicina, Sp^R: resistencia a estreptomicina, Rif^R: resistencia a rifampicina, Nal^R: resistencia a nalidíxico

3.2.3 Plásmidos

Durante este trabajo se utilizaron una serie de plásmidos escogidos por sus características en función de los requerimientos de los ensayos realizados (Tabla 2).

Tabla 2. Plásmidos utilizados en el estudio.

Vector	Características	Referencia
pBlueScriptII SK+	Ap ^R . Vector de clonación	Stratagene
pRK600	Cm ^R , ColE1, <i>oriV</i> , <i>mobRK2</i> , <i>tra+</i> . Vector de ayuda en la conjugación triparental	Kessler, de Lorenzo and Timmis, 1992
pJB3Ap	Ap ^R , <i>oriT</i> , <i>oriV</i>	Modificado de Blatny <i>et al.</i> , 1997
pKNG101	Sm ^R , <i>oriR6K</i> , <i>mobRK2</i> , <i>sacBR</i>	Kaniga, Delor and Cornelis, 1991
pUT Sm Sp	Vector de inserción en la conjugación	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990

Ap^R: resistencia a ampicilina, Cm^R: resistencia a cloranfenicol, Sm^R resistencia a estreptomicina.

3.2.4 Oligonucleótidos

Durante este trabajo se utilizaron una serie de oligonucleótidos o primers (Tabla 3) que fueron proporcionados por el laboratorio y otros diseñados específicamente para esta investigación. Se utilizaron para la secuenciación de mutantes, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la mutación dirigida y la sobreexpresión de genes mutados. Los oligonucleótidos diseñados durante este trabajo se realizaron con el programa SnapGene versión 6.2.2 y se sintetizaron en Condalab.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Uso
SobreLexA.FOR	GCAGGTCGACTCTAGAACGCCGCCAGACG	PCR
SobreLexA.REV	CGGTACCCGGGGATCCCGTCAATAGCGTCGGAAC AG	PCR
pKNGLexA1.FOR	GGATTACGCGTTAACCCGGGCCCGAAGCCACCGT CATCACCGC	PCR
LexA1.REV	CTTGCCCTGCTGTTTGCGGGTGAGCATC	PCR
LexA2.FOR	CGCAAACAGCAGGGCAAGCTGGTCGG	PCR
pKNGLexA2.REV	GACTATAGACTATACTAGTTATGCCGCGTTCCATT TCCAG	PCR
Sm-SpF(1)Re	TGCGTTCGGTCAAGGTTCTGG	Secuenciación
Sm-Sp final Re	CTAACAATTCGTTCAAGCCGACGCC	Secuenciación

Rev-21	CAGGAAACAGCTATGACCATG	Secuenciación
pUC-M13F24	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Secuenciación
3-pK	CCGAATGTGCAGTTATCCC	PCR y secuenciación
5-pK	TCAGCGACACTGAATACG	PCR y secuenciación

3.3 Condiciones y medios de cultivo

Todos los cultivos y procedimientos biológicos se realizaron en condiciones de esterilidad, trabajando en campana de flujo laminar y autoclavando a 121°C a 1 atm de presión todos los recipientes, medios y soluciones utilizadas. Aquellos compuestos o soluciones termosensibles fueron filtradas mediante filtros estériles de fibra de vidrio y acetato de celulosa (GF+CA) de 0,2 µm para asegurar el mantenimiento de la esterilidad.

3.3.1 Cultivo de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli*, se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951) cuya composición para 1 L fue de 10 g de Bactotripton, 5 g de Bacto-Levadura, 10 g de NaCl, y H₂O destilada para medio líquido. Este medio puede ser modificado adicionando 15 g/L de Difco-agar para conseguir su gelificación y ser utilizado en el cultivo en placa de las diversas cepas.

Cada cepa de *E. coli* utilizada posee diferentes genes de resistencia a antibióticos, y el medio en el que fueron cultivadas fue suplementado con los correspondientes para cada cepa, con el fin de preservar la mutación y continuar con la selección de la cepa (Tabla 1). Todos los cultivos de las diferentes cepas de *E. coli* se incubaron *over night* (O/N) a 37°C, en agitación a 200 revoluciones por minuto (rpm) cuando el medio era LB líquido, o en estático cuando se inocularon en medio sólido.

3.3.2 Cultivo de cepas biosensoras

Durante este estudio se realizaron ensayos de producción de AHLs que pueden ser detectadas mediante diferentes cepas biosensoras. En este trabajo se utilizaron las cepas biosensoras *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 y *Cromobacterium violaceum* CV026. La primera cepa es resistente a Gentamicina, por lo que se cultivó en medio LB líquido o sólido suplementado con este antibiótico. Mientras que *C. violaceum* CV026 no posee resistencia a ningún antibiótico, por lo que su cultivo fue en medio LB sin adicionar ningún antibiótico. Ambas cepas se cultivaron en aerobiosis a 30°C y en estático.

3.3.3 Cultivo de *Starkeya* sp.

Las cepas STN1A y STN1B se cultivaron en Medio Mineral Widdel (*Widdel Mineral Medium*, WMM) (Widdel and Bak, 1992), modificado según los requerimientos de cada experimento, detallado en los siguientes apartados.

Este medio mínimo contiene para 100 mL de medio: 4 mL de solución de Widdel 25x, 5 mL de Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS; $C_7H_{15}NO_4S$) 0,6 M como tampón en el caso del cultivo sólido o 6 mL de (P)Na 0,5 M pH 7,2 para el cultivo líquido, 1 mL de Na_2SO_4 0,1 M y de KNO_3 al 0,8 M, fue suplementado con 50 μ l de una solución de vitaminas (Widdel and Bak, 1992), 100 μ l de elementos traza SL-10 (Widdel, Kohring and Mayer, 1983) y 100 μ l de solución de Selenio/Wolframio (Widdel, Kohring and Mayer, 1983). Además, al medio se le adicionaron dos antibióticos: 10 μ g/ml de ácido nalidíxico (Nal) y 5 μ g/ml de kanamicina (Km), a los que ambas cepas silvestres son resistentes de forma natural (Tabla 4). Este medio se utilizó tanto para cultivar a las cepas en medio líquido, adicionando H_2O destilada hasta completar el volumen; como para el cultivo en placa, adicionando en su lugar Difco-agar al 1,6% (p/v) para obtener su gelificación.

La composición de las diferentes soluciones utilizadas para el medio WMM se detallan a continuación. La solución Widdel 25X se preparó con las siguientes concentraciones: 5 g/L de KH_2PO_4 , 6,25 g/L de NH_4Cl , 25 g/L de $NaCl$, 10 g/L de $MgCl_2 \times 6 H_2O$, 12,5 g/L de KCl , 3,75 g/L de $CaCl_2 \times 2 H_2O$, disuelto en un volumen de 1 L de H_2O destilada.

La solución Selenio/Wolframio se preparó con 500 mg/L de $NaOH$ (0,1 M), 3 mg/L de $Na_2SeO_3 \times 5 H_2O$, y 4 mg/L de $NaWO_4 \times 2 H_2O$, en un volumen de 1 L de H_2O destilada.

La Solución de Elementos Traza (SL-10) se elaboró con 10 mL HCl (25%) 7,7 M; 1500 mg/L de $FeCl \times 4 H_2O$, 70 mg/l de $ZnCl_2$, 100 mg/L de $MnCl \times 4 H_2O$, 6 mg/L de H_3BO_3 , 190 mg/L de $CoCl_2 \times 5 H_2O$, 2 mg/L de $CuCl_2 \times 2 H_2O$, 24 mg/L de $NiCl_2 \times 6 H_2O$, y 36 mg/L de $NaMoO_4 \times 2 H_2O$ y H_2O destilada hasta 1 L.

Por último, la Solución de Vitaminas se compuso de 40 mg/L de 4-aminobenzoato, 10 mg/L de D (+)-Biotina, 100 mg/L de Ácido nicotínico, 50 mg/L de Ca-D(+)-pantotenato, 150 mg/L de Piridoxamina dihidrocloruro, 150 mg/L de Tiamina dicloruro y 100 mg/L de Cianocobalamina.

Durante este estudio se utilizaron diferentes fuentes de carbono en función de la finalidad del medio. Generalmente se usó medio LB líquido, a una dilución 1:10, pero también se realizaron ensayos con glucosa 25 mM y sacarosa al 10%.

El cultivo de estas cepas durante todo el estudio fue en condiciones aeróbicas, a una temperatura de 30°C y en oscuridad, y se utilizaron dos condiciones de aireación, el cultivo estático y la agitación a 75 rpm.

Tabla 4. Antibióticos utilizados durante el cultivo de las diferentes cepas bacterianas.

Antibióticos	Concentración del stock (mg/mL)
Ampicilina (Ap)	100
Clicoheximida (Chx)	50
Espectomicina (Sp)	100
Estreptomicina (Sm)	50
Gentamicina (Gm)	100
Kanamicina (Km²⁵)	25
Nalidíxico (Nal)	10
Rifampicina (Rif)	10
X-gal	20

3.4 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

Tras la selección de los mutantes de interés se continuó el estudio mediante la identificación de los genes mutados. Para esto se utilizaron los siguientes procedimientos propios de la biología molecular:

3.4.1 Extracción de ADN genómico

Se aisló el ADN genómico tanto de las cepas silvestres de *Starkeya* como de los mutantes seleccionados. Para esto se partió de un cultivo de 10 mL con medio W LB 1:10 Nal/Km⁶, incubado a 30°C durante 7 días, y se recolectó toda la biomasa bacteriana mediante centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm, en una centrífuga Allegra™ 21R (Beckman Coulter). Para el aislamiento del ADN genómico se utilizó el Kit comercial ADN Purification Kit de la casa comercial Promega, siguiendo el protocolo de extracción indicado por el fabricante.

3.4.2 Extracción de ADN plasmídico

Los plásmidos utilizados durante este trabajo se aislaron partiendo de 3 mL de cultivo en medio LB suplementado con los antibióticos de selección. La biomasa bacteriana se recolectó mediante centrifugación a 14000 rpm en una microcentrífuga Hettich Mikro 120. Para la extracción de los plásmidos se utilizó el Kit comercial NZY® MiniPrep, de NZYTECH siguiendo la metodología establecida por el fabricante.

3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa

Las diferentes muestras de ADN se visualizaron en geles de agarosa al 0,8 % (p/v) o 1,5% (p/v), en función del tamaño del fragmento de ADN, en una solución Tris/Acetato/EDTA (TAE), en cubetas horizontales (BioRad), utilizando como patrones de peso molecular los marcadores comerciales de 100 pb y 1 Kb LadderRTU (Nippon Genetics). Los geles se corrieron entre 90-100 Voltios durante 30-60 minutos en base a la magnitud del fragmento de ADN a visualizar. Después los geles se tiñeron en bromuro de etidio y se revelaron las bandas a través de un transiluminador (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad).

3.4.4 Restricción de ADN

Se realizaron restricciones tanto de ADN genómico como de ADN plasmídico, en todos los casos esta reacción se realizó en un volumen total de 20 µl. Se adicionaron 2 µl de buffer de restricción, 1 µl de enzima de restricción, y el volumen de ADN utilizado dependió de la concentración extraída; para la restricción de ADN genómico se adicionaron 15 µl; mientras que para la restricción del plásmido pBlueScriptII RK⁺ se utilizaron 3 µl y para los plásmidos pKNG110 y pJB3Ap 16 µl.

Las enzimas utilizadas fueron SacI, Sall, ApaI, SpeI, BamHI y XbaI, todas adquiridas de la casa comercial New England Biolabs. El buffer de restricción utilizado en todos los casos fue rCutSmart proporcionado por la misma casa. Todas las restricciones se incubaron a 37°C durante 2 h y fueron inactivadas a 65°C durante 20 minutos

3.4.5 Ligación de ADN

Los fragmentos de ADN genómico mutado se ligaron con el ADN plasmídico linealizado. Las ligaciones se realizaron utilizando la ADN ligasa del fago T4 de Roche. Esta reacción se realizó en un volumen final de entre 10 y 13 µl, se adicionó a la mezcla 1 µl de Buffer de ligación 10X (Roche), 1 µl de ligasa, 1 µl de ADN plasmídico linealizado y un volumen variable de ADN cortado, entre 7 y 10 µl.

La reacción de ligación se incubó durante O/N a 4°C para ser utilizada posteriormente en la transformación de células competentes.

3.4.6 Transformación de células competentes

Las ligaciones y los diferentes plásmidos diseñados en este estudio fueron introducidos mediante transformación por choque térmico en células competentes de *E. coli* DH5 α para clonar el vector pBlueScriptII SK⁺; *E. coli* cc118 λ pir para el plásmido pKNG 101; y *E. coli* cc118 para clonar pJB3Ap.

Para transformar las células de *E. coli* se adicionaron 10 μ l de la ligación realizada previamente a 100 μ l de células competentes, homogenizando con suavidad y manteniendo en hielo durante 30 minutos. Después se sometieron a choque térmico, llevándolas primero a un baño a 42°C durante 42 segundos y seguidamente poniéndolas en hielo 2 minutos. Tras esto, se adicionaron 900 μ l de medio SOC, solución compuesta por medio SOB (20 g/L BactoTryptona, 5 g/L extracto de levadura, 0,585 g/L NaCl, 0,185 g/L KCl y 2 mL de MgCl₂ 2M) suplementado con glucosa 20 mM. Después se incubaron durante 60 minutos a 37°C y en agitación a 200 rpm. Por último, se sembraron primero 100 μ l de la transformación y después se concentró la biomasa bacteriana mediante centrifugación a 14000 rpm 1 min, eliminando el sobrenadante y sembrando el resto mediante perlas de vidrio en placas de medio LB sólido suplementado con los antibióticos requeridos en cada selección.

Para la selección de las células transformadas con pBlueScriptII SK⁺ ligado al ADN mutado, el medio fue suplementado, además de con ampicilina, con estreptomina y espectomicina. Para seleccionar las células transformadas con pKNG101 se suplementó el medio con estreptomina y para la selección de la transformación con pJB3 se adicionó ampicilina a la placa.

3.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de ADN se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las polimerasas usadas en este trabajo fueron la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) de Roche y la *Q5 High-Fidelity ADN Polymerase* de New England Biolabs (Tabla 5).

Tabla 5. Composición de la mezcla de reactivos para la reacción de PCR.

Reactivos para PCR convencional		Reactivos para PCR <i>Q5 Polymerase</i>	
10X PCR Buffer (Roche)	2 µl	5X Q5 Buffer	4 µl
DMSO	0,6 µl	5X Q5 GC enhancer	4 µl
Taq Polimerasa (Roche)	0,08 µl	Q5 Polymerase (NEB)	0,08 µl
(5 U/µl)		(5 U/µl)	
dNTPs (10 µM)	0,2 µl	dNTPs (10 µM)	0,2 µl
ADN molde	2 µl	ADN molde	2 µl
Primer Forward (10 µM)	0,4 µl	Primer Forward (10 µM)	0,4 µl
Primer Reverse (10 µM)	0,4 µl	Primer Reverse (10 µM)	0,4 µl
Agua MiliQ	14,32 µl	Agua MiliQ	8,92 µl

El ADN molde proviene de ADN extraído previamente o de colonias bacterianas resuspendidas en H₂O MiliQ.

El esquema general de los programas de PCR utilizados durante este trabajo fue el siguiente: primero ocurre la fase de desnaturalización durante 30 segundos a 95°C para la Taq de Roche y 98°C para la Q5 de NEB. La segunda fase consta de tres etapas que se repiten durante 30 ciclos. En la primera etapa ocurre la desnaturalización de las cadenas de ADN, durante 30 segundos a 95°C para la Taq y durante 10 segundos a 98°C para la Q5. Después continua la fase de anillamiento, a una temperatura que varía en función de los oligonucleótidos utilizados (ver Tabla 6), durante 20 segundos. Finalmente llega la fase de anillamiento a 72°C, con un tiempo de elongación de 1min/Kb para la Taq y de 30 s/Kb para la Q5. Tras los 30 ciclos llega la última fase de elongación a 72°C durante 7 minutos para la taq y 2 minutos para la Q5. Tras finalizar la reacción de PCR llega la fase de enfriamiento a 16°C para conservar el producto de PCR.

3.4.8 Determinación de la T_m de los oligonucleótidos.

Para los nuevos oligonucleótidos diseñados durante este trabajo primero se realizó una PCR de gradiente para determinar su temperatura de anillamiento o melting (T_m). Se realizaron PCRs con un gradiente diferencial de temperaturas de anillamiento (Tabla 6), utilizando como ADN molde el ADN genómico de *Starkeya* sp. STN1B extraído previamente, y la *Q5 High-Fidelity ADN Polymerase*.

Tras realizar la PCR, los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y las bandas de ADN amplificado se revelaron como se indica en el apartado 3.4.4. La temperatura de anillamiento adecuada para cada par de oligonucleótidos fue

seleccionada en función de la especificidad y la intensidad de las bandas observadas (Tabla 6).

Tabla 6. Parejas de oligonucleótidos junto con el gradiente de temperatura estudiado y la T_m seleccionada para operar las PCRs.

Par de oligonucleótidos	Gradiente de temperatura	T_m
SobreLexA.FOR - SobreLexA.REV	63°C – 70°C	62°C
pKNGLexA1.FOR - LexA1.REV	60°C – 72°C	72°C
LexA2.FOR - pKNGLexA2.REV	60°C – 72°C	62°C

3.4.9 Purificación de producto de PCR

Con el fin de limpiar los productos de PCR para poder utilizarlos en procedimientos posteriores se utilizó el Kit QIAquick Gel Extraction kit (250) de la casa comercial QIAGEN siguiendo el protocolo de purificación de PCR proporcionado por el fabricante.

3.4.10 Cuantificación de la concentración de ADN

Para saber con exactitud cuánto producto de PCR se amplificó se midió la concentración de ADN mediante el fluorímetro Qubit de Invitrogen. Esta técnica se basa en el uso de la sonda HF que posee una alta afinidad por el ADN. La reacción se realizó como indica la casa comercial, adicionando 2 µl del ADN a cuantificar. La medida se realizó cuantificando la emisión de fluorescencia por el ADN y calculando su concentración en µg/µl.

3.5 Mutagénesis al azar

Se realizó una mutateca para cada cepa de *Starkeya* sp. mediante mutagénesis al azar insertando el mini-transposón Mini-Tn5-ΩSm-Sp (de Lorenzo et al., 1990), que confiere resistencia a estreptomycin y espectomicina. La mutagénesis se realizó a través de conjugación triparental, para la que se utilizaron tres cepas bacterianas: cepa donadora (D), dos cepas receptoras (R) y una cepa *Helper* (H). La cepa donadora utilizada fue *Escherichia coli* cc118 λpir (pUT Sm|Sp), que posee un vector suicida mutagénico pUT-O|Sm/Sp, con un gen que confiere resistencia a antibióticos. Las cepas receptoras mutadas fueron STN1A y STN1B. La cepa *Helper* utilizada fue *E. coli* cc118 ρRK600, que facilita la inserción del Mini-Tn5 en las cepas receptoras.

Primero se prepararon los preinóculos de cada bacteria en sus respectivos medios suplementados con los antibióticos a los que presentan resistencia. Las cepas de *E. coli*

se incubaron O/N a 37°C y en agitación a 200 rpm, mientras que las cepas receptoras se incubaron en matraces estáticos a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica final de 0,1. Se recogió la biomasa mediante centrifugación durante 15 minutos a 9000 rpm, 25 mL de las cepas receptoras y 0,5 mL de las cepas donadoras y *helper*. Todas las cepas se lavaron con Widdel 1X 2 veces para eliminar los antibióticos, y posteriormente se mezclaron y depositaron en filtros de celulosa (GSTF) estériles de 0,22 µm sobre placas con medio LB sólido.

Tras incubarlas O/N a 30°C se recolectaron los filtros con las células y resuspendieron en 3 mL de Widdel 1X. Se realizaron diluciones seriadas de la mezcla (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y se inocularon en placas con medio WMM LB 1:10, suplementado con los antibióticos ácido nalidíxico, kanamicina, más estreptomycinina y espectinomicina para la selección de aquellas células que hubieran incorporado el transposón. También se inocularon las cepas por separado como controles negativos. Los mutantes generados se aislaron y conservaron a -80°C en placas multipocillo con glicerol al 30% como agente crioprotector.

3.6 Métodos de selección de mutantes

En investigaciones anteriores se obtuvo una mutateca de *Starkeya* sp. STN1A y *Starkeya* sp. STN1B con aproximadamente 900 mutantes, estos se analizaron y seleccionaron mediante tres métodos de cribado.

3.6.1 Screening con calcoflúor

Primero se estudió la producción de celulosa, para esto se sembraron los mutantes desde la placa multipocillo con glicerol -80°C mediante un replicador de 45 pins que dejaban un inóculo de 5 µl. El medio utilizado fue WMM modificado utilizando glucosa 25 mM como fuente de carbono y adicionando 500 µl de calcoflúor White (CF, *Fluorescent Brightener 28*, MP Biomedicals) por cada 25 mL de medio. Este compuesto fue preparado en agua destilada a una concentración final de 5 mg/mL. Para revelar la producción de celulosa se observaron las colonias de los mutantes con luz ultravioleta en un transiluminador.

3.6.2 Screening con rojo Congo

El segundo *screening* se realizó con el fin de estudiar la morfología de las colonias de los mutantes y observar la producción de diferentes exopolisacáridos. Este cribado se realizó modificando el medio inicial mediante la adición de 0,45 mL de rojo Congo (*Congo red*,

CR, SIGMA) por cada 45 mL de medio. Este compuesto fue diluido en agua destilada obteniendo una concentración del 0.8% (v/p), siguiendo el método de Kaiser *et al.*, 2013. Para esta selección se utilizaron como fuentes de carbono glucosa 25 mM y sacarosa al 10%. Esta selección se operó de la misma forma que el anterior.

3.6.3 Screening de producción de N-acil homoserina lactonas

Finalmente, se realizó un *screening* para estudiar la producción AHLs en los mutantes generados. Para este cribado se puso a punto un nuevo método para detectar en medio líquido la producción de estas moléculas señal. Se cultivaron los mutantes en placas multipocillo con 200 µl medio líquido WMM con glucosa 25 mM, como fuente de carbono, y 100 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) por cada 100 mL de medio, sin la adición de antibióticos. Los mutantes se inocularon desde el glicerol, siguiendo el mismo procedimiento que en los métodos de selección anteriores. Tras 48 horas y haber observado el crecimiento de los mutantes por la presencia de turbidez en el medio, se inoculó la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTR4.

Los mutantes escogidos se nombran por un código de letras y números: primero se indica de qué cepa silvestre parte el mutante: A en el caso de ser de la mutateca de STN1A, y B cuando el mutante parte de la cepa silvestre STN1B. Después se indica el número de la placa de 96 pocillos donde se encuentra almacenado el mutante, numeradas desde el 44 al 53. Finalmente se indica tras un guion la posición dentro de la placa donde se encuentra el mutante, desde la 1 a la 96. Mediante este código se identifican los mutantes durante el trabajo.

3.7 Caracterización fenotípica de mutantes

3.7.1 Estudio de la morfología de colonia

Para el estudio fenotípico de los mutantes seleccionados se observó la morfología de colonia en el Estereomicroscopio Epifluorescencia Leica M165FC acoplado a una cámara digital de alta resolución, de la Estación Experimental del Zaidín, Granada. Para esto se inocularon gotas de 5 µl en placas con medio WMM glucosa 25 mM, modificado adicionando rojo Congo y calcoflúor.

La morfología de las colonias se observó con luz de campo claro en placas con rojo Congo y las placas con calcoflúor mediante campo claro y epifluorescencia con un filtro de luz UV, de excitación a 340 – 380 nm y emisión 510 LP.

3.7.2 Caracterización del crecimiento de mutantes

Se escogieron tres mutantes para realizar curvas de crecimiento y comparar su comportamiento con la cepa silvestre. Se partió de un preinóculo de cinco días en medio WLB 1:10, se recolectó la biomasa mediante centrifugación, igualando la densidad óptica para todos los cultivos a 0,1. Se realizaron tres réplicas por cepa, inoculando tres matraces con 125 mL de medio WMM glucosa 25 mM.

Se cogió muestra tres días por semana, durante 21 días para medir la densidad óptica mediante espectrofotometría (*Shimadzu UV-1800 UV spectrophotometer 190-1800 nanometers*) en cubetas de poliestireno expandido (EPS) de 1 mL, a 660 nm, y analizar el consumo de glucosa mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Para ello se utilizó el equipo *Agilent technologies 1260 Infinity II* con una columna para la detección de carbohidratos (*Metrosep Carb 2*, dimensiones $150 \times 4 \text{ mm}$ y $5 \mu\text{m}$ de diámetro de partícula) acoplada a un módulo de detección *945 Professional Detector Vario Metrohm*. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C, como fase móvil se usó 100 mM de NaOH y 10 mM de acetato sódico, el flujo fue de 0,5 mL/min y se inyectó un volumen de muestra de 10 μl . Todas las muestras fueron previamente filtradas con filtros de naylon 0,22 μm , y diluidas hasta una dilución 1:25 para obtener una concentración dentro del rango de la curva patrón, preparada de 10 a 300 ppm de glucosa.

3.7.3 Producción de celulosa en placa

Con el fin de estudiar y caracterizar la producción de celulosa bacteriana de los diferentes mutantes seleccionaron 10 en base a la morfología de colonia y la capacidad de producción de celulosa incrementada o reducida. Estos se inocularon en un Medio Modificado (Tabla 7) para conseguir la superproducción de BCN.

Se partió de un preinóculo de 15 días en 125 mL de WMM LB 1:10, cultivado a 30°C en estático. Los cultivos se concentraron de forma que todas las cepas tuvieran una absorbancia final de 0,04 para estandarizar los inóculos. Tras recolectar el cultivo se inocularon cuatro réplicas de cada cepa en placas Petri con 30 mL de medio modificado, también se cultivaron las cepas silvestres STN1A y STN1B como controles para comparar la producción de BC y dos placas sin inocular como controles del medio.

Se incubaron a 30°C en estático durante 40 días, y se tomó muestra del medio antes de ser inoculado y de todas las placas al finalizar el experimento para medir y comparar el consumo de glucosa en función de la celulosa producida.

Tabla 7. Composición del medio modificado para la producción de celulosa.

Reactivo	Volumen para 100 mL
Widdel 25X	4 mL
NaSO₄ (0,1 M)	3 mL
KNO₃ (0,8 M)	1,25 mL
NH₄ (2 M)	200 µL
(P)Na (0,5 M)	6 mL
Glucosa (50 mM)	2,5 mL
SL-10	200 µL
Se/Wo	300 µL
Vitaminas	150 µL
H₂O	Hasta 100 mL

Tras 40 días las placas con celulosa fueron recogidas y el polímero fue sometido a un proceso de lavado y secado. De las cuatro réplicas, tres de ellas fueron tratadas con KOH 1% y en agitación suave a 50 rpm, y posteriormente lavadas con agua hasta alcanzar un pH neutro para luego ser secadas a 37°C durante tres días tras los que fueron pesadas. La cuarta réplica fue tratada durante 2 horas con NaOH hervida a 100°C y posteriormente lavada con agua para llevarla a pH neutro y liofilizada para futuras caracterizaciones.

3.7.4 Producción de AHLs en placa

Para este ensayo, primero se prepararon placas Petri con 30 mL de medio WMM LB 1:10 y suplementado con 30 µL de X-gal. Se sembró la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4 sobre el agar crecida 48 h en LB. Tras esto se realizaron pocillos en el agar con el extremo de una punta de una pipeta de 1ml estéril. En estos pocillos se inocularon 100 µl de cultivo de cada mutante crecido en medio WMM LB 1:10 y sin antibióticos. Como control positivo de la producción se inocularon las cepas silvestres, además en cada placa se realizó un pocillo extra inoculado con H₂O destilada estéril como control negativo. Estas placas se incubaron a 30°C durante 24 horas, tras las que se evaluó la presencia de coloración.

3.8 Identificación de la inserción del Mini-Tn5 y secuenciación de ADN

Para determinar la secuencia del genoma mutado por la inserción del transposón, se clonó el fragmento de ADN portador del casete de resistencia Sm/Sp en el plásmido pBlueScriptII SK⁺. Tanto el ADN genómico de los mutantes como el plásmido se cortaron con SacI o Sall (que no presentan sitio de corte en el interposón) y tras su ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α .

De los clones resistentes a Sm/Sp/Ap se extrajo el plásmido y este se secuenció mediante la técnica Sanger, utilizando los oligonucleótidos Sm-SpF(1)Re y Sm-Sp final Re (Tabla 3), para identificar el sitio de inserción del transposón. La secuenciación se llevó a cabo por los servicios técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, en Granada.

Las muestras se prepararon con 2 μ l del plásmido a secuenciar; 0,7 μ l de cada oligonucleótido y H₂O MiliQ hasta completar un volumen total de 12 μ l. Por muestra se prepararon dos secuencias independientes, cada una con uno de los oligonucleótidos. Las secuencias obtenidas posteriormente se ensamblaron y analizaron mediante análisis bioinformáticos (ver apartado 3.10).

3.9 Mutación dirigida y complementación del mutante al azar

Para resolver el mutante generado al azar, *lexA*, se utilizó la técnica *In-Fusion Cloning*, de Takara Bio, con el kit In-Fusion[®] Snap Assembly Master Mix. Este kit permite la clonación direccional de uno o múltiples fragmentos de PCR, en cualquier vector linealizado. Es una técnica independiente de ligación que se basa en el anillamiento de extremos complementarios entre los fragmentos de PCR y el vector. Esta técnica se utilizó tanto para la generación del mutante limpio *lexA*, como para la complementación del mutante en *lexA* inicial.

3.9.1 Generación mutante *lexA*

Para la generación de la mutación dirigida por delección del gen *lexA* (Fig. 8) mediante clonación *In-Fusion* se diseñaron oligonucleótidos específicos con el programa SnapGene versión 6.2.2 (pKNGLexA1.FOR - LexA1.REV y LexA2.FOR - pKNGLexA2.REV), para la amplificación de dos fragmentos. Se utilizó el plásmido pKNG 101, como vector de clonación, linealizado con las enzimas de restricción ApaI y SpeI.

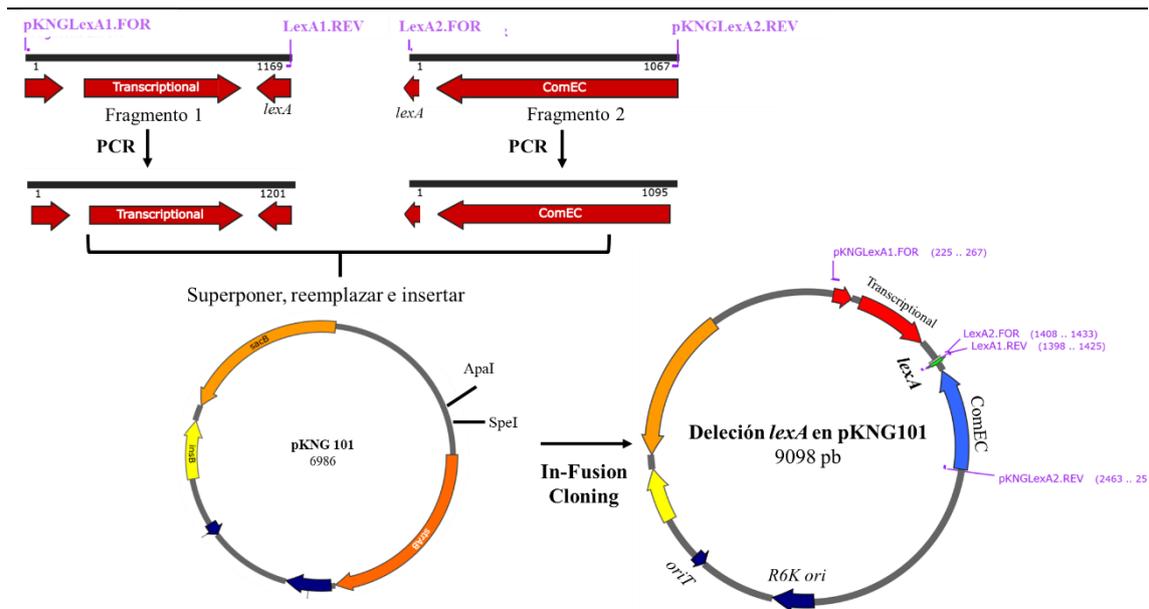


Figura 7. Esquema del proceso de generación del mutante *lexA* por delección del gen. Construcción del solapamiento e inserción de los fragmentos del genoma de *Starkeya* sp. STN1B en el vector de clonación pKNG 101.

Para esta reacción mediante el calculador de la ratio molar de Takara Bio se calcularon las concentraciones necesarias en función de los tamaños de ADN a ligar y la concentración de ADN amplificado y plásmido extraído. Se adicionaron a un volumen total de 20 μ l: 10 μ l del vector pKNG 101 linealizado, 1 μ l del Fragmento 1 amplificado por PCR, 5 μ l del producto de PCR del Fragmento 2 y 4 μ l de 5x In-Fusion Snap Assembly Master Mix. La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a 50°C y después se transformaron 5 μ l de la ligación en células competentes de *E. coli* cc118 λ pir. Para seleccionar aquellas en las que se hubiera insertado correctamente el plásmido se utilizó medio LB Sm⁵⁰.

Tras 24 horas se observó si la transformación fue efectiva chequeando los clones obtenidos mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos 3-pK y 5-pK, y utilizando como control positivo el plásmido diluido 1:100. De los clones positivos se extrajo el plásmido y se cortó con las enzimas utilizadas anteriormente para comprobar si el tamaño del inserto coincidía con el tamaño del fragmento de la PCR. Después, mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos 3-pK, 5-pK, LexA1.REV y LexA2.REV, se comprobó que los insertos en el plásmido correspondían al gen de interés.

3.9.2 Complementación mutante *lexA*

La complementación del mutante se realizó mediante la sobreexpresión del gen *lexA* en el mutante al azar B49-64. Esto se hizo al igual que la generación del mutante *lexA*, mediante clonación *In-Fusion* (Fig. 9). Para esto se utilizaron los oligonucleótidos SobreLexA.FOR - SobreLexA.REV que amplifican el gen *lexA*. El vector de clonación utilizado fue pJB3Ap linealizado con las enzimas de restricción BamHI y XbaI.

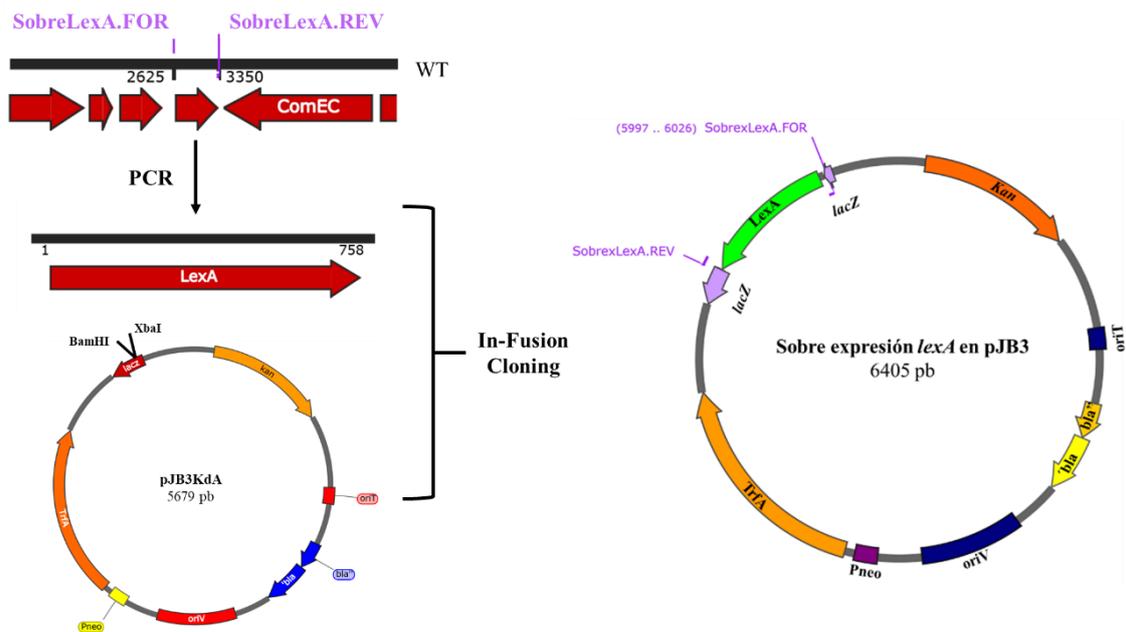


Figura 8. Esquema del proceso de complementación del mutante B49-64. Sobreexpresión del gen *lexA* en el vector de clonación pJB3Ap mediante clonación.

En esta reacción se usaron para un volumen total de 10 μ l: 4 μ l del vector de clonación pJB3Ap, 4 μ l del producto de PCR y 2 μ l de 5x In-Fusion Snap Assembly Master Mix. La reacción se incubó durante 15 minutos a 50°C y se transformaron 5 μ l de la ligación en células competentes de *E. coli* cc118. Para seleccionar aquellas colonias que hubiesen incorporado el plásmido correctamente se utilizó medio LB Ap.

Al igual que en el caso anterior para comprobar si la transformación se realizó de forma correcta se realizó PCR de colonias con los oligonucleótidos pJB3.for – pJB3.rev, usando como control positivo el plásmido diluido. Después al igual que en el caso anterior, de los clones positivos se extrajo el plásmido y se cortó con las enzimas utilizadas para comprobar si el tamaño del inserto coincidía con el fragmento de PCR. También la construcción se secuenció utilizando los oligonucleótidos Rev-21 y SobrelexA.REV, y se verificó que la inserción correspondía al gen de interés.

3.10 Análisis bioinformáticos y estadísticos

Para visualizar las secuencias de ADN se utilizó el programa ChromasPro versión 1.5. Después estas se analizaron para identificar los genes mutados mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Altschul *et al.*, 1990), utilizando como base de datos los genomas de las cepas *Starkeya* sp. STN1A y *Starkeya* sp. STN1B, disponibles en el laboratorio. A las secuencias se les realizó BLASTn para la búsqueda de secuencias homólogas en genoma de las cepas silvestres. Tras identificar el gen mutado se visualizó la secuencia en el genoma de las cepas silvestres mediante el programa Clone Manager suite 7, donde se anotaron las mutaciones identificadas. Con este programa junto con el software Genius Prime versión 2023.1.3 y el programa SnapGene versión 6.2.2 se estudió el entorno génico del gen mutado para analizar cómo pudo haber afectado la mutación a la expresión de los genes cercanos.

Por último, se utilizaron diferentes bases de datos: por un lado, se utilizó la base de proteínas UniProt (The UniProt Consortium, 2023) para identificar las proteínas mutadas, y para estudiar la estructura de aquellas que estuvieran caracterizadas se utilizó la base de datos AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021). Por otro lado, para analizar la relación entre los genes mutados y su entorno génico se utilizó la base de datos String (Szklarczyk *et al.*, 2023), la cual muestra una red de conexión entre el gen de interés y aquellos con los que interacciona. También se utilizó la plataforma KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa *et al.*, 2023) para estudiar las funciones de las proteínas mutadas y como podrían haber afectado a la ruta de síntesis de celulosa.

La nomenclatura de los genes utilizada durante este trabajo fue la usada para la cepa tipo, *Starkeya novella* DSM506, ya que es la que se encuentra de manera generalizada en las bases de datos empleadas en este trabajo. Cabe destacar que la cepa aislada en el laboratorio *Starkeya* sp. STN1B posee su propia identificación para los genes, pero se optó por la primera denominación para poder unificar y facilitar la búsqueda de información.

4. Resultados y discusión

4.1 Mutagénesis al azar de las cepas STN1A y STN1B

Para este trabajo se utilizó una colección de mutantes al azar disponibles en el laboratorio como base para la selección, y también se hizo una mutagénesis adicional de las cepas STN1A y STN1B para aumentar la colección de mutantes disponibles. Para comprobar la efectividad de las conjugaciones se sembraron en placa tres diluciones de cada conjugación mutagénica. Los resultados iniciales mostraron que la conjugación fue efectiva (Tabla 8), obteniéndose un mayor número de colonias en la conjugación de STN1A que en la de STN1B.

Tabla 8. Recuento de UFC/mL de las conjugaciones de las cepas silvestres tras su almacenamiento a -80°C (recuento final).

Conjugación	ΩSTN1A	ΩSTN1B	Controles
Recuento final (UFC/mL)	$1,8 \times 10^4$	$3,72 \times 10^3$	-

Durante investigaciones anteriores se comprobó que el almacenamiento de la conjugación en glicerol a -80°C evitaba la pérdida de conjugantes. Por lo que se almacenaron ambas conjugaciones y se inocularon en varias ocasiones durante el transcurso de este trabajo. El recuento final se calculó realizando la media de todas las eficiencias obtenidas cada vez que se sembraron las conjugaciones. Tras su almacenamiento y posterior siembra se obtuvo una media de $1,8 \times 10^4$ UFC/mL para la conjugación de STN1A y de $3,72 \times 10^3$ UFC/mL en la conjugación de STN1B. Estas cepas poseen un genoma de aproximadamente 4,3 Kb por lo que, con la eficiencia obtenida de esta conjugación, junto a la colección de mutantes disponible en el laboratorio, se podría cubrir la mutación de todos los genes de ambas cepas.

Las colonias obtenidas se aislaron y conservaron sus gliceroles en placas de 96 pocillos a -80°C y se incluyeron en la colección del laboratorio para ser analizadas posteriormente mediante los métodos explicados en este trabajo. También se utilizarán en el futuro para la selección de mutantes en nuevas funciones de interés, por ejemplo, el crecimiento en medio con CO_2 como única fuente de carbono.

4.2 Selección y caracterización fenotípica de mutantes de interés.

La colección de mutantes (mutateca) se sometió a un rastreo para identificar clones afectados en la capacidad de biosíntesis de celulosa, la morfología de colonia y la producción de moléculas señal (AHLs), utilizando los medios selectivos adecuados.

Para buscar mutantes afectados en la producción de celulosa (mutantes superproductores de celulosa o deficientes en su producción), se hizo un primer *screening* en medio sólido suplementado con calcoflúor (CF). EL CF posee afinidad por exopolisacáridos ricos en enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$, como los de la celulosa, por lo que tiene la capacidad de unirse específicamente a ella. Además, emite fluorescencia, por lo que permite identificar cepas productoras de celulosa mediante el revelado de la fluorescencia con luz UV (Herth and Schnepf, 1980). En el estudio de la mutateca se identificaron los siguientes tipos de colonias (Fig. 10): aquellas que emitían una fluorescencia similar o superior a la cepa silvestre STN1A, que se denominaron CF++. También se identificaron colonias con una fluorescencia menor y similar a la emitida por la cepa silvestre STN1B, y se denominaron CF+. Por último, se identificaron mutantes incapaces de producir celulosa y que por lo tanto no emitían fluorescencia, a los que se denominó CF-. Mediante este método en el primer cribado se escogieron 54 mutantes: 22 CF++, 19 CF+ y 13 CF-.

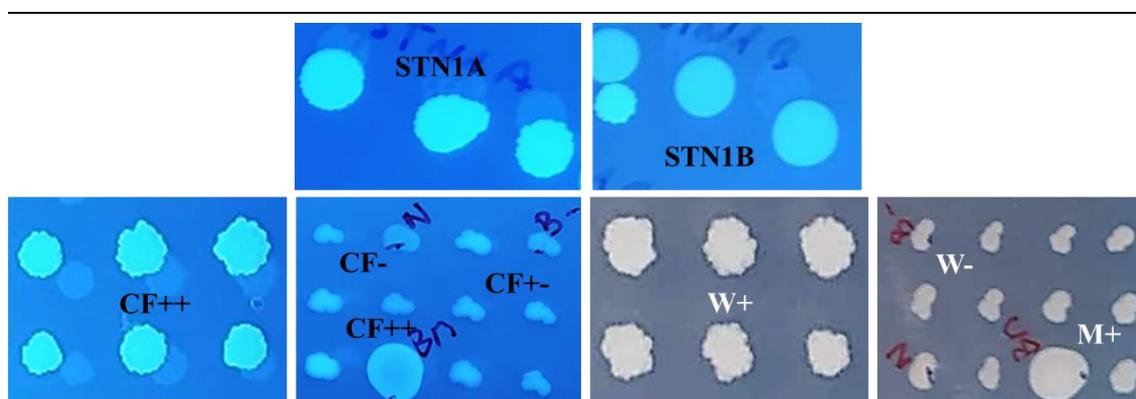


Figura 9. Colonias seleccionadas en medio con calcoflúor. Se muestran colonias de las cepas silvestres. Colonias de mutantes con elevado brillo y productoras de celulosa (CF++), colonias con un brillo menor (CF+) y colonias sin brillo no productoras de celulosa (CF-). También se muestran los tres tipos de morfología identificados, *wrinkle* (W+), lisas (W-) y mucosas (M+).

Durante el segundo *screening*, en medio con rojo Congo (CR), se seleccionaron los mutantes en función del color y morfología de colonia. El CR es un compuesto que posee afinidad por distintos tipos de compuestos extracelulares, como polisacáridos neutros o básicos e incluso algunas proteínas (Wood, 1980). Este método permite identificar

aquellos mutantes con la capacidad de producción de diversos EPS aumentada o reducida. Durante la selección de los mutantes se identificaron tres tipos de morfología de colonia (Fig. 11): colonias arrugadas y rojas oscuro, denominadas CR++, similares a la cepa parental STN1A. También se observaron colonias rojas que se denominaron CR+, y colonias mucosas de color anaranjado, rosa claro o blanco, que se nombraron CR-. Con este método se seleccionaron 82 mutantes: 36 CR++, 33 CR+ y 12 CR-

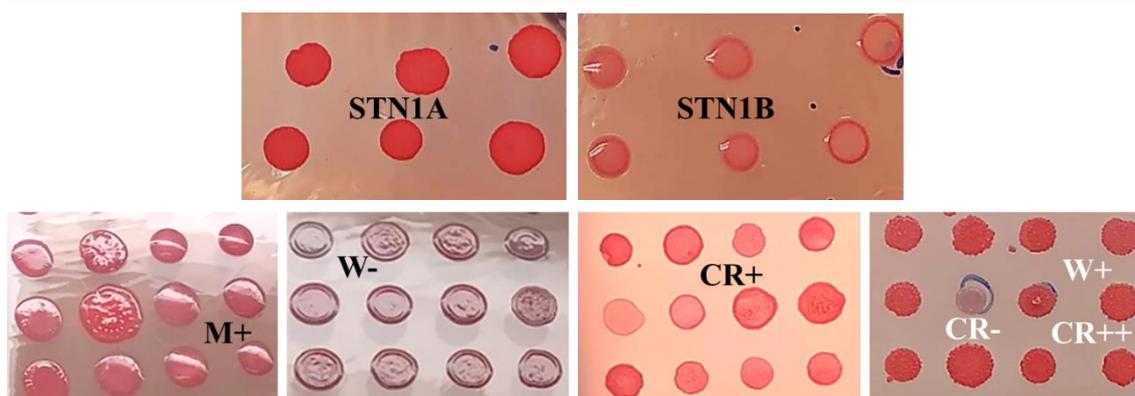


Figura 10. Colonias seleccionadas en medio rojo Congo. Se muestran colonias con rojo intenso (CR++), colonias rojo claro (CR+) y colonias blancas (CR-). También se muestran los tres tipos de morfología identificados, *wrinkle* (W+), lisas (W-) y mucosas (M+).

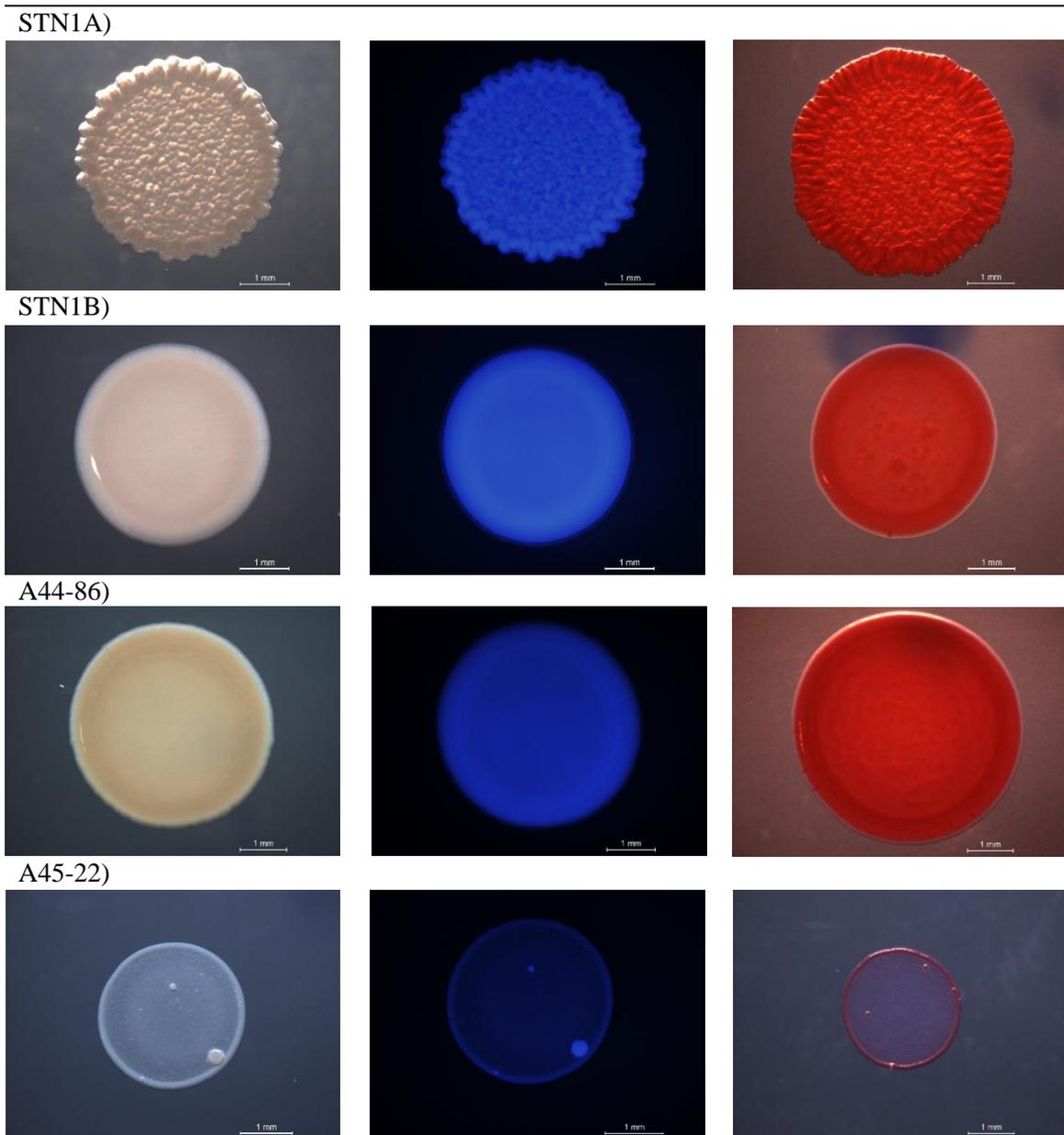
Por último, durante el tercer *screening*, utilizando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4, se seleccionaron mutantes en función de su capacidad o incapacidad de producción de AHLs de cadena media-larga. Se utilizó este biosensor ya que posee el sistema de *quorum sensing* bloqueado, por lo que no produce moléculas señal, pero si es capaz de detectar AHLs exógenas de cadena media-larga (8 a 12 carbonos). Posee un sistema de regulación que es capaz de degradar X-gal al detectar estas moléculas, dando lugar a un pigmento azul visible (Luo, Clemente and Farrand, 2001). Con este método se agruparon los mutantes en dos tipos: aquellos productores de AHLs, a los que se identificó como AHL+, con la capacidad de producción incrementada respecto a las cepas silvestres, y mutantes incapaces de producir estas moléculas, a los que se nombró AHL-. De esta forma se seleccionaron 76 mutantes: 49 AHL+ y 27 AHL-.

Tras este primer cribado, los mutantes seleccionados se sembraron y limpiaron de posibles contaminantes en placas con medio CR y CF para estudiar la morfología de colonia. En este segundo cribado se observaron tres fenotipos (Fig. 10 y Fig. 11): colonias arrugadas (*wrinkle*) y opacas denominadas W+, similares a la cepa parental STN1A. Colonias lisas y planas, identificadas como W-, que coinciden con el fenotipo de la cepa

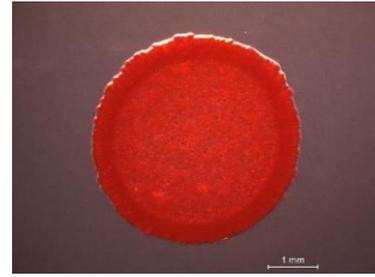
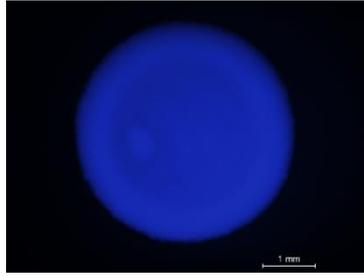
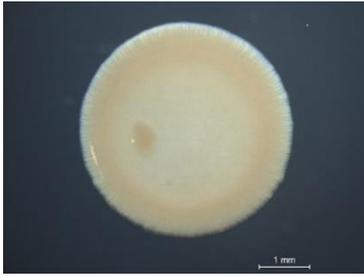
silvestre STN1B, y colonias grandes, convexas y mucosas, denominadas M+. Tras este segundo cribado se seleccionaron 10 mutantes: 2 mutantes de STN1A y 8 mutantes de STN1B.

4.2.1 Efectos de la mutación en la morfología de colonia

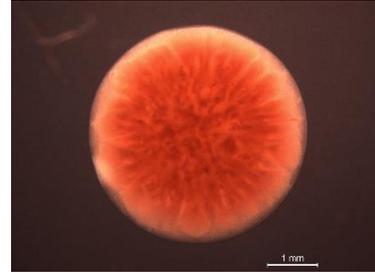
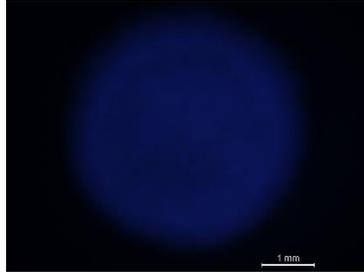
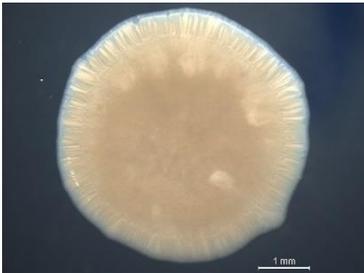
Para estudiar el efecto de la mutación sobre la morfología de colonia en los 10 mutantes seleccionados, se tomaron fotos tras 21 días de crecimiento en medio con CF o con CR (Fig. 12).



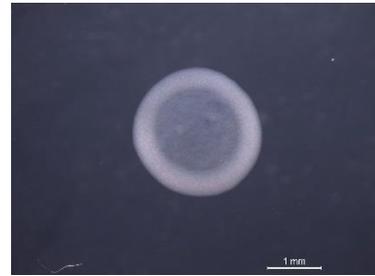
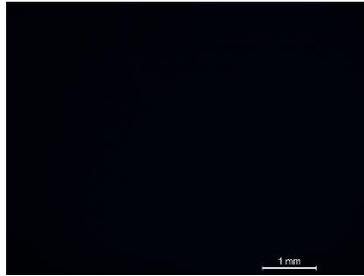
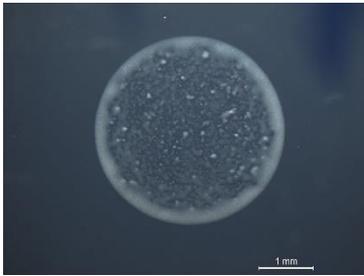
B49-16)



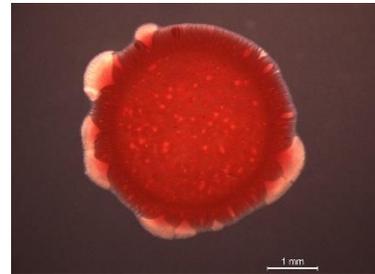
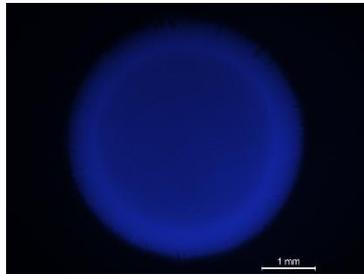
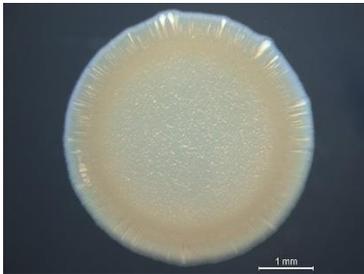
49-64)



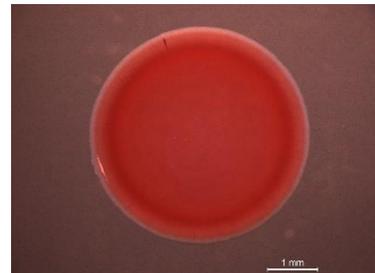
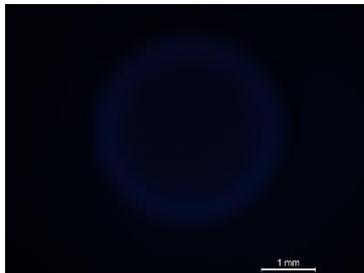
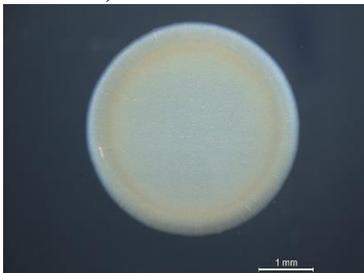
B50-59)



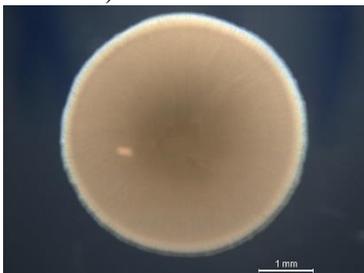
B50-82)



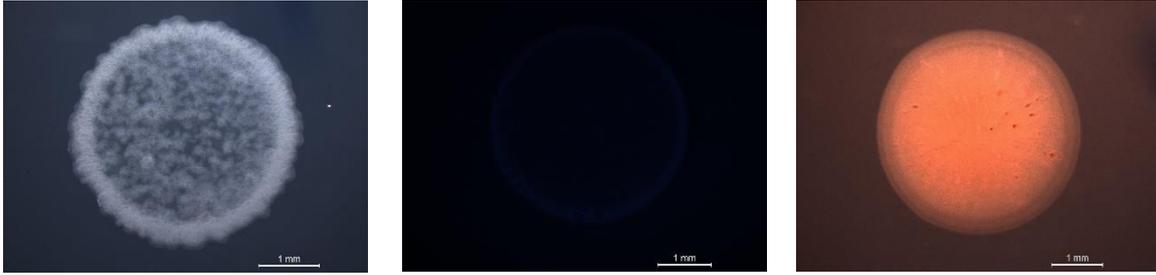
B51-22)



B51-85)



B52-19)



B53-19)

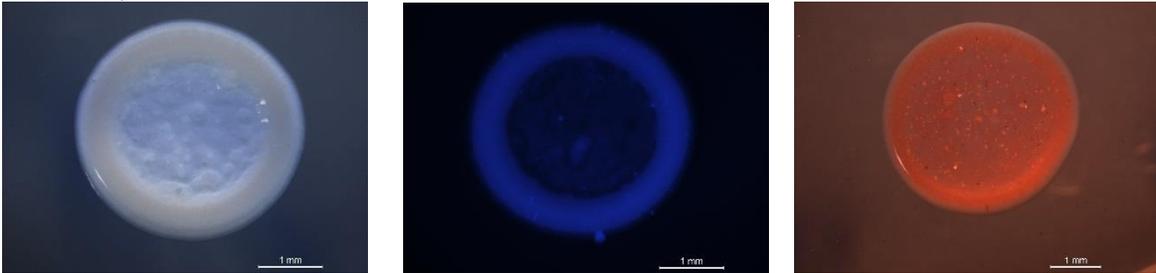


Figura 11. Fotografías de las colonias seleccionadas en medio W glucosa 25 mM (izq.), el mismo medio con calcoflúor (centro) y el mismo medio con rojo Congo (dcha.).

La cepa silvestre STN1A se caracterizó por tener una morfología rugosa (W+), provocada por la secreción abundante de celulosa al medio, presentando una coloración roja intensa (CR++), y en CF poseía un brillo azul muy intenso indicando la presencia de celulosa (CF++). En cambio, la cepa silvestre STN1B se presenta lisa y plana (W-), con una coloración roja menos intensa (CR+) y en CF brillaba con menor intensidad (CF+).

Pasando a las cepas mutantes, el mutante A44-86, a diferencia de la cepa silvestre de la que parte, su colonia era lisa y plana (W-), con una coloración roja intensa (CR++) y un brillo intenso (CF++). El segundo mutante seleccionado de esta cepa, A45-22, poseía un morfotipo que difiere completamente, transparente, con el borde más intenso (W-). Su colonia de color rosa (CR-) apenas poseía brillo (CF-). Continuando con los mutantes de STN1B, el mutante B49-16 tenía una morfología de colonia lisa en medio CF, aunque en medio CR presentaba rugosidad (W+), además presentaba una coloración roja intensa (CR++) y brillo azul (CF++). La morfología de la colonia del mutante B49-64 era convexa y mucosa (M+), poseía una coloración rosada con estrías de color blanco (CR-) y en CF tenía un brillo leve (CF+). El mutante B50-59 creció formando una colonia transparente de lento crecimiento (W-), en medio CR era blanca (CR-) y no brillaba al incidirle la luz UV (CF-). El mutante B50-85 poseía una morfología lisa, plana y brillante, con inicio de mucosidad (M+). En CR presentaba una coloración roja intensa (CR++) y en los bordes unas secreciones de color blanco, y emitía mucha fluorescencia (CF+). El

mutante B51-22 presentaba una colonia lisa y plana (W-), una coloración roja claro (CR+) y apenas poseía brillo (CF-). La colonia del mutante B51-82 era de gran tamaño, convexa, brillante y muy mucosa (M+), en CF poseía un brillo intenso (CF++), y en CR se observaba el centro de la colonia rojo muy intenso (CR++), del que partían estrías hacia los extremos. El mutante B52-19 presentaba una colonia semitransparente (W-), de color rosa claro (CR-) y en CF no presentaba brillo (CF-). Por último, la morfología de la colonia del mutante B53-15 era lisa y plana (W-), con los bordes engrosados, siendo estos los que presentaban brillo (CF+) y tenían una coloración roja más oscura (CR+).

4.2.2 Producción de celulosa por los mutantes

Durante la selección de los mutantes se estimó cualitativamente la producción de celulosa en medio sólido por la intensidad de la tinción con CF. Para poder cuantificar y comparar la biosíntesis de celulosa de los mutantes con respecto a sus parentales respectivos, se cultivaron en condiciones estáticas tres réplicas por cada cepa, en medio modificado W glucosa 50 mM Tras 40 días de crecimiento se secó y pesó el polímero (Fig. 13).

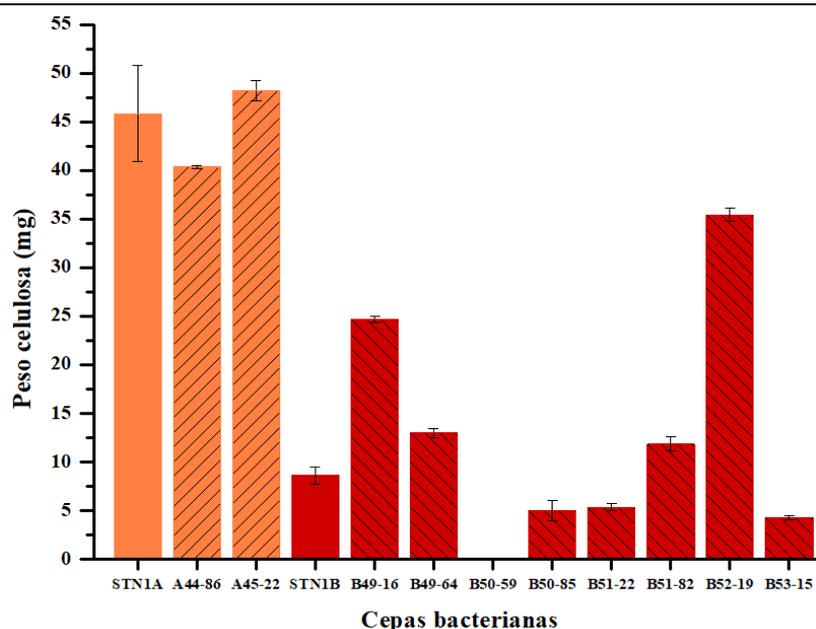


Figura 12. Peso seco (mg) de la celulosa bacteriana producida por las cepas silvestres y las 10 cepas mutantes seleccionadas en 30 mL de cultivo. Se muestra en naranja la cepa silvestre STN1A y los mutantes derivados de su conjugación; y en rojo oscuro la cepa silvestre STN1B y los mutantes derivados de su conjugación. Las barras rayadas muestran la producción por los mutantes.

Tanto la cepa silvestre STN1A como sus mutantes seleccionados fueron las cepas que tuvieron una mayor producción. Además, las tres mostraron una producción similar,

obteniendo $45,8\pm 4,9$ mg por la cepa silvestre, y $40,3\pm 0,2$ mg y $48,2\pm 1,0$ mg por las cepas mutantes A44-86 y A45-22 respectivamente.

Por otro lado, la cepa silvestre STN1B produjo $8,6\pm 0,9$ mg de celulosa, mientras que algunos de sus mutantes mostraron la producción de celulosa incrementada y otros reducida. Por un lado, los mutantes con una producción de celulosa superior fueron: B49-16, B49-64, B51-82, y B52-19 siendo el mutante en STN1B que más celulosa sintetizó, $35,4\pm 0,7$ mg. Pero ninguno de estos alcanzó la producción por la cepa STN1A ni la de sus mutantes. Por otro lado, los mutantes con una producción de celulosa reducida fueron: B50-59 siendo la única cepa incapaz de producir celulosa; B50-85, B51-22 y B53-15 de la que solamente se obtuvieron $4,3\pm 0,2$ mg.

Con estos resultados junto a los obtenidos en el estudio de la morfología de colonia y la emisión de fluorescencia en CF podemos resumir que: aquellos mutantes seleccionados y clasificados como CF-/CR- presentaban niveles de producción de celulosa inferiores a las cepas silvestres STN1A y STN1B o nulos. Mientras que los denominados como CF++/CR++ produjeron una cantidad similar a STN1A o mayor que STN1B. Lo que confirmaba como válido el método de selección para la identificación de mutantes superproductores o deficientes en producción de celulosa. Esto coincide para todos los mutantes, salvo para el mutante B52-19 el cual se identificó como CF-/CR- pero tuvo una producción de celulosa muy superior a la cepa silvestre STN1B.

Para continuar con el estudio de la celulosa producida por los mutantes, se congeló y liofilizó una cuarta réplica. Esto se realizó para poder caracterizar la celulosa en el futuro mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos-X (XRD).

4.2.3 Producción de N-acil homoserina lactonas por los mutantes en placa

De las diez cepas seleccionadas también se estudió en medio sólido la producción de AHLs. Los mutantes se sembraron junto a las cepas silvestres STN1A y STN1B como controles positivos y H₂O destilada estéril como control negativo.

En la mayoría de los mutantes se obtuvo una producción de AHLs similar a las cepas silvestres (Fig. S.1). Se clasificaron las cepas mutantes como AHLs++ si producían un halo azul similar al de las cepas silvestres, AHLs+ cuando el halo era de menor tamaño, y AHLs- si la producción era mínima o nula. Por un lado, se identificaron como AHLs++ los mutantes A45-22, B49-16 y B50-85. Por otro lado, los mutantes B49-64, B50-59,

B51-82, B52-19 y B53-15 produjeron un halo de menor tamaño que el de las cepas silvestres, y se designaron como AHLs+. Finalmente, el mutante A44-86 se identificó como AHLs- ya que produjo un halo mucho menor que el de su cepa parental (Fig 14).



Figura 13. Producción de AHLs en medio sólido por el mutante A44-86 y la cepa silvestre STN1A como control positivo y H₂O como control negativo.

Este ensayo permite visualmente identificar y comparar la producción de AHLs, pero no aporta un dato cuantitativo, por lo que en posteriores ensayos se procederá a cuantificar la producción de estas moléculas señal de *quorum sensing* del mutante deficiente en la producción de AHLs.

4.2.4 Caracterización del crecimiento de los mutantes seleccionados

De aquellos mutantes en los que se observó un crecimiento mayor o ralentizado en cultivo sólido se realizó una curva de crecimiento en medio líquido utilizando glucosa como fuente de carbono. Los mutantes seleccionados fueron B49-64, B50-59 y B52-19, y como control se cultivó la cepa silvestre STN1B.

Aunque la densidad óptica no proporcionaba un dato exacto, debido a que parte de la biomasa queda embebida en la celulosa, impidiendo ser recogida y cuantificada, en todos los matraces inoculados se observó crecimiento por un aumento en la producción de biomasa y celulosa, y el consumo de fuente de carbono (Fig. 15). En la caracterización del crecimiento de los mutantes (Fig. 15.A) se observó que tanto la cepa silvestre como el mutante B49-64 tuvieron un crecimiento similar, por lo que se piensa que la inserción del transposón en este mutante no tuvo ningún efecto en el crecimiento. Ambas tuvieron una fase de latencia inicial breve, tras las que llegaron al crecimiento exponencial y un mayor consumo de la fuente de carbono. Las dos cepas tuvieron su máximo crecimiento a los 8 días, cuando STN1B alcanzaba una OD de $1,03 \pm 0,08$ y B49-64 de $1,06 \pm 0,04$ de OD. Posteriormente llegaron a la fase estacionaria y su OD comenzó a reducirse. Por otro

lado, en el mutante B52-19 la fase de latencia se alargó hasta los 10 días, coincidiendo con el inicio del consumo de glucosa. Después su crecimiento aumentó entrando en la fase exponencial y llegando a tener un máximo de crecimiento similar al de su parental a los 21 días, con una OD de $1,07 \pm 0,04$. A tiempo final, este mutante no llegó a consumir totalmente la glucosa debido a que se puso fin al experimento antes de que esta cepa pudiera alcanzar su máximo crecimiento. Por último, el mutante B50-59 no fue capaz de crecer en medio líquido en el tiempo ensayado, sin apenas aumentar su OD tras ser inoculado. Tampoco se observó que esta cepa pudiera consumir la fuente de carbono, ya que durante la totalidad del ensayo los niveles se mantuvieron similares a la concentración inicial en el medio. Estos dos datos mostraron que probablemente la mutación generó un fenotipo deficiente para el crecimiento, ya que fue incapaz de utilizar la glucosa como fuente de carbono. Para comprobar si esta mutación afectó al crecimiento general o únicamente impide el uso de glucosa se estudiará su crecimiento utilizando otras fuentes de carbono.

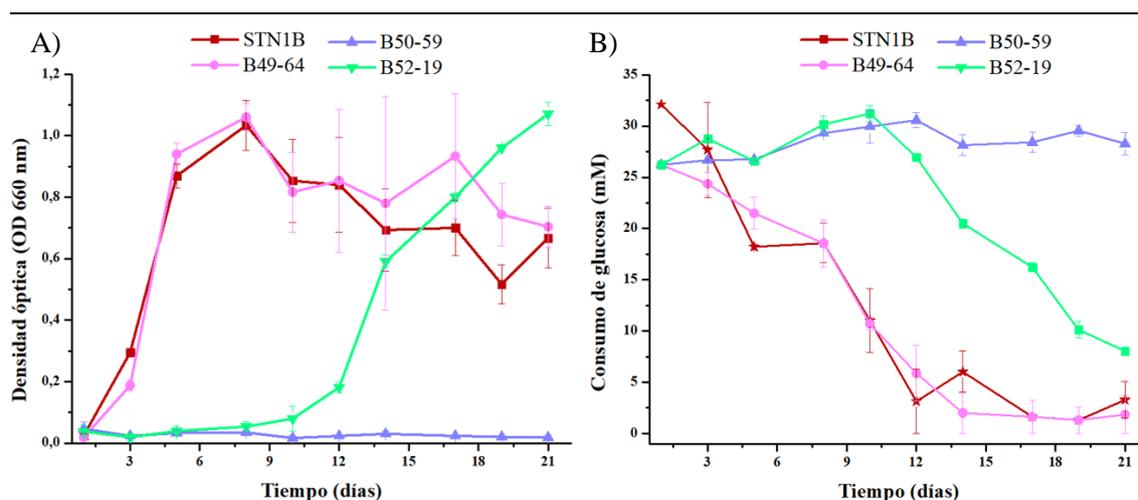


Figura 14. Cuantificación de densidad óptica y consumo de fuente de carbono de STN1B, B49-64, B50-59 y B52-19. A) Densidad óptica a 660 nm B) Consumo de glucosa.

4.3 Mapeo de los mutantes seleccionados

Para localizar los genes afectados por la inserción del transposón se clonó cada mutación en pBlueScriptSK+II como se explica en Materiales y Métodos y se secuenció el fragmento de ADN cromosómico insertado utilizando los oligonucleótidos Sm-SpF(1)Re y Sm-Sp final Re (Tabla 3), que leen desde el final del cassette de resistencia a estreptomicina hacia fuera, leyendo por tanto la región cromosómica donde se insertó el interposón. Por cada mutante se obtuvieron dos secuencias que, posteriormente mediante BLAST, utilizando como base de datos el genoma de las cepas silvestres STN1A y

STN1B se identificó el gen mutado y se localizó el punto exacto de inserción. Cabe destacar que la inserción del mini-transposón genera una duplicación de unas 14 pb en el punto de inserción. Para algunos mutantes, los resultados de secuencia obtenidos a cada lado de la inserción no fueron congruentes, al identificar dos zonas no directamente adyacentes en el genoma de la cepa. En esos casos, dado que las secuencias identificadas aun así eran muy cercanas en el genoma, los mutantes se consideraron mutantes de delección, a la espera de confirmar el lugar de inserción con una nueva clonación y secuenciación, que no se pudo llevar a cabo en este trabajo por falta de tiempo.

Se identificaron diferentes genes mutados y sus proteínas codificantes, que consideramos anuladas por la inserción del transposón (Tabla 9). En los mutantes A45-22, B50-85, B51-82 y B53-15 se obtuvieron secuencias idénticas. La secuencia obtenida por el oligonucleótido Sm-SpF(1)Re codificaba para el Transportador ABC de oligopéptidos o proteína de unión a sustrato (OppA), y la secuencia obtenida por Sm-Sp final Re pertenecía al gen codificante de la Bis-ABC ATPasa (Uup). Estos dos genes se encuentran separados en el genoma de las cepas silvestres por aproximadamente 1 Kb. Que el transposón se inserte en dos genes tan distantes y provoque fenotipos diferentes es poco probable, por lo que esto se puede relacionar con un error durante la manipulación de los mutantes y clonación de la mutación.

Tabla 9. Mutantes seleccionados, clonados y secuenciados junto con su fenotipo y la proteína que codifica el gen mutado.

Mutante	Fenotipo	Proteínas mutadas
A44-86	CF++ CR++ W-	Proteína con actividad diguanilato ciclasa
A45-22	CF- CR- W-	Transportador ABC de oligopéptidos o proteína de unión a sustrato (OppA) - Bis-ABC ATPasa (Uup)
B49-16	CF++ CR++ W+	Transpeptidasa transglicosilasa multimodular
B49-64	CF+ CR- M+	LexA, represor de la respuesta SOS con actividad autoproteolítica
B50-59	CF- CR-W-	Pseudouridina sintasa - Proteína de la familia patatina
B50-85	CF+ CR++ M+	Transportador ABC de oligopéptidos o proteína de unión a sustrato (OppA) - Bis-ABC ATPasa (Uup)
B51-22	CF- CR+ W-	Formilmetanofurano deshidrogenasa, subunidad A
B51-82	CF++ CR++ M+	Transportador ABC de oligopéptidos o proteína de unión a sustrato (OppA) - Bis-ABC ATPasa (Uup)

B52-19	CF- CR- W-	Triosafosfato isomerasa
B53-15	CF+ CR+ W-	Transportador ABC de oligopéptidos o proteína de unión a sustrato (OppA) - Bis-ABC ATPasa (Uup)

Para el mutante B49-16, una de las secuencias flanqueantes obtenida no se pudo alinear con el genoma de las cepas silvestres, por lo que sólo se analizó una de las secuencias flanqueantes, que se identificó como el gen codificante para una transpeptidasa-transglicosilasa multimodular. Para el mutante B50-59, se vio que las secuencias obtenidas pertenecían a genes distintos, por lo que no se pudo identificar el sitio concreto de inserción del interposón, pero sí se vio que se produjo entre dos genes contiguos, los cuales codifican para una enzima ARN pseudouridilato sintasa y una proteína de la familia patatina. Estos son dos de los casos en que se repetirá la clonación y secuenciación del mutante para confirmar el punto de inserción

Por último, se pudieron mapear correctamente cuatro mutantes en los que ambas secuencias se alinearon con un mismo gen y pudieron ser ensambladas. En el mutante A44-86 se mutó una diguanilato ciclasa. Para B49-64 las secuencias ensambladas se alineaban con el gen *lexA*. En el mutante B51-22 la mutación se encontraba en el gen codificante de la subunidad A de la enzima formilmetanofurano deshidrogenasa, y para el mutante B52-19 se identificó el sitio de inserción del transposón en el gen *tpiA*.

Los mutantes seleccionados presentaban fenotipos diferenciales respecto a la producción de celulosa en comparación a las cepas silvestres. Pero tras el análisis de los genes mutados se vio que la inserción del transposón se encontraba en genes con funciones muy diversas, y en ninguno de los mutantes seleccionados se encontraban afectados los genes esenciales de la ruta de síntesis de celulosa. Esto demuestra que para una correcta producción del polímero no solamente basta con la presencia íntegra del operón *bcs*, sino que también existen otros genes implicados en este proceso.

4.4 Análisis del entorno génico de los mutantes mapeados

De aquellos mutantes en los que se pudo mapear correctamente la inserción del transposón se estudió el entorno génico y la expresión de los genes de ese entorno, aprovechando datos de transcriptómica disponibles en el laboratorio, donde se comparan cultivos de STN1A y STN1B creciendo con glucosa como única fuente de carbono.

4.4.1 Mutante A44-86

El gen afectado en el mutante A44-86 codifica para una diguanilato ciclasa (DGC) (Snov_2223) (Fig. 16). Estas enzimas participan en la biosíntesis del segundo mensajero c-di-GMP y su actividad está asociada con el dominio proteico GGDEF (Ryjenkov *et al.*, 2005; Römling and Amikam, 2006).

El fenotipo de este mutante era CR++ CF++, W- y productor de celulosa, pero con una tasa menor a la cepa silvestre (Fig.12 y 13). Que la colonia no presentara las rugosidades características de la cepa WT puede explicarse por la mutación en la diguanilato ciclasa. Esta enzima sintetiza el segundo mensajero c-di-GMP, regulador alostérico de la celulosa sintasa (Ross *et al.*, 1987; Römling and Amikam, 2006). Es plausible pensar que haber mutado una de las enzimas que participan en la síntesis de c-di-GMP puede haber reducido los niveles de esta molécula. Como consecuencia es posible que el complejo *bcs* se encuentre menos activo y se reduzca la producción de celulosa. Además, esta cepa también se describió como AHL-; esta deficiencia en la producción de AHLs se puede explicar por un efecto pleiotrópico de la mutación en la DGC.

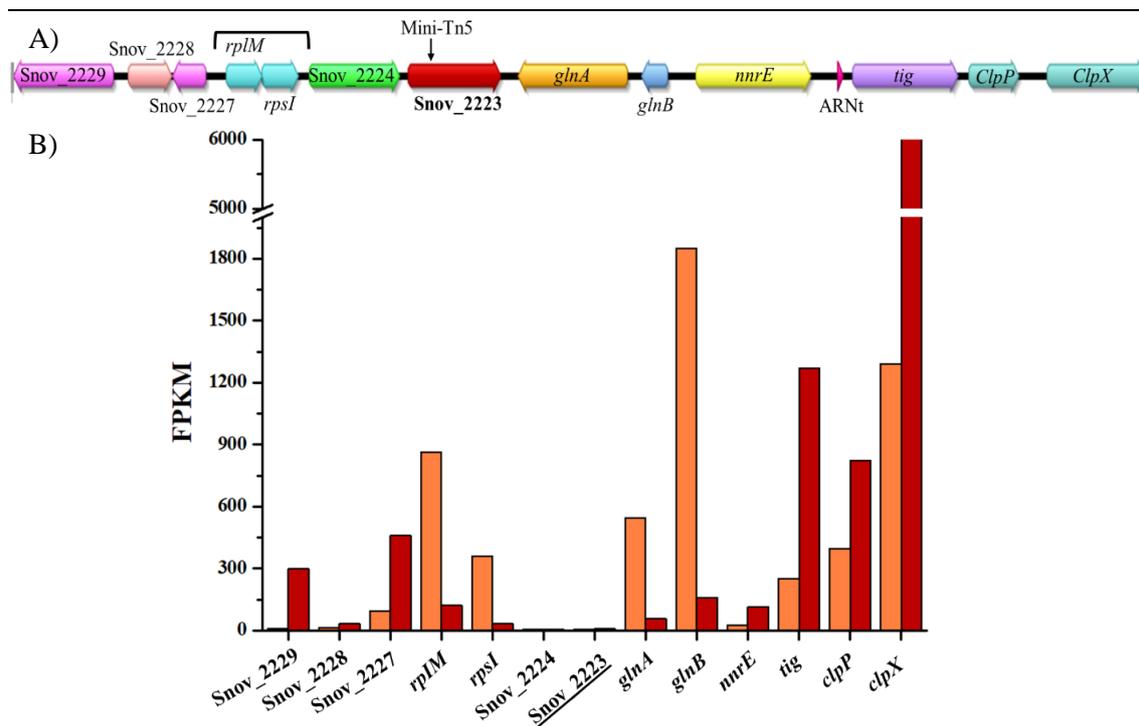


Figura 15. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante A44-86. A) Entorno génico del gen mutado Snov_2223 (granate) codificante para una diguanilato ciclasa. Cada color representa un gen independiente. La llave negra agrupa a los genes que forman un operón. B) Niveles de expresión (fpkm) de los genes cercanos a la mutación. En naranja se representan los valores de expresión para la cepa STN1A y en rojo oscuro los valores para la cepa silvestre STN1B.

Estudiando su entorno génico se vio que los genes cercanos al gen mutado poseían funciones muy diversas (Fig. 16.A). Junto a la DGC mutada se encuentra otra diguanilato ciclasa (Snov_2224). Estos dos genes presentan unos niveles de expresión muy bajos en comparación con los genes cercanos, siendo en STN1A, de 4 *fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments* (fpkm) para Snov_2223 y 6 fpkm para Snov_2224 (Fig. 16.B). En el análisis mediante la herramienta STRING de todas las posibles interrelaciones con otras proteínas de Snov-2223, se vio que esta está relacionada con diversas proteínas distribuidas por todo el genoma. Hay que señalar que las interacciones que identifica la herramienta STRING pueden ser de muchos tipos; además de las interacciones físicas demostradas, también identifica como relación la coocurrencia frecuente en genomas, los genes vecinos, las citas simultáneas en la bibliografía, la co-expresión demostrada experimentalmente y la homología de secuencia. Hay que ser por tanto cautos a la hora de interpretar los resultados de STRING. Las interacciones predichas no se han probado experimentalmente en *Starkeya*, pero sí se ha demostrado la co-expresión de estos genes en otros microorganismos. Estas posibles relaciones son con otras diguanilato ciclasas (Snov_2224, Snov_2739 y Snov_2516), diguanilato fosfodiesterasas (Snov_3968 y Snov_2516) y diversos sensores histidin-kinasa (Snov_1992, Snov_1990, Snov_0962, Snov_1999). Estos genes están implicados en la biosíntesis y degradación de c-di-GMP (Römling, Galperin and Gomelsky, 2013) (Fig. S.2), y se podría especular que la mutación en este gen haya podido generar un efecto pleiotrópico afectando a otras proteínas con las que puede estar interaccionando.

De los genes cercanos al mutado, *glnB* es el que posee los mayores niveles de expresión 1849 fpkm en STN1A. Este gen codifica para la proteína PII, reguladora del metabolismo del nitrógeno, que controla la actividad de la glutamina sintetasa (GS) ruta principal de incorporación de nitrógeno inorgánico a aminoácidos. En condiciones de exceso de nitrógeno (NH_4^+), PII favorece la inactivación de la GS permitiendo que GlnE la adenilile, mientras que en condiciones limitantes de nitrógeno PII permite la deadenililación de la GS por GlnE, activándola (Shapiro, 1969; Prival, Brenchley and Magasanik, 1973). Además, en *E. coli* se observó que también controla indirectamente la transcripción del gen *glnA* ya que en exceso de nitrógeno impide la síntesis de su activador transcripcional (Huergo, Chandra and Merrick, 2013). El gen *glnA* que codifica para la glutamina sintetasa de tipo I en STN1A, se encuentra junto a *glnB* y convergente con Snov_2223, y sus niveles de expresión en la cepa WT son de 547 fpkm.

Otros genes cercanos con una expresión significativa en STN1A son, por un lado, dos genes codificantes de proteínas ribosómicas *rplM* y *rpsI*, cuyos niveles de expresión son 864 fpkm y 359 fpkm, respectivamente, y son los únicos genes que forman un operón. Por otro lado, también se observa una expresión elevada del gen *cplX* cuyo producto es la subunidad de unión a ATP de una proteasa. Los niveles de expresión de este gen en STN1A son de 1290 fpkm, mientras que en STN1B llegan hasta los 6336 fpkm, teniendo unos niveles más altos en esta cepa.

Para continuar con el estudio de este mutante en un futuro se verificará que el fenotipo de esta cepa está provocado por la delección de esta diguanilato ciclasa mediante mutación dirigida. También se analizará de forma cuantitativa la producción de moléculas señal con el fin de averiguar cómo se ha visto afectado este sistema por la mutación.

4.4.2 Mutante B49-64

En el mutante B49-64 se identificó que la mutación al azar provocada por el Mini-Tn5 alteró el gen *lexA* (Fig. 17). Este gen codifica para la proteína LexA represora del sistema SOS.

El fenotipo observado en este mutante fue CR-, CF+, M+ y una producción de celulosa superior a la de la cepa silvestre (Fig. 12 y 13). La mutación del gen *lexA* por el Mini-Tn5 conllevaría la pérdida de función del gen, lo que podría haber desencadenado en la desrepresión continua de los genes de reparación de ADN, incluso cuando no hubiera daño. Esta proteína es un represor transcripcional que controla el sistema SOS de reparación de ADN. Identificado por primera vez en *E. coli*, se trata de una respuesta de emergencia que impide la muerte celular en caso de que se produzcan daños por agentes mutagénicos. Este sistema induce la expresión de genes que permiten la replicación del ADN incluso en presencia de lesiones (Bridges, 2005). Durante la reparación SOS, la replicación del ADN es propensa a errores ya que se insertan nucleótidos de manera aleatoria cuando se detecta una lesión, en lugar de detener la replicación y restaurar el daño. En consecuencia, al no reparar las lesiones se induce la aparición de nuevas mutaciones que permiten la supervivencia de la célula (Radman, 1975).

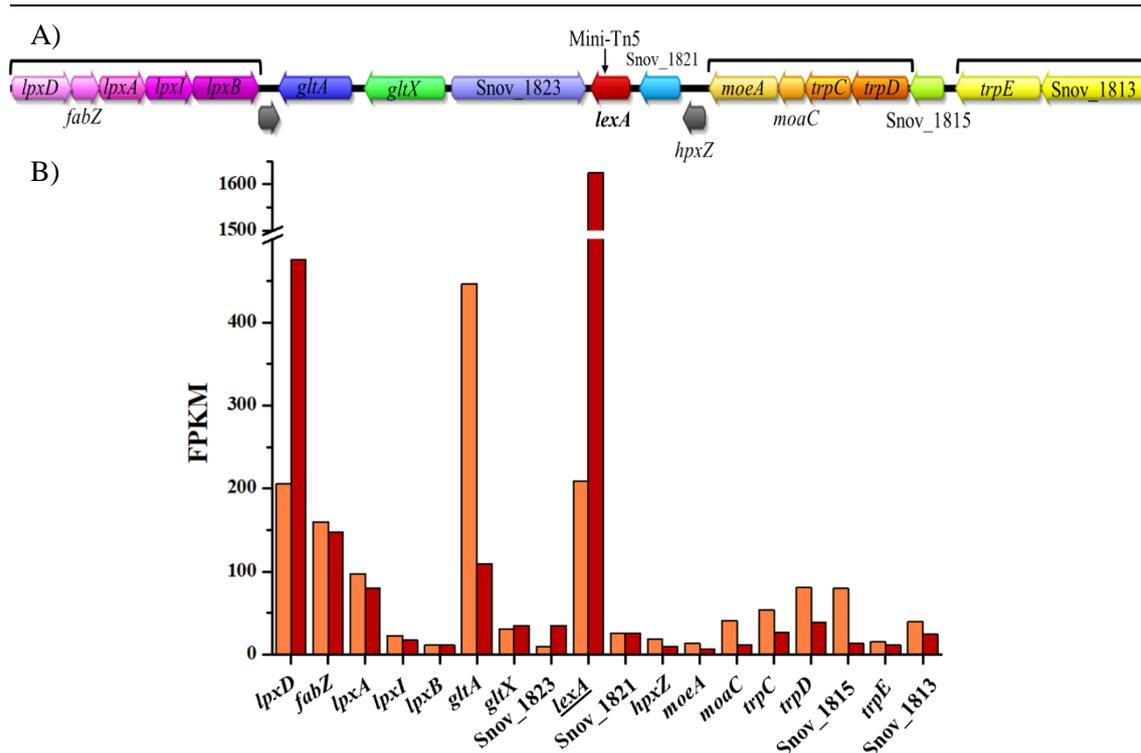


Figura 16. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B49-64. A) Entorno génico del gen mutado *lexA* (granate) codificante para el represor de la respuesta SOS LexA. Cada color representa un gen independiente, y las llaves negras agrupan genes que forman un operón. B) Niveles de expresión (fpm) de los genes cercanos a la mutación. En naranja se representan los valores de expresión para la cepa STN1A y en rojo oscuro los valores para la cepa STN1B.

El papel de LexA en este sistema es la represión del regulón SOS que controla los genes implicados en la reparación SOS (Butala, Žgur-Bertok and Busby, 2008). Para activar este sistema se requiere de la acción de la proteína RecA, que se activa en presencia de ADN de cadena sencilla (ssADN), el cual se origina por un bloqueo en la horquilla de replicación debido a la presencia de errores. RecA posee actividad proteasa e interactúa con el represor LexA, provocando en él una escisión autocatalítica que interrumpe su unión al ADN. Cuando esto ocurre se produce la desrepresión del regulón SOS que conduce a la expresión de proteínas reparadoras del ADN (Harmon, Rehrauer and Kowalczykowski, 1996). Además, este sistema, aparte de en la reparación del ADN también está implicado en diversas funciones, como en la supervivencia frente al estrés ambiental y en la transferencia horizontal de genes, en especial en la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Maslowska, Makiela-Dzbenka and Fijalkowska, 2019; Gregg-Jolly, 2022).

El gen *lexA* en *Starkeya* sp. STN1B posee los niveles de expresión más altos de su entorno génico, 1298 fpm (Fig. 17.B). Analizando la expresión del gen *recA* se comprobó que

poseía unos niveles de expresión similares a *lexA* en STN1B, 1534 fpkm (Fig. S.3). Esto puede indicar que en la cepa parental el sistema de emergencia funciona correctamente, ya que se encuentra debidamente inhibida la expresión de los genes del regulón SOS por la acción de LexA. Pero que, en caso de producirse una lesión irreparable en el genoma, el sistema SOS podría activarse por la acción de RecA (Bell and Kowalczykowski, 2016). El hecho de que esta bacteria pueda tener un sistema de reparación activo puede deberse a que se trata de un microorganismo aislado de enriquecimiento a partir de agua de acuífero contaminada por hidrocarburos y su posterior enriquecimiento con naftaleno (Martirani-Von Abercron *et al.*, 2017). En los ambientes naturales los microorganismos están sometidos a mayor estrés, por lo que requieren de un sistema de reparación del ADN efectivo que asegure la supervivencia celular (Courcelle *et al.*, 2001). Además este sistema parece desempeñar un papel importante en la formación de biopelículas (Podlesek and Žgur Bertok, 2020), por lo que su desregulación en el mutante B49-64 ha podido aumentar la capacidad de la cepa de producción de un exopolisacárido mucoso y de celulosa (Fig. 13).

Por otro lado, los genes cercanos a *lexA* poseen funciones diversas (Fig. 17.A), y en general presentan unos niveles de expresión mayores en la cepa STN1A, excepto *lpxD* que se expresa más en STN1B, 475 fpkm, con respecto a STN1A, 205 fpkm.

Para poder confirmar cuál es el efecto de esta mutación, se reprodujo de forma dirigida la mutación inactivando el gen *lexA* (ver apartado 4.5). Además, para estudiar más en detalle cuál es el efecto de este gen, se realizarán diversos ensayos, como la caracterización del polímero secretado y el análisis del sistema SOS. Esto último permitirá comprobar si este sistema se encuentra desregulado, habiendo podido generar un mayor número de mutaciones que no se hayan detectado, lo que se confirmaría mediante la secuenciación de su genoma. Por otra parte, habría que determinar también cómo esta mutación afecta a la expresión de los genes que participan en la producción de celulosa mediante análisis de RT-qPCR de los genes *bcs* y de la ruta desde glucosa hasta UDP-glucosa.

4.4.3 Mutante B50-59

Para el mutante B50-59 se identificaron dos genes afectados por el Mini-Tn5. Estos genes codifican una pseudouridina sintasa, familia RluA (Snov_2819) y una proteína de la familia de las patatinas (patatin-like proteins, PLP) (Snov_2820) (Fig. 18). Al identificar la región afectada se vio que en el genoma se encuentran separados por 38 pb, por lo que la inserción del transposón pudo mutar ambos genes, delecionando la secuencia

intergénica y un región de cada gen (Fig. 18.A). El fenotipo que poseía este mutante era un crecimiento deficiente tanto en medio sólido como líquido. Además, carecía de la capacidad de producción de celulosa, y era incapaz de utilizar la glucosa como fuente de carbono (Fig. 13. y 15).

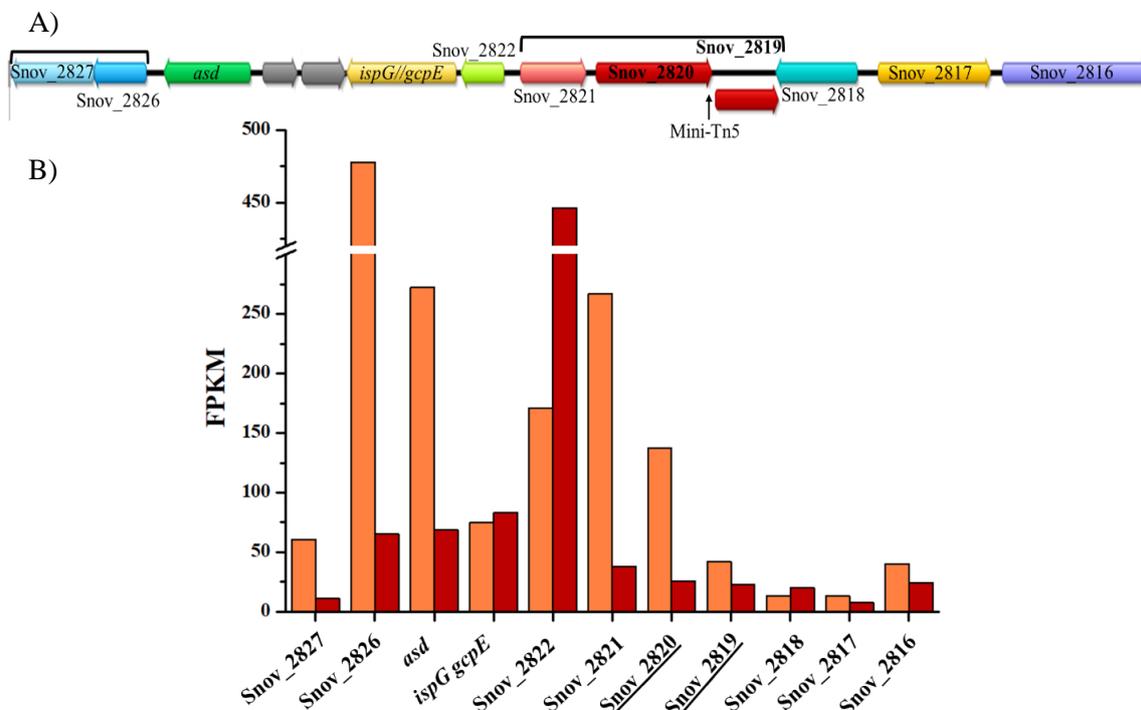


Figura 17. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B50-59. A) Entorno génico de los genes mutados Snov_2820 y Snov_2819 (color granate) codificantes para patatina y una pseudouridina sintasa respectivamente. Cada color representa un gen independiente. Las llaves negras agrupan genes que forman un operón. B) Niveles de expresión (fpkm) de los genes cercanos a la mutación. En naranja se representan los valores de expresión para la cepa silvestre STN1A y en rojo oscuro los valores para la cepa silvestre STN1B.

El primer gen identificado, Snov_2819, transcribe una pseudouridina sintasa de la familia RluA. Este tipo de enzimas participan en la modificación de bases del ARN, en concreto catalizan la isomerización de la uridina en pseudouridina, y también pueden funcionar como chaperonas del ARN (Wrzesinski *et al.*, 1995; Mizutani *et al.*, 2004). En el estudio de mutantes en esta enzima se observaron que presentaban dificultades en la traducción, tasas de crecimiento lentas y menor tasa de supervivencia en cultivo mixto (Gray, 2000), al igual que ocurría con el mutante B50-59, que poseía un crecimiento deficiente y era incapaz de producir celulosa (Fig. 13 y 15). Tras el estudio de las interrelaciones de proteínas con STRING se vio que este gen se relaciona con diversos factores implicados en la traducción, distribuidos por todo el genoma (Fig. S.4). Estas interacciones no se han probado experimentalmente en *Starkeya*, pero sí se han visto en otros microorganismos.

Algunas de las proteínas con las que estaría relacionada son: factores de iniciación de la traducción (InfB), factores de elongación (FsuA) y proteínas ribosomales de la subunidad grande del ribosoma (RplC, RplL, RplM), entre otros. Todas ellas son proteínas esenciales en la traducción, por lo que haber mutado este gen podría también haber comprometido la traducción en este mutante, como parece indicar su dificultad general para crecer (Fig. 15). Por lo tanto, no parece que este mutante esté específicamente afectado en la producción de celulosa, sino de forma general en su crecimiento y actividad metabólica.

El segundo gen, Snov_2820, codificaba una proteína de la familia de las patatinas. Estas son un tipo de proteínas ampliamente distribuidas en eucariotas y procariotas, y con funciones muy diversas (metabolismo de triglicéridos, invasión del hospedador en patógenos, señalización y defensa en plantas, etc.) (Anderson *et al.*, 2015; Tessmer *et al.*, 2019). Estas proteínas se consideran proteínas de almacenamiento, aunque también tienen actividad lipolítica (Shewry, 2003). Estos dos genes mutados forman un operón junto con Snov_2021, que codifica para la enzima 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa, implicada en la biosíntesis y degradación de polihidroxialcanoatos (PHAs). La presencia de estos bioplásticos se ha evidenciado en la cepa silvestre durante su crecimiento en glucosa (datos del laboratorio), por lo que en un futuro se podría estudiar si la producción de PHAs también se ha visto afectada en este mutante utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para poder identificar qué gen está generando el fenotipo de este mutante se deberá mutar cada gen de forma independiente y ambos al mismo tiempo. Así se podrá comprobar qué gen compromete la viabilidad de este mutante. Otra opción a tener en cuenta es la posibilidad de que el Mini-Tn5 haya saltado en más de una región del genoma, debido a que esta cepa posee 39 transposasas en su genoma, y haya mutado más de un gen que provoque este fenotipo.

4.4.4 Mutante B51-22

El gen afectado en el mutante B51-22 codifica la subunidad A de la enzima formilmetano furano deshidrogenasa (Snov_0756) (Fig. 19).

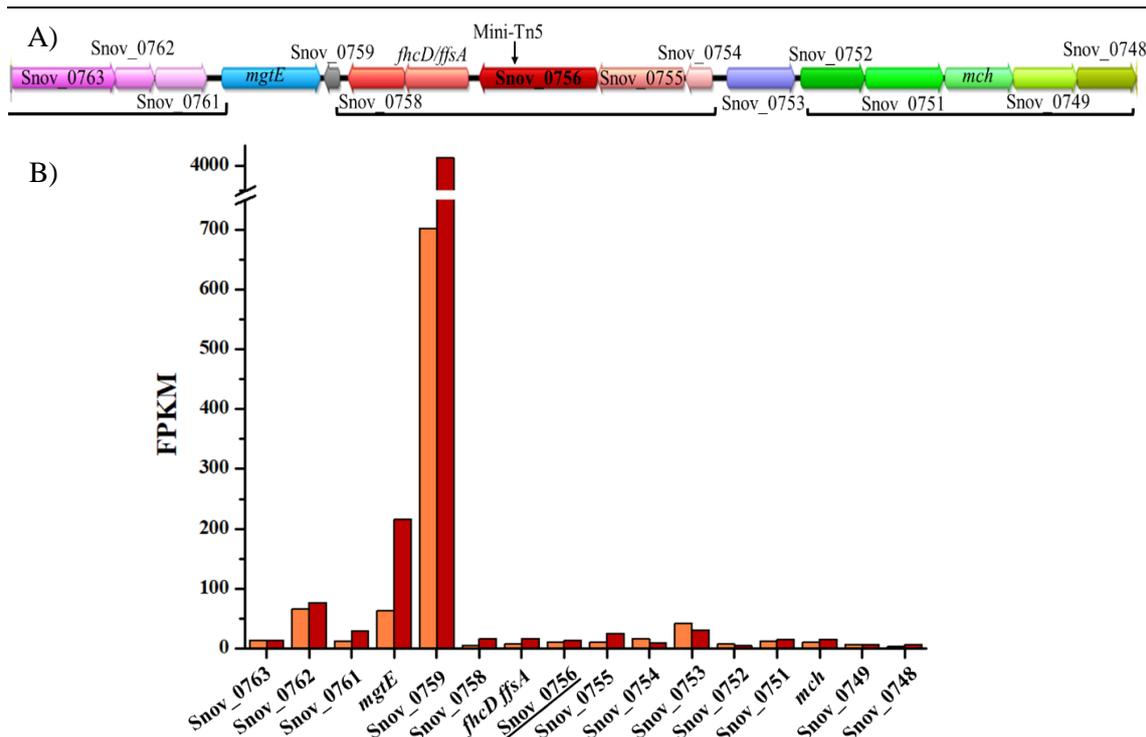


Figura 18. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B51-22. A) Entorno génico del gen mutado Snov_0756 (color granate) codificante para la subunidad A de la enzima formilmetanofurano deshidrogenasa. Cada color representa un gen independiente, y las llaves negras agrupan genes que forman un operón. B) Niveles de expresión (fpkm) de los genes cercanos a la mutación. En naranja se representan los valores de expresión para la cepa silvestre STN1A y en rojo oscuro los valores para la cepa silvestre STN1B.

Esta enzima forma parte de un complejo enzimático formado por tres subunidades: A, B y C. Los genes que codifican estas enzimas se encuentran en un operón formado por cinco genes: Snov_0755, Snov_0756, Snov_0758, junto a *fhcD* o *ffsA* que codifica la enzima formilmetanofurano-tetrahidrometanopterin N-formiltransferasa y Snov_0754 que codifica para un coactivador transcripcional/pterina deshidratasa. Este mutante poseía un fenotipo deficiente en la producción de celulosa, y por lo tanto CF-, CR- y con una morfología de colonia lisa, W- (Fig. 12 y 13).

El complejo enzimático del que forma parte la enzima mutada participa en la metanogénesis a partir de CO₂ en arqueas metanógenas. Esta enzima cataliza la reacción de biosíntesis de formilmetanofurano a partir de metanofurano, CO₂ e H₂. Este tipo de enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces amida o amina utilizando cofactores metálicos divalentes, específicamente esta utilizaría una proteína sulfoferrosa que tras la reacción da lugar a ferredoxina reducida y H⁺ (Bobik, DiMarco and Wolfe, 1990). La cepa tipo de *Starkeya*, *S. novella* DSM506, es capaz de metabolizar metanol a formaldehído a través

de la ruta de la tetrahidrometanopterina y posteriormente a formato, que es finalmente incorporado a la biomasa celular, lo que explica la presencia de este clúster en el genoma.

Los niveles de expresión de *Snov_0756* son muy bajos, 13,4 fpkm, al igual que los niveles de los genes que van junto a él en el operón. Probablemente estos niveles tan bajos se deban a que la transcriptómica se realizó con células crecidas en glucosa, por lo que esta ruta puede no estar inducida. Junto a este operón se encuentra una proteína hipotética de unión a metales con dominios conservados (*Snov_0759*) que presenta unos niveles de expresión muy elevados, 4146 fpkm. Es posible que la mutación por el Mini-Tn5 haya tenido un efecto polar, pudiendo afectar también a esta proteína de función desconocida. Para certificar y averiguar cuál es la función de esta proteína sería necesario mutarla de forma dirigida y así poder estudiar su funcionalidad y analizar qué fenotipo genera.

Con los datos disponibles, es difícil explicar por qué un mutante en el metabolismo de compuestos de 1 carbono pueda afectar al fenotipo de producción de celulosa creciendo en glucosa. Por otra parte, para continuar con el estudio del fenotipo de este mutante se caracterizará su crecimiento en metanol. De esta forma se estudiará si el metabolismo de degradación de este metabolito está afectado, ya que la cepa silvestre sí es capaz de crecer sobre este compuesto (Kappler and Nouwens, 2013).

4.4.5 Mutante B52-19

Finalmente, en el mutante B52-19 el gen mutado fue *tpiA*, codificante para una triosa fosfato isomerasa (Fig. 20). Esta enzima de la gluconeogénesis cataliza la reacción doble sentido de conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P). El fenotipo de la colonia de este mutante fue: CF- CR- y W- (Fig. 12).

La gluconeogénesis es una de las vías por la que esta bacteria puede obtener UDP-glucosa, el sustrato específico de la celulosa sintasa (Lee et al., 2014). Por lo que una mutación en una enzima de esta ruta puede tener un efecto en los niveles intracelulares de glucosa, y afectar a la producción de celulosa (Fig. 12). Esto debería afectar también al crecimiento de la cepa. Efectivamente, este mutante presenta una fase de latencia de varios días antes de empezar a crecer (Fig. 15). Esto podría indicar que el mutante necesita inducir una ruta alternativa para realizar ese paso antes de empezar a crecer a una velocidad similar a la de su cepa parental. Teniendo esta enzima unos niveles de expresión similares en ambas cepas silvestres (Fig. 20.B).

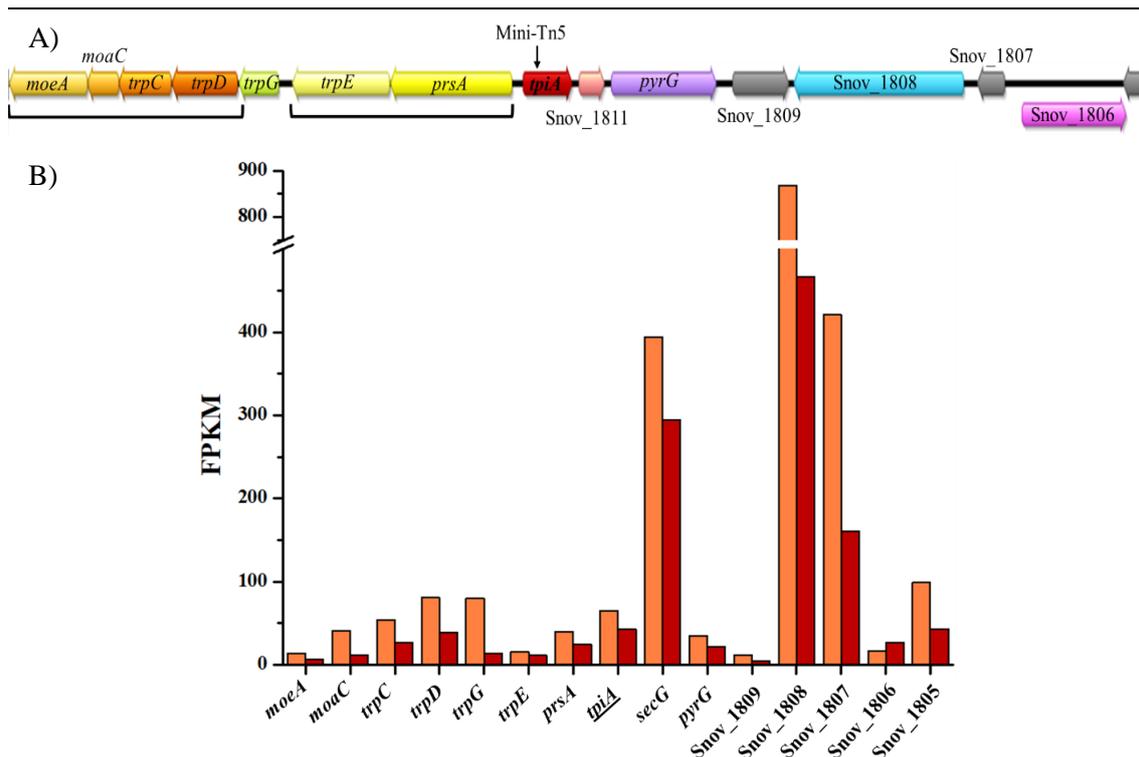


Figura 19. Entorno génico y niveles de expresión del gen afectado por la mutación al azar en el mutante B52-19. A) Entorno génico del gen mutado *tpiA* (color granate) codificante para la enzima triosafato isomerasa. Cada color representa un gen independiente, y las llaves negras agrupan genes que forman un operón. B) Niveles de expresión (fpkm) de los genes cercanos a la mutación. En naranja se representan los valores de expresión para la cepa STN1A y en rojo oscuro los valores para la cepa STN1B.

Analizando el entorno génico del gen *tpiA* se observó que la región aguas arriba de *tpiA* se solapaba con la zona aguas arriba de *lexA*, gen mutado en B49-64 (Fig. 20.A). Ambos mutantes poseen fenotipos muy distintos, ya que B49-64 forma una colonia mucosa y su producción de celulosa superó a la cepa WT, mientras que B52-19 forma colonias planas.

Al estudiar la producción de celulosa se observó que poseía una capacidad superior a la de la cepa silvestre, casi igualando la producción por las cepas mutantes de STN1A. Este resultado no concuerda con el fenotipo estudiado en medio sólido, por lo que el mutante necesita volver a ser analizado en profundidad. Para solventar este problema se realizará de nuevo el estudio de la producción de celulosa del mutante tanto en medio líquido como en medio sólido para estudiar su producción y ver si se corresponde a la observada inicialmente. También se estudiará y comparará la morfología de colonia del último subcultivo con el mutante inicial. En caso de haber diferencias en la morfología de colonia o la capacidad de producción de celulosa se secuenciará de nuevo el gen mutado para comprobar si la mutación se encuentra en la misma posición o se ha desplazado a otro lugar del genoma.

4.5 Mutagénesis dirigida y sobreexpresión del gen *lexA*

4.5.1 Delección del gen *lexA*

Con el fin de demostrar que el fenotipo del mutante B49-64 estaba causado por la mutación del gen *lexA*, se decidió generar este mutante de forma dirigida. Para ello se diseñó un mutante *lexA* de delección como se muestra en el apartado 3.9.1. Para ello se utilizaron dos pares de oligonucleótidos: pKNGLexA1.FOR-LexA1.REV y LexA2.ROR-pKNGLexA2.REV (Tabla 6).

Con estos cebadores se amplificaron los dos fragmentos flanqueantes del gen y que incluían una secuencia corta inicial y final de este, que se ligaron para generar un gen *lexA* de menor tamaño que codificaba para una proteína no funcional (Fig. 21). El fragmento 1 amplificado fue de 1200 Kb (Fig. 21.A), mientras que el fragmento 2 tuvo 1094 Kb (Fig. 21.B). Estos se ligaron e insertaron en el vector pKNG101, con el que se transformaron células competentes de *E. coli* CC118 (descrito en 9.3.1). El plásmido resultante pKNG101:*lexA* se aisló y linealizó con enzimas de restricción. Así se comprobó que el fragmento insertado poseía el tamaño de los fragmentos solapados, 2294 pb (Fig. 21.C). Para certificar que el inserto correspondía a los genes de interés se secuenció el plásmido pKNG101:*lexA* con los oligonucleótidos 3-pK, 5-pK, LexA1.REV y LexA2.FOR (Tabla 3), y se obtuvo la secuencia completa de los genes contiguos a *lexA* y este delecionado.

Tras esto la construcción génica se utilizará para mutar de forma dirigida el gen *lexA* de la cepa silvestre con una conjugación tri-parental. Esto no se ha podido llevar a cabo en el contexto de este trabajo por falta de tiempo.

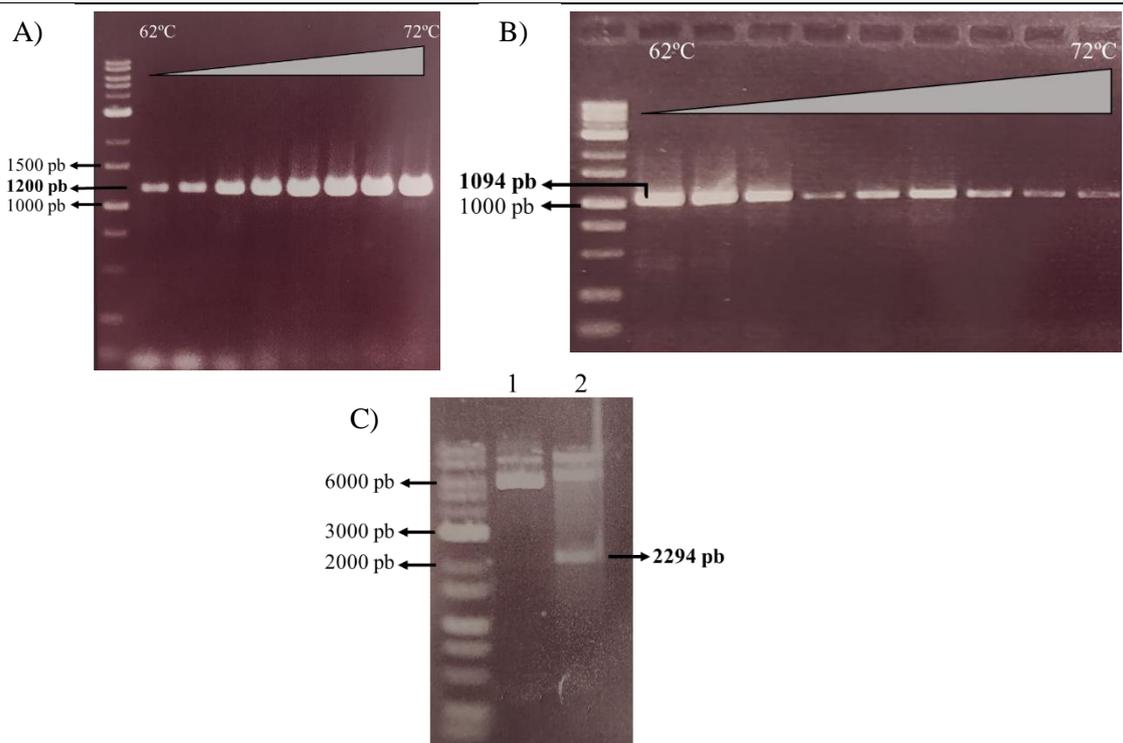


Figura 20. Geles de agarosa para la comprobación de la construcción génica del mutante *lexA*. A) PCR de gradiente del Fragmento 1 para la delección del gen *lexA*; B) PCR de gradiente del Fragmento 2 para la delección del gen *lexA*; C) Extracción del plásmido pKNG101:*lexA* (1) y pKNG101:*lexA* cortado con enzimas de restricción, separando el fragmento insertado.

4.5.2 Sobreexpresión del gen *lexA*

También se diseñó la construcción génica para sobreexpresar el gen *lexA* en el mutante B49-64 y regenerar el fenotipo de la cepa silvestre.

Para la amplificación del gen *lexA* se utilizaron los oligonucleótidos SobreLexA.FOR-SobreLexA.REV (Tabla 6), que amplifican un fragmento de 728 pb (Fig. 22.A y 22.B). Tras su amplificación se insertó en pJB3Ap y clonó en células competentes de *E. coli* cc118 (descrito en el apartado 3.9.2). Se obtuvo de esta forma el plásmido pJB3Ap:*lexA*, verificando la correcta inserción del fragmento por PCR y secuenciación, utilizando los oligonucleótidos Rev-21 y SobreLexA.REV (Tabla 3).

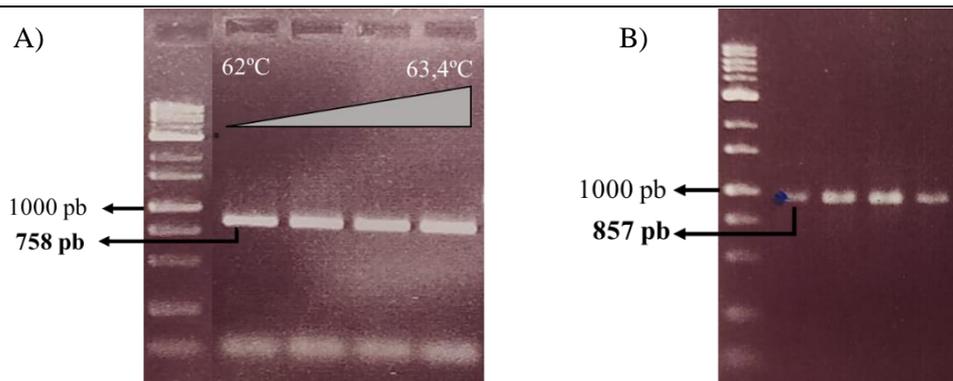


Figura 21. Geles de agarosa para la comprobación de la construcción génica de la complementación del mutante B49-64. A) PCR de gradiente del fragmento para la sobreexpresión del gen *lexA*. B) PCR de colonia del gen de interés insertado en pJB3Ap.

Tras la obtención y comprobación de que la construcción se realizó de forma correcta el siguiente paso será la inserción mediante conjugación en la cepa mutante B49-64, averiguando si restaurando el gen *lexA* se revertía el fenotipo, generando el de la cepa silvestre STN1B. En el tiempo en el que se llevó a cabo este trabajo esto no pudo ser realizado, pero queda hecha la construcción del plásmido pJB3Ap:*lexA*.

El objetivo inicial de este estudio fue aclarar qué genes podían afectar a la producción de celulosa, un polímero de gran interés biotecnológico. De esta forma se buscaba conocer el funcionamiento de este proceso debido a que la cepa estudiada está todavía poco caracterizada. En este caso se escogió el estudio de mutantes al azar ya que pueden proporcionar mucha información, y tener una colección de mutantes a disposición en el laboratorio es útil para poder investigarlos con enfoques diferentes.

El estudio de estos mutantes no es sencillo, ya que mutaciones en genes no esenciales en la síntesis de este polímero pueden tener efectos muy diversos, afectando tanto al crecimiento como a la producción de celulosa. En este trabajo se evidencia la complejidad metabólica que posee esta bacteria, y como sus vías metabólicas se encuentran interrelacionadas. Como por ejemplo se vio en la mutación de la pseudouridina sintasa, que afectó al crecimiento y la producción de glucosa, o la mutación de la proteína LexA donde se vio incrementada la producción de un exopolisacárido mucoso.

Por esto, el análisis en profundidad de todos los sistemas mutados es complejo y queda en el laboratorio para sucesivos estudios y la complementación de aquellos que ya se encuentran en marcha.

El objetivo de este estudio era identificar genes que pudieran participar en la producción de celulosa por alguna de estas cepas, con el fin de entender mejor el proceso y definir todos los elementos involucrados. La aproximación elegida fue seleccionar mutantes al azar afectados en el proceso, ya que nos parece la menos sesgada y puede aportar mucha información, además de proporcionar una colección de mutantes en todo el genoma, lo que es algo muy valioso.

Por otra parte, hay que destacar que el análisis de estos mutantes al azar, como revela este trabajo, no es sencillo, ya que mutaciones en genes aparentemente no relacionados directamente con la producción de celulosa, como serían los genes *bcs* (por ejemplo) pueden afectar tanto al crecimiento de forma general como a la producción de la celulosa. Este trabajo evidencia la complejidad del metabolismo celular y de cómo distintas rutas metabólicas están interrelacionadas (por ejemplo, una mutación en una afecta a la secreción de celulosa en medio sólido y provoca un fenotipo de colonia liso, mientras que mutar una pseudouridina sintasa afecta al crecimiento general o mutar una enzima del metabolismo de compuestos de un carbono reduce la producción de celulosa).

El tiempo de desarrollo de este estudio nos ha permitido seleccionar y mapear una serie de mutantes afectados en la síntesis de celulosa, y caracterizarlos en profundidad. Los mutantes identificados en este estudio serán objeto de análisis exhaustivo en el laboratorio, para determinar las causas de su implicación en el proceso y entender mejor el mecanismo de producción de celulosa, un polímero relevante y con buenas posibilidades de aplicación biotecnológica.

5. Conclusiones

1. Los métodos de selección utilizados durante este estudio permiten seleccionar mutantes deficientes en la producción de celulosa, afectados en genes ajenos o no al operón *bcs*.
2. La mutación de la diguanilato ciclasa (Snov_2223) cambia el fenotipo de colonia rugoso por una colonia lisa y afecta a la producción de moléculas señal.
3. La inserción del transposón en el gen *lexA* generó un mutante probablemente con el sistema SOS desregulado cuyo principal efecto respecto a la cepa parental STN1B fue la superproducción de celulosa y de un exopolisacárido mucoso.
4. El fenotipo observado en el mutante B50-59 indica que la mutación provocada por la inserción del Mini-Tn5 afectó a un gen esencial para la célula, generando un fenotipo deficiente en el crecimiento e incapaz de producir celulosa.
5. La mutación en una enzima del metabolismo de compuestos de 1 carbono provocó una reducción en la producción de celulosa, lo que muestra la gran complejidad metabólica que posee esta cepa y cómo requiere de un correcto funcionamiento metabólico para la producción de celulosa.
6. Los mutantes afectados en la producción de celulosa no presentaban la inserción del transposón en los genes esenciales conocidos de la síntesis de este polímero (genes *bcs*). Esto que indica que para la producción eficiente de celulosa también se requiere de la correcta funcionalidad de otros genes.

6. Bibliografía

Abidi, W. *et al.* (2022) ‘Weaving of bacterial cellulose by the Bcs secretion systems’, *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2), p. fuab051.

Abol-Fotouh, D. *et al.* (2020) ‘Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1’, *Scientific Reports*, 10(1), p. 3491.

Almeida, T. *et al.* (2021) ‘Bacterial Nanocellulose toward Green Cosmetics: Recent Progresses and Challenges’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), p. 2836.

A. Lowery, C., J. Dickerson, T. and D. Janda, K. (2008) ‘Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing’, *Chemical Society Reviews*, 37(7), pp. 1337–1346.

Altschul, S.F. *et al.* (1990) ‘Basic local alignment search tool’, *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403–410.

de Amorim, J.D.P. *et al.* (2020) ‘Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review’, *Environmental Chemistry Letters*, 18(3), pp. 851–869.

Anderson, A.C. *et al.* (2020) ‘The *Escherichia coli* cellulose synthase subunit G (BcsG) is a Zn²⁺-dependent phosphoethanolamine transferase’, *Journal of Biological Chemistry*, 295(18), pp. 6225–6235.

Anderson, D.M. *et al.* (2015) ‘Ubiquitin Activates Patatin-Like Phospholipases from Multiple Bacterial Species’, *Journal of Bacteriology*, 197(3), pp. 529–541.

Azeredo, H.M.C. *et al.* (2019) ‘Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications’, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3.

Bell, J.C. and Kowalczykowski, S.C. (2016) ‘RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine’, *Trends in Biochemical Sciences*, 41(6), pp. 491–507.

Benziman, M. *et al.* (1980) ‘Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), pp. 6678–6682. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6678>.

- Bertani, G. (1951) 'STUDIES ON LYSOGENESIS I: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 62(3), pp. 293–300.
- Bielecki, S. *et al.* (2005) 'Bacterial cellulose.', *Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents*, pp. 31–84.
- Blatny, J.M. *et al.* (1997) 'Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), pp. 370–379.
- Bridges, B.A. (2005) 'Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis: II: The inducible SOS hypothesis', *DNA Repair*, 4(6), pp. 725–739.
- Brown Jr, R.M. and Saxena, I.M. (2000) 'Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers', *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1), pp. 57–67.
- Butala, M., Žgur-Bertok, D. and Busby, S.J.W. (2008) 'The bacterial LexA transcriptional repressor', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(1), p. 82.
- Cazón, P. and Vázquez, M. (2021) 'Bacterial cellulose as a biodegradable food packaging material: A review', *Food Hydrocolloids*, 113, p. 106530.
- Courcelle, J. *et al.* (2001) 'Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient Escherichia coli', *Genetics*, 158(1), pp. 41–64.
- Deng, Y. *et al.* (2013) 'Identification and Characterization of Non-Cellulose-Producing Mutants of Gluconacetobacter hansenii Generated by Tn5 Transposon Mutagenesis', *Journal of Bacteriology*, 195(22), pp. 5072–5083.
- Dubey, S., Singh, J. and Singh, R.P. (2018) 'Biotransformation of sweet lime pulp waste into high-quality nanocellulose with an excellent productivity using Komagataeibacter europaeus SGP37 under static intermittent fed-batch cultivation', *Bioresource Technology*, 247, pp. 73–80.
- Dudášová, H. *et al.* (2014) 'Bacterial strains isolated from PCB-contaminated sediments and their use for bioaugmentation strategy in microcosms', *Journal of Basic Microbiology*, 54(4), pp. 253–260.

- Fillat, A. *et al.* (2018) 'Bacterial cellulose for increasing barrier properties of paper products', *Cellulose*, 25(10), pp. 6093–6105.
- Fontana, J.D. *et al.* (1990) 'Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24(1), pp. 253–264.
- Fuqua, C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1996) 'CENSUS AND CONSENSUS IN BACTERIAL ECOSYSTEMS: The LuxR-LuxI Family of Quorum-Sensing Transcriptional Regulators', *Annual Review of Microbiology*, 50(1), pp. 727–751.
- Gray, M.C., Michael W. (2000) 'Pseudouridine in RNA: What, Where, How, and Why', *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 49(5), pp. 341–351.
- Gregg-Jolly, L.A. (2022) 'Locking down SOS Mutagenesis Repression in a Dynamic Pathogen', *Journal of Bacteriology*, 204(11), pp. e00220-22.
- Harmon, F.G., Rehrauer, W.M. and Kowalczykowski, S.C. (1996) 'Interaction of Escherichia coli RecA protein with LexA repressor. II. Inhibition of DNA strand exchange by the uncleavable LexA S119A repressor argues that recombination and SOS induction are competitive processes', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(39), pp. 23874–23883.
- Hense, B.A. and Schuster, M. (2015) 'Core Principles of Bacterial Autoinducer Systems', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), pp. 153–169.
- Herth, W. and Schnepf, E. (1980) 'The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils', *Protoplasma*, 105(1), pp. 129–133.
- Hu, S.-Q. *et al.* (2010) 'Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), pp. 17957–17961.
- Huang, J., Dufresne, A. and Lin, N. (2019) *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials*. John Wiley & Sons.
- Huergo, L.F., Chandra, G. and Merrick, M. (2013) 'PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond', *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), pp. 251–283.

- Jacek, P. *et al.* (2019) 'Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis', *Microbial Biotechnology*, 12(4), pp. 633–649.
- Jacek, P. *et al.* (2021) 'Optimization and characterization of bacterial nanocellulose produced by *Komagataeibacter rhaeticus* K3', *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, p. 100022.
- Jumper, J. *et al.* (2021) 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, 596(7873), pp. 583–589.
- Kaiser, T.D.L. *et al.* (2013) 'Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(3), pp. 235–239.
- Kanehisa, M. *et al.* (2023) 'KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes', *Nucleic Acids Research*, 51(D1), pp. D587–D592.
- Kaniga, K., Delor, I. and Cornelis, G.R. (1991) 'A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*', *Gene*, 109(1), pp. 137–141.
- Kappler, U. *et al.* (2012) 'Complete genome sequence of the facultatively chemolithoautotrophic and methylotrophic alpha Proteobacterium *Starkeya novella* type strain (ATCC 8093T)', *Standards in Genomic Sciences*, 7(1), pp. 44–58.
- Kappler, U. and Nouwens, A. (2013) 'Metabolic adaptation and trophic strategies of soil bacteria—C1- metabolism and sulfur chemolithotrophy in *Starkeya novella*', *Frontiers in Microbiology*, 4.
- Kawano, Y. *et al.* (2011) 'Cellulose Accumulation and a Cellulose Synthase Gene are Responsible for Cell Aggregation in the Cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN', *Plant and Cell Physiology*, 52(6), pp. 957–966.
- Kelly, D.P., McDonald, I.R. and Wood, A.P. (2000) 'Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the alpha-subclass of the Proteobacteria.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(5), pp. 1797–1802.
- Kessler, B., de Lorenzo, V. and Timmis, K.N. (1992) 'A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the P_m promoter

of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy', *Molecular and General Genetics MGG*, 233(1), pp. 293–301.

Klemm, D. *et al.* (2011) 'Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials', *Angewandte Chemie International Edition*, 50(24), pp. 5438–5466.

Krasteva, P.V. *et al.* (2017) 'Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system', *Nature Communications*, 8(1), p. 2065.

Lee, K.-Y. *et al.* (2014) 'More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites', *Macromolecular Bioscience*, 14(1), pp. 10–32..

Lerat, E. and Moran, N.A. (2004) 'The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in Bacteria', *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), pp. 903–913.

Li, C. *et al.* (2016) 'Comparative analysis of microbial community between different cathode systems of microbial fuel cells for denitrification', *Environmental Technology*, 37(6), pp. 752–761.

Li, T. *et al.* (2021) 'Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material', *Nature*, 590(7844), pp. 47–56.

de Lorenzo, V. *et al.* (1990) 'Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria', *Journal of Bacteriology*, 172(11), pp. 6568–6572.

Luo, Z.-Q., Clemente, T.E. and Farrand, S.K. (2001) 'Construction of a Derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 That Does Not Mutate to Tetracycline Resistance', *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 14(1), pp. 98–103.

Maddocks, S.E. and Oyston, P.C.F. (2008) 'Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins', *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 12), pp. 3609–3623.

Marín, P. *et al.* (2019) 'Bacterial nanocellulose production from naphthalene', *Microbial Biotechnology*, pp. 1751-7915.13399.

- Martirani-Von Abercron, S. *et al.* (2017) 'Naphthalene biodegradation under oxygen-limiting conditions: community dynamics and the relevance of biofilm-forming capacity', *Microbial Biotechnology*, 10(6), pp. 1781–1796.
- Masaoka, S., Ohe, T. and Sakota, N. (1993) 'Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*', *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), pp. 18–22.
- Maslowska, K.H., Makiela-Dzubska, K. and Fijalkowska, I.J. (2019) 'The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(4), pp. 368–384.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001) 'Quorum Sensing in Bacteria', *Annual Review of Microbiology*, 55(1), pp. 165–199.
- Mizutani, K. *et al.* (2004) 'Crystal Structures of the Catalytic Domains of Pseudouridine Synthases RluC and RluD from *Escherichia coli*', *Biochemistry*, 43(15), pp. 4454–4463.
- Mohammadkazemi, F., Azin, M. and Ashori, A. (2015) 'Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media', *Carbohydrate Polymers*, 117, pp. 518–523.
- Morgan, J.L.W., McNamara, J.T. and Zimmer, J. (2014) 'Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP', *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(5), pp. 489–496.
- Morgan, J.L.W., Strumillo, J. and Zimmer, J. (2013) 'Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation', *Nature*, 493(7431), pp. 181–186.
- Nogi, M. *et al.* (2009) 'Optically Transparent Nanofiber Paper', *Advanced Materials*, 21(16), pp. 1595–1598.
- Ohtani, K., Hayashi, H. and Shimizu, T. (2002) 'The luxS gene is involved in cell–cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*', *Molecular Microbiology*, 44(1), pp. 171–179.
- Omadjela, O. *et al.* (2013) 'BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), pp. 17856–17861.

- Papenfort, K. and Bassler, B.L. (2016) 'Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria', *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), pp. 576–588.
- Piasecka-Zelga, J. *et al.* (2021) 'Toxicological and Sensitization Studies of Novel Vascular Prostheses Made of Bacterial Nanocellulose Modified with Chitosan (MBC) for Application as the Tissue-Engineered Blood Vessels', *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 7(2), pp. 218–233.
- Podlesek, Z. and Žgur Bertok, D. (2020) 'The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance', *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Prival, M.J., Brenchley, J.E. and Magasanik, B. (1973) 'Glutamine Synthetase and the Regulation of Histidase Formation in *Klebsiella aerogenes*', *Journal of Biological Chemistry*, 248(12), pp. 4334–4344.
- Quiñones, B., Dulla, G. and Lindow, S.E. (2005) 'Quorum Sensing Regulates Exopolysaccharide Production, Motility, and Virulence in *Pseudomonas syringae*', *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 18(7), pp. 682–693.
- Radman, M. (1975) 'SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which is Accompanied by Mutagenesis', in P.C. Hanawalt and R.B. Setlow (eds) *Molecular Mechanisms for Repair of DNA: Part A*. Boston, MA: Springer US (Basic Life Sciences), pp. 355–367.
- Römling, U. (2009) 'Rationalizing the Evolution of EAL Domain-Based Cyclic di-GMP-Specific Phosphodiesterases', *Journal of Bacteriology*, 191(15), pp. 4697–4700.
- Römling, U. and Amikam, D. (2006) 'Cyclic di-GMP as a second messenger', *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), pp. 218–228.
- Römling, U. and Galperin, M.Y. (2015) 'Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions', *Trends in Microbiology*, 23(9), pp. 545–557.
- Römling, U., Galperin, M.Y. and Gomelsky, M. (2013) 'Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 77(1), pp. 1–52.
- Ross, P. *et al.* (1987) 'Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid', *Nature*, 325(6101), pp. 279–281.

- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1991) 'Cellulose biosynthesis and function in bacteria', *Microbiological Reviews*, 55(1), pp. 35–58.
- Ruan, C. *et al.* (2016) 'Effect of cellulose crystallinity on bacterial cellulose assembly', *Cellulose*, 23(6), pp. 3417–3427.
- Ryan, R.P. *et al.* (2006) 'Cyclic Di-GMP Signaling in Bacteria: Recent Advances and New Puzzles', *Journal of Bacteriology*, 188(24), pp. 8327–8334.
- Ryjenkov, D.A. *et al.* (2005) 'Cyclic Diguanylate Is a Ubiquitous Signaling Molecule in Bacteria: Insights into Biochemistry of the GGDEF Protein Domain', *Journal of Bacteriology*, 187(5), pp. 1792–1798.
- Salimi, S. *et al.* (2019) 'Production of Nanocellulose and Its Applications in Drug Delivery: A Critical Review', *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(19), pp. 15800–15827.
- Saxena, I.M. *et al.* (1994) 'Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization', *Journal of Bacteriology*, 176(18), pp. 5735–5752.
- Schuster, M. *et al.* (2013) 'Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application', *Annual Review of Microbiology*, 67(1), pp. 43–63.
- Shapiro, B.M. (1969) 'Glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements', *Biochemistry*, 8(2), pp. 659–670.
- Sharma, C. and Bhardwaj, N.K. (2019) 'Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives', *Materials Science and Engineering: C*, 104, p. 109963.
- SHEWRY, P.R. (2003) 'Tuber Storage Proteins', *Annals of Botany*, 91(7), pp. 755–769.
- Starkey, R.L. (1934) 'Cultivation of Organisms Concerned in the Oxidation of Thiosulfate', *Journal of Bacteriology*, 28(4), pp. 365–386.
- Szklarczyk, D. *et al.* (2023) 'The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest', *Nucleic Acids Research*, 51(D1), pp. D638–D646.

- Tajima, K. *et al.* (2022) 'Cellulose-synthesizing machinery in bacteria', *Cellulose*, 29(5), pp. 2755–2777.
- Taweecheep, P. *et al.* (2019) 'Superfine bacterial nanocellulose produced by reverse mutations in the bcsC gene during adaptive breeding of *Komagataeibacter oboediens*', *Carbohydrate Polymers*, 226, p. 115243.
- Tessmer, M.H. *et al.* (2019) 'Identification and Verification of Ubiquitin-Activated Bacterial Phospholipases', *Journal of Bacteriology*, 201(4), p. 10.1128/jb.00623-18.
- The UniProt Consortium (2023) 'UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023', *Nucleic Acids Research*, 51(D1), pp. D523–D531.
- Ueda, A. and Wood, T.K. (2009) 'Connecting Quorum Sensing, c-di-GMP, Pel Polysaccharide, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* through Tyrosine Phosphatase TpbA (PA3885)', *PLOS Pathogens*, 5(6), p. e1000483.
- Valla, S. *et al.* (1989) 'Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene', *Molecular and General Genetics MGG*, 217(1), pp. 26–30.
- Widdel, F. and Bak, F. (1992) 'Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria', in A. Balows *et al.* (eds) *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. New York, NY: Springer, pp. 3352–3378.
- Widdel, F., Kohring, G.-W. and Mayer, F. (1983) 'Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids', *Archives of Microbiology*, 134(4), pp. 286–294.
- Wood, P.J. (1980) 'Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides', *Carbohydrate Research*, 85(2), pp. 271–287.
- Wrzesinski, J. *et al.* (1995) 'A dual-specificity pseudouridine synthase: an *Escherichia coli* synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe).', *RNA*, 1(4), pp. 437–448.

Xue, Y., Mou, Z. and Xiao, H. (2017) 'Nanocellulose as a sustainable biomass material: structure, properties, present status and future prospects in biomedical applications', *Nanoscale*, 9(39), pp. 14758–14781.

Yamada, Y. *et al.* (2012) 'Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae)', *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(5), pp. 397–404.

Zouhir, S. *et al.* (2020) 'Structure and Multitasking of the c-di-GMP-Sensing Cellulose Secretion Regulator BcsE', *mBio*, 11(4), p. 10.1128/mbio.01303-20.

7. Anexos

1. Producción de N-acil homoserina lactonas por las cepas mutantes

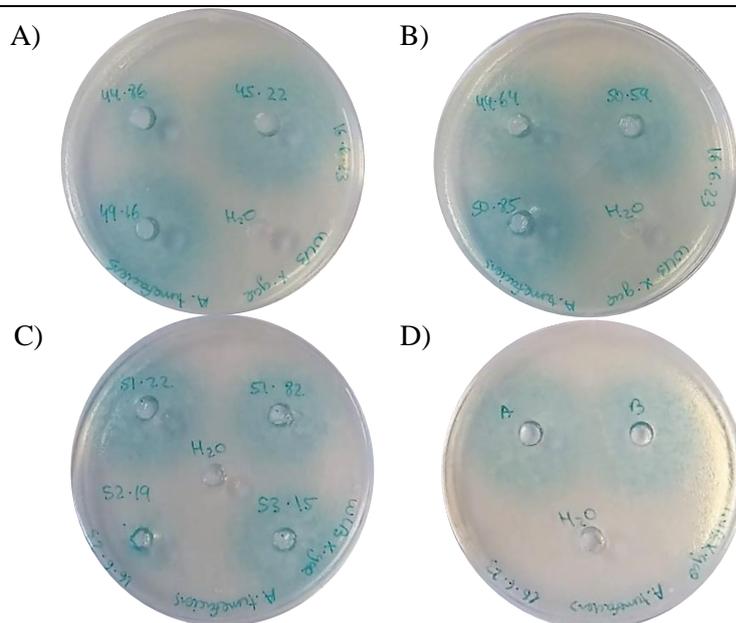


Figura suplementaria 1. Producción de AHLs en placa por las cepas mutantes seleccionadas. A), B), C) Producción de AHLs por las cepas mutantes inoculadas junto a H₂O como control negativo. D) Producción de AHLs por cepas silvestres, como control positivo y H₂O como control negativo.

2. Red de interacciones del gen codificante para la diguanilato ciclasa mutada.

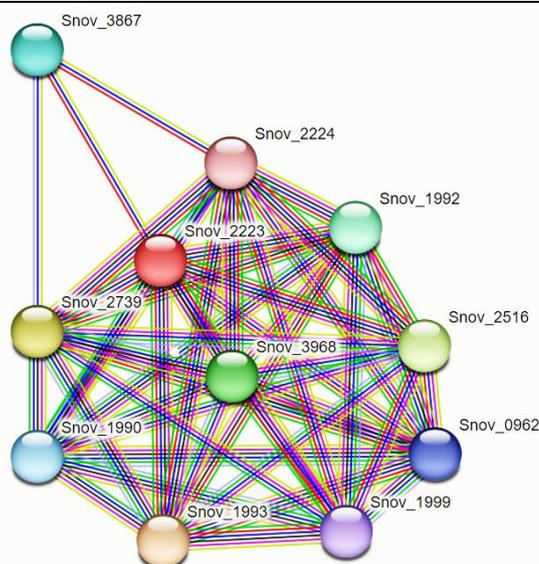


Figura suplementaria 2. Red de interacción de proteínas de la diguanilato ciclasa mutada (Snov_2223). En rojo se muestra la diguanilato ciclasa mutada. Los genes anotados corresponden a las siguientes proteínas: Snov_2224: diguanilato ciclasa. Snov_1992: Histidina quinasa híbrida multisensor. Snov_2516: Diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa. Snov_0962: Hpt sensor híbrido histidina quinasa. Snov_1999: sensor híbrido histidina quinasa. Snov_1993: regulador de respuesta. Snov_1990: Transductor de señales histidina quinasa. Snov_2739: diguanilato ciclasa. Snov_3968: diguanilato fosfodiesterasa. Snov_3867: Proteína de dominio EAL. <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bxRCY4otfQRB&sessionId=bMaaaKbgXmqS>

3. Niveles de expresión de los genes del sistema de reparación SOS

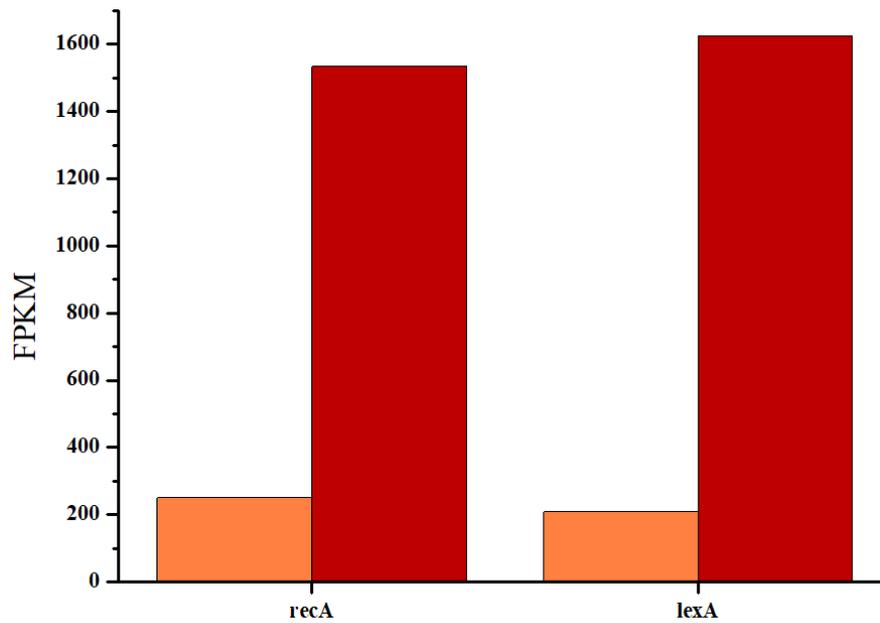


Figura suplementaria 3. Niveles de expresión (fpkm) de *recA* y *lexA* en las cepas silvestres STN1A (naranja) y STN1B (granate).

4. Red de interacciones del gen codificante para la pseudouridina sintasa mutada.

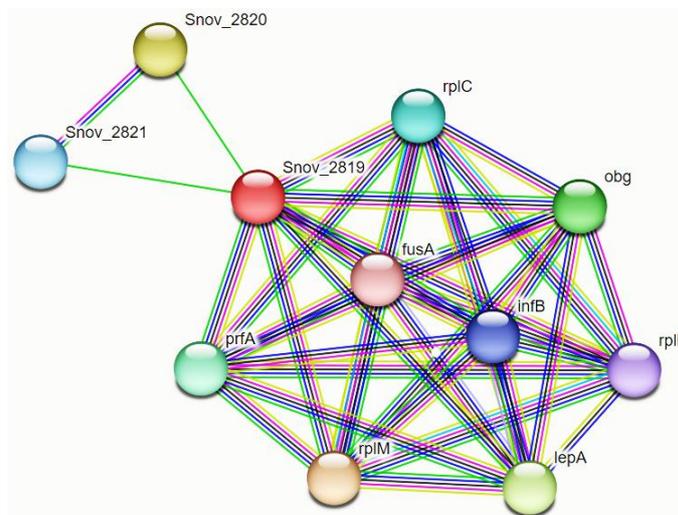


Figura suplementaria 4. Red de interacción de proteínas de la pseudouridina sintasa mutada (Snov_2819). En rojo se muestra la diguanilato ciclasa mutada. Los genes anotados corresponden a las siguientes proteínas: Snov_2820: Proteína de la familia de las patatinas Snov_2821: 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa. *rplC*: Proteína ribosómica de subunidad grande 13. *obg*: Proteína de unión a Gtp, *obg/cgtA*. *rplL*: Proteína ribosómica de subunidad grande 17/112. *lepA*: Proteína de unión a Gtp *lepA*. *rplM*: Proteína ribosómica de subunidad grande 113. *prfA*: Factor 1 de liberación de la cadena peptídica. *fusA*: Factor g de elongación de la traducción. *infB*: Factor if-2 de iniciación de la traducción. <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bQ1fP5pVXlcq&sessionId=bMaaaKbgXmqS>