

## ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y GENÓMICO DEL GÉNERO *SALINIVIBRIO*

**Autora:** Clara López Hermoso

**Directores:** Antonio Ventosa, Cristina Sánchez-Porro y Rafael R. de la Haba

**Centro de realización:** Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

El género *Salinivibrio* constituye un linaje filogenético separado dentro de la familia *Vibrionaceae* de acuerdo con el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. Actualmente, este género comprende cuatro especies, una de ellas con tres subespecies.

Tras numerosos muestreos y aislamientos, a partir de diferentes salinas de España y Puerto Rico, se obtuvo una colección de 70 cepas pertenecientes al género *Salinivibrio*. Además del estudio inicial basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S de estas cepas, junto con las 6 cepas tipo de las especies y subespecies del género, se llevó a cabo un estudio MLSA, basado en las secuencias de los genes *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoD*.

Los árboles filogenéticos obtenidos mostraron que estas 76 cepas se clasificaban en 4 filogrupos diferentes, con una sola cepa, perteneciente a la especie *Salinivibrio sharmensis*, que no pudo ser incluida en ningún filogrupo, constituyendo por tanto un filotipo. Con el objetivo de validar este estudio MLSA, se realizó un análisis de hibridación ADN-ADN (DDH) en 33 cepas seleccionadas, incluyendo a las cepas tipo de las especies y subespecies ya descritas del género. Los valores porcentuales de DDH para las cepas dentro del mismo filogrupo fueron siempre superiores al 70 %, confirmando que pertenecen a la misma especie, mientras que los valores de DDH entre filogrupos siempre mostraron valores inferiores al 70 %, lo que indica que cada filogrupo constituye una especie diferente. Tras esto, se realizó una correlación entre ambos estudios (MLSA y DDH), proponiéndose el 97 % de semejanza en la secuencia concatenada de los cuatro genes MLSA como valor de corte para la delimitación de especies en el género *Salinivibrio*.

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio MALDI-TOF MS, el cual pudo identificar tanto a nivel de género como de especie a todas las cepas objeto de estudio, así como la asignación a un filogrupo determinado acorde con los estudios previos realizados.

Además, se secuenciaron los genomas de estas 33 cepas del género *Salinivibrio*. Según los diferentes índices calculados (ANiB, ANIm, OrthoANI) así como los valores de DDH *in silico* y el análisis del pan-genoma, estas cepas se clasificaron en cinco especies diferentes pertenecientes al género *Salinivibrio*, correlacionándose con los filogrupos definidos anteriormente. Además, uno de los filogrupos no incluía ninguna de las especies previamente descritas, por lo que proponemos (tras la realización de un completo estudio polifásico), la descripción de una nueva especie con la denominación *Salinivibrio kushneri* sp. nov.

Finalmente se llevó a cabo la secuenciación y análisis del genoma completo de la cepa *Salinivibrio kushneri* AL184<sup>T</sup>, elegida como cepa tipo de la nueva especie *Salinivibrio kushneri* debido a su facilidad de crecimiento en el laboratorio. Esta secuenciación ha permitido la obtención de dos *contigs*, correspondientes a dos cromosomas, como ocurre en algunas, sino todas, las especies de *Vibrio*. Este genoma presenta un tamaño total de 3,4 Mb y contiene nueve operones ribosómicos completos ubicados en el cromosoma I, lo que puede justificar el rápido crecimiento de esta bacteria. Tras el estudio de la conservación del orden de los genes entre el genoma completo de *Salinivibrio kushneri* AL184<sup>T</sup> y una cepa representante de cada filogrupo y filotipo, se observó un elevado nivel de sintenia entre los miembros del género *Salinivibrio* a pesar de constituir taxones diferentes.

## METALOTIONEÍNAS DE *TETRAHYMENA*: BIODIVERSIDAD MOLECULAR, ADAPTACIÓN A METALES, CEPAS *KNOCKOUT* Y/O *KNOCKDOWN* Y POTENCIAL UTILIZACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN.

**Autora:** Patricia de Francisco Martínez

**Director:** Juan Carlos Gutiérrez Fernández

**Centro de realización:** Dpto. Microbiología-III. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

Las metalotioneínas (MTs) constituyen una superfamilia de proteínas citosólicas de baja masa molecular, capaces de quelar metales pesados a través de sus numerosos residuos de cisteína (Cys). Las del ciliado *Tetrahymena* muestran un especial interés ya que presentan características únicas frente a las MTs descritas en otros organismos. En esta tesis se han desarrollado tres aspectos en torno a las MTs de este microorganismo eucariota; un análisis completo de su biodiversidad molecular, experimentos de "evolución dirigida-adaptativa" frente al estrés por metales (adaptación genética, fisiológica y estructural) y un estudio de la regulación de la expresión de los genes *MT*, utilizando cepas *knockout* y/o *knockdown*, junto con el análisis de la expresión de genes que codifican factores de transcripción del tipo AP-1. Los dos últimos aspectos se desarrollaron en la especie *T. thermophila*.

Resumimos, a continuación, los hitos más importantes y novedosos alcanzados en esta tesis: 1- El análisis de las nuevas MTs ha confirmado el elevado grado de conservación de los patrones de Cys en las Cd-MTs, y el origen de nuevas isoformas génicas creadas por duplicación génica a partir de dos copias de otra preexistente. 2- La obtención de 3 cepas adaptadas a elevadas concentraciones de Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup>. 3- La adaptación al Cd<sup>2+</sup> conlleva un incremento en el número de copias del subfragmento cromosómico macronuclear que contiene los genes *MTT1* y *MTT3*, siendo este un proceso rápido y reversible. 4- La cepa adaptada al Pb<sup>2+</sup> muestra una de las alteraciones ultraestructurales más espectaculares, ya que desarrolla un sistema de super-acumulación del metal en vesículas citoplasmáticas, que luego expulsa al exterior en forma de nanopartículas metálicas. 5- Del análisis de expresión de los diferentes genes *MT* de *T. thermophila*, inferimos que: a)- El gen *MTT1* es clave en la adaptación al Cd<sup>2+</sup>. b)- El gen *MTT5* se puede considerar como un gen "de alarma", que se induce enormemente ante una situación de estrés, y a su vez promueve la expresión de otros genes *MT* (*MTT1*,

*MTT2* y/o *MTT4*) que también participan en la detoxificación. El gen *MTT5* tiene un papel clave en la adaptación al  $Pb^{2+}$ . c)- Las isoformas *MTT2* y/o *MTT4* actúan como Cu-MTs, teniendo un papel clave en la cepa Cu-adaptada. 6- El gen *MTT5* es un gen esencial para la célula, ya que no es posible obtener una cepa *knockout* estable para este gen, a diferencia del *MTT1*.

La disminución de un 97% en la ploidía del *MTT5* en una cepa *knockdown* parece compensarse con la creación de dos nuevas isoformas génicas (*MTT1a* y *MTT1b*), generadas por recombinación homóloga a partir de dos copias del gen *MTT1* original, las cuales se sobre-expresan en presencia de  $Cd^{2+}$ . Esta es la primera vez que se describe en microbiología un mecanismo

adaptativo de este tipo. 7- El factor de transcripción bZIP1 parece estar relacionado con la expresión del gen *MTT1*, el bZIP3 está relacionado con el gen *MTT5* y el bZIP4 lo está con los genes *MTT3* y *MTT2/4*. 8- La cepa Pb-adaptada es la mejor candidata para biorremediación de Pb, ya que elimina hasta un 90% del mismo en 24 horas.

### Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

SEM@foro publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM ([secretaria.sem@semicrobiologia.org](mailto:secretaria.sem@semicrobiologia.org)) o al Director Editorial ([m.sanchez@umh.es](mailto:m.sanchez@umh.es)) por correo electrónico, siguiendo el formato: Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y Resumen (máximo, unas 200 palabras).

SEM@foro se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la Microbiología.

Los resúmenes de tesis dirigidas por miembros de la SEM no serán publicados en esta sección. Se recomienda enviar a la sección "Nuestra Ciencia" un resumen de alguno de los artículos producidos por la tesis.

### Nuevos socios de la SEM

- Arboleya, Silvia
- Bonofiglio, Laura
- Borgognone, Alessandra
- Coll García, Guillem
- Egado Lizán, Pilar
- Esperanza Llera, Marta
- Fenoy Rodríguez, Soledad
- García Angulo, Daniel
- García Huete, Samuel
- Gutiérrez Macías, Laura
- Hermosa Prieto, María Rosa
- Hernández Gardiol, Daniel
- Jiménez Volkerink, Sara Nienke
- Lindo, Laura
- Magnet Dávila, Ángela
- Mestre Martín, Mireia
- Morcillo Parra, María de los Ángeles
- Navarro de la Torre, Salvadora
- Ortega Campayo, Víctor
- Pessela Jao, Benevides Costa
- Ponce Gordo, Francisco
- Puente García, Jose Luis
- Quintela Alonso, Pablo
- Rodríguez Giner, Caterina
- Sánchez Parra, Beatriz
- Santos Romero, Beatriz
- Seoane Méndez, Marta
- Vicente Lasa, Ana

**Altas desde el 25/05/2017 hasta 09/11/2017**