



Instituto de
Recursos Naturales
y Agrobiología
de Sevilla



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS. VIDA MICROBIANA MÁS ALLÁ DE SUS CONDICIONES ÓPTIMAS

Memoria que presenta

José Antonio Delgado Romero

para optar al título de Doctor en Biología Integrada

En Sevilla, a.....de.....de 2021

**MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS. VIDA MICROBIANA MÁS
ALLÁ DE SUS CONDICIONES ÓPTIMAS**

Visado en Sevilla, a de de 2021

EL DIRECTOR

Dr. D. JUAN MIGUEL GONZÁLEZ GRAU
Investigador científico del CSIC
IRNAS-CSIC

EI TUTOR

Dr D. FERNANDO PUBLIO MOLINA HEREDIA
Profesor titular de la Universidad de Sevilla
Facultad de Biología



DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

Certifica: Que la presente memoria de investigación titulada “MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS, VIDA MICROBIANA MÁS ALLÁ DE SUS CONDICIONES ÓPTIMAS”, presentada por D. JOSÉ ANTONIO DELGADO ROMERO para optar al grado de Doctor en BIOLOGÍA INTEGRADA, ha sido realizada en el Departamento de Biogeoquímica, Ecología Vegetal y Microbiana, bajo la dirección del Dr. D. JUAN MIGUEL GONZÁLEZ GRAU, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a de.....de 2021.

El siguiente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto CGL2014-58762-P del Plan Nacional de I+D+i, Proyectos de Excelencia 2015-2017, dentro del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador.



ÍNDICE

ÍNDICE.	VII
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.	XI
RESUMEN.	XIV

Capítulo 1: Introducción. 1

1.1. Extremófilos.	7
1.2. Termófilos.	8
1.3. <i>Geobacillus</i> y microorganismos afines.	13
1.4. Objetivos.	18
1.5. Bibliografía.	21
1.6. Anexo.	52

Capítulo 2: Respuesta fisiológica de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero. 58

2.1. Resumen.	59
2.2. Introducción.	60
2.3. Materiales y métodos.	70
2.3.1. Quimiostato.	70
2.3.2. Retentostato.	72
2.3.3. Medidas.	72
2.3.4. Cálculo de la tasa de crecimiento en un cultivo continuo.	74
2.4. Resultados.	78
2.4.1. Crecimiento y viabilidad.	80

2.4.2. Morfología celular.	83
2.5. Discusión.	86
2.5.1. Crecimiento en situaciones limitantes.	86
2.5.2. Biovolumen celular en relación a la tasa de crecimiento.	89
2.6. Conclusiones.	91
2.7. Bibliografía.	92
Capítulo 3. Análisis genómico de la cepa <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> 23.6.	100
3.1. Resumen.	101
3.2. Introducción.	102
3.2.1. Genómica.	102
3.2.2. Transferencia horizontal de genes.	105
3.2.3. Genómica en <i>Geobacillus</i> y <i>Parageobacillus</i>	110
3.3. Materiales y métodos.	114
3.3.1. Muestreo.	114
3.3.2. Identificación, secuenciación y anotación de la cepa.	114
3.3.3. Pan-genoma.	117
3.3.4. Clasificación funcional de genes ortólogos (COGs).	118
3.3.5. Análisis GhostKOALA del pangenoma.	119
3.3.4. Usos de codones.	120
3.4. Resultados.	121
3.4.1. Características generales del genoma.	121
3.4.1.1. Tmp1.	123
3.4.1.2. Tmp2.	127
3.4.1.3. Tmp3.	129
3.4.1.4. Tmp4.	133

3.4.2. Pan-genoma.	138
3.5. Discusión.	148
3.6. Conclusiones.	152
3.7. Bibliografía.	154
3.8. Anexos.	166

Capítulo 4: Análisis transcripcional de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero. 170

4.1. Resumen.	171
4.2. Introducción.	172
4.3. Materiales y métodos.	180
4.3.1. Quimiostato y retentostato.	180
4.3.2. Análisis transcriptómico.	182
4.4. Resultados.	185
4.4.1. Análisis del transcriptoma.	187
4.4.2. Regulación transcripcional de las rutas metabólicas generales.	192
4.4.3. Regulación transcripcional de las rutas secundarias.	195
4.4.4. Análisis transcripcional de Tmp2, Tmp3 y Tmp4.	197
4.5. Discusión.	202
4.6. Conclusiones.	210
4.7. Bibliografía.	211
4.8. Anexo.	219

Capítulo 5: Respuesta fisiológica y transcripcional de <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> 23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C).	224
5.1. Resumen.	225
5.2. Introducción.	226
5.3. Materiales y métodos.	234
5.4. Resultados.	239
5.4.1. Análisis del transcriptoma.	246
5.4.2. Análisis transcripcional de Tmp2, Tmp3 y Tmp4.	253
5.5. Discusión.	256
5.6. Conclusiones.	264
5.7. Bibliografía.	265
Capítulo 6: Discusión y conclusiones generales.	279
6.1. Discusión general.	280
6.2. Conclusiones generales.	289
6.3. Bibliografía.	291

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Lista de Tablas:

Tabla 3.1.	111
Tabla 3.2.	113
Tabla 3.3.	117
Tabla 3.4.	119
Tabla 3.5.	125
Tabla 3.6.	132
Tabla 3.7.	136-137
Tabla 3.8.	143
Tabla 4.1.	187
Tabla 5.1.	247

Lista de Figuras:

Figura 1.1.	3
Figura 1.2.	4
Figura 1.3.	9
Figura 1.4.	12
Figura 1.5.	16
Figura 2.1.	64
Figura 2.2.	66
Figura 2.3.	67
Figura 2.4.	68
Figura 2.5.	81

Figura 2.6.	82
Figura 2.7.	84
Figura 2.8.	85
Figura 2.9.	87
Figura 2.10.	90
Figura 3.1.	104
Figura 3.2.	105
Figura 3.3.	107
Figura 3.4.	122
Figura 3.5.	123
Figura 3.6.	125
Figura 3.7.	128
Figura 3.8.	129
Figura 3.9.	130
Figura 3.10.	133
Figura 3.11.	134
Figura 3.12.	135
Figura 3.13.	140
Figura 3.14.	141
Figura 3.15.	144
Figura 3.16.	146
Figura 3.17.	147
Figura 4.1.	178
Figura 4.2.	183
Figura 4.3.	185
Figura 4.4.	186
Figura 4.5.	189
Figura 4.6.	190

Figura 4.7.	191
Figura 4.8.	193
Figura 4.9.	196
Figura 4.10.	198
Figura 4.11.	199
Figura 4.12.	201
Figura 5.1.	227
Figura 5.2.	229
Figura 5.3.	236
Figura 5.4.	241
Figura 5.5.	243
Figura 5.6.	244
Figura 5.7.	247
Figura 5.8.	249
Figura 5.9.	250
Figura 5.10.	252
Figura 5.11.	254
Figura 5.12.	255

Anexos:

Tabla suplementaria 1.1.	52-57
Tabla suplementaria 3.1.	166-167
Tabla suplementaria 3.2.	168-169
Tabla suplementaria 4.1.	219-223
Tabla suplementaria 5.1.	274-278

RESUMEN

El estudio de los microorganismos termófilos ha tenido un gran auge en las últimas décadas debido a la aplicación de sus enzimas y moléculas en procesos biotecnológicos. En la actualidad, existe un déficit en cuanto a comprender cómo viven los microorganismos en la naturaleza y sus estrategias de persistencia y adaptación. La presente tesis estudia la vida de un microorganismo termófilo aislado del suelo, *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6, mas allá de la condiciones consideradas óptimas para su crecimiento. El desarrollo de bioreactores en continuo (quimiostato) con retención de células (retentostato), nos ha permitido cultivar la cepa 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero ($0,0002\text{ h}^{-1}$). Estas condiciones asumimos que son frecuentes en suelos, por la limitación de nutrientes, y por la influencia de ciclos diarios de temperatura ($60 - 20^\circ\text{ C}$). La secuenciación del genoma ha identificado 4 moléculas de ADN circular: El genoma principal o Tmp1, dos plásmidos, Tmp2 y Tmp3, y un bacteriófago, Tmp4, Su genoma ha servido de referencia para los análisis del transcriptoma. El pangenoma de la cepas de *P. thermoglucosidaius* es abierto y ha identificado puntos calientes de transferencia horizontal de genes llevados a cabo a través de diferentes estrategias: transformación, conjugación y traducción. El análisis del transcriptoma a tasas de crecimiento cercanas a cero reveló una gran sobreexpresión de genes relacionados con la obtención y búsqueda de energía, mecanismos de defensa y plasticidad genómica, permitiendo la adaptación de *P. thermoglucosidasius* 23.6 a nuevos ambientes y manteniendo su viabilidad. A bajas temperaturas (20° C) y tasa de crecimiento reducida (0.025h^{-1}) hay una intensa respuesta transcripcional haciendo posible que la cepa 23.6 mantenga un metabolismo activo a bajas temperaturas que le permite responder rápidamente cuando las condiciones vuelvan eventualmente a ser óptimas para su crecimiento. Esta tesis contribuye a comprender el comportamiento de los microorganismos en ambientes naturales, y específicamente de la especie termófila modelo *P. thermoglucosidasius*, que sobrevive en condiciones consideradas adversas para su crecimiento manteniendo su viabilidad y persistencia en la naturaleza.

Capítulo 1

Introducción

Capítulo 1

La mayor diversidad y abundancia de organismos en nuestro planeta está constituida por los microorganismos. En tan solo 10g de suelo se pueden encontrar unas 10^{11} bacterias, una cifra similar al número de estrellas que hay en la Vía Láctea (Curtis et al., 2002; González et al., 2012). Además, los microorganismos regulan el buen funcionamiento de los ecosistemas a través de su papel esencial en los ciclos biogeoquímicos (Whitman et al., 1998; Uroz et al., 2009).

El avance de la microbiología ha ido de la mano de nuevos métodos para detectar y comprender la presencia de los microorganismos en diversos ambientes y, en los últimos años, llegar a entender la enorme diversidad microbiana existente en nuestro planeta (Pedros-Alió, 2006).

Desde la época de Aristóteles hasta la década de los 60, los investigadores se basaban en aspectos morfológicos, fisiológicos o ambos para clasificar taxonómicamente los microorganismos. Sin embargo, los microorganismos, en parte por su reducido tamaño (generalmente un micrómetro de diámetro), son difíciles de clasificar en base a estas características sobretodo por la enorme diversidad que presentan.

A finales de los 60, Woese sugirió que la manera mas fiable de diferenciar y clasificar las formas de vida de nuestro planeta (desde las bacterias mas simples hasta los animales mas complejos) serían las variaciones existentes en genes universales (presentes en todos los organismos), como por ejemplo la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU rRNA).

En 1977, Woese y Fox indicaron que toda forma de vida se puede clasificar en uno de los tres grandes Dominios que propusieron: Eucariotas, Eubacterias y Archeobacterias (Woese y Fox, 1977). Demostrando así por primera vez que las formas de vida pueden analizarse filogenéticamente y existe una relación evolutiva entre ellas.

Fue en 1990 cuando Woese y sus colaboradores propusieron los tres grupos filogenéticos principales, o Dominios, asignándoles su designación actual: Eucarya, Bacteria y Archaea (Figura 1.1) (Woese et al., 1990).

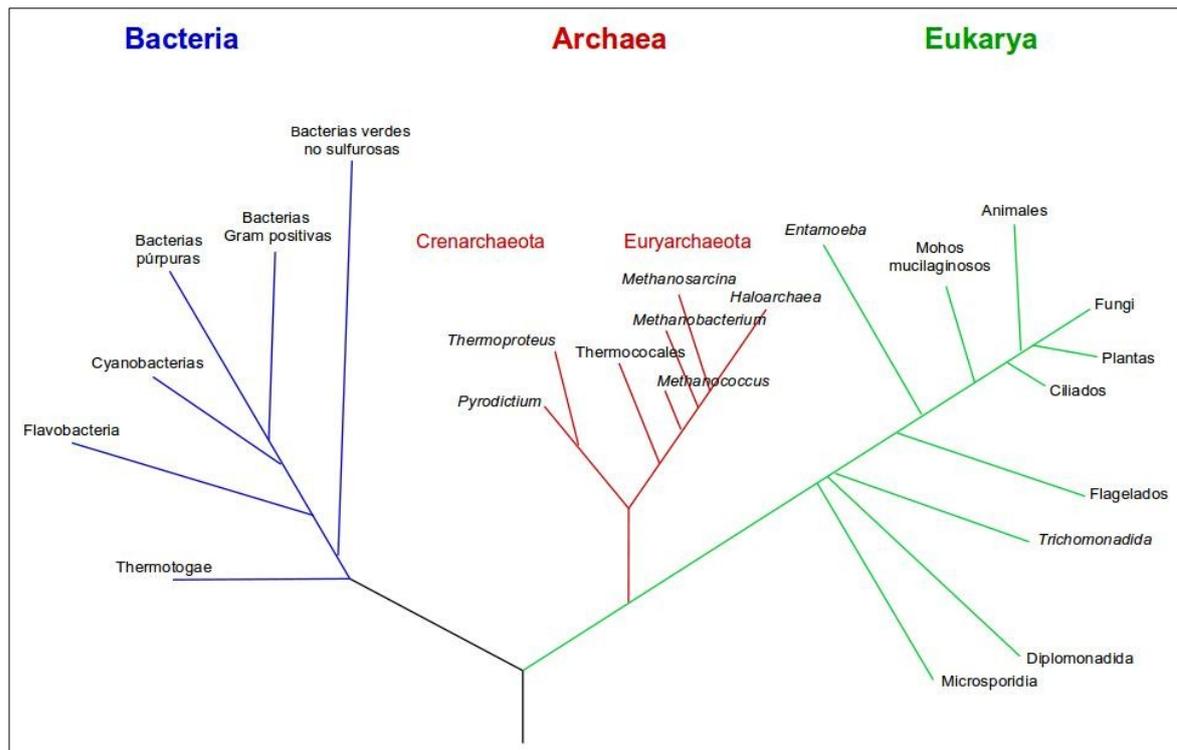


Figura 1.1. Árbol filogenético simplificado de los organismos vivos basado en las secuencias de genes de las subunidades pequeñas del ARN ribosomal (modificado del modelo propuesto por Woese, 1990).

Según se plantea en el árbol filogenético propuesto por Woese y sus colaboradores los genes se transmiten verticalmente de generación en generación. Sin embargo, hoy en día se sabe que la herencia vertical no es el único proceso evolutivo generado por la transferencia de material genético. La

Capítulo 1

transferencia horizontal de genes (transferencia de material genético entre distintas especies o grupos taxonómicos) afecta muy significativamente a la evolución de los microorganismos, transformándose el modelo de árbol filogenético inicial (Figura 1.1), en uno mucho más complejo en el que se proponen un gran número de interacciones entre las distintas líneas evolutivas tomando el aspecto de red (Figura 1.2) (Doolittle, 2000).

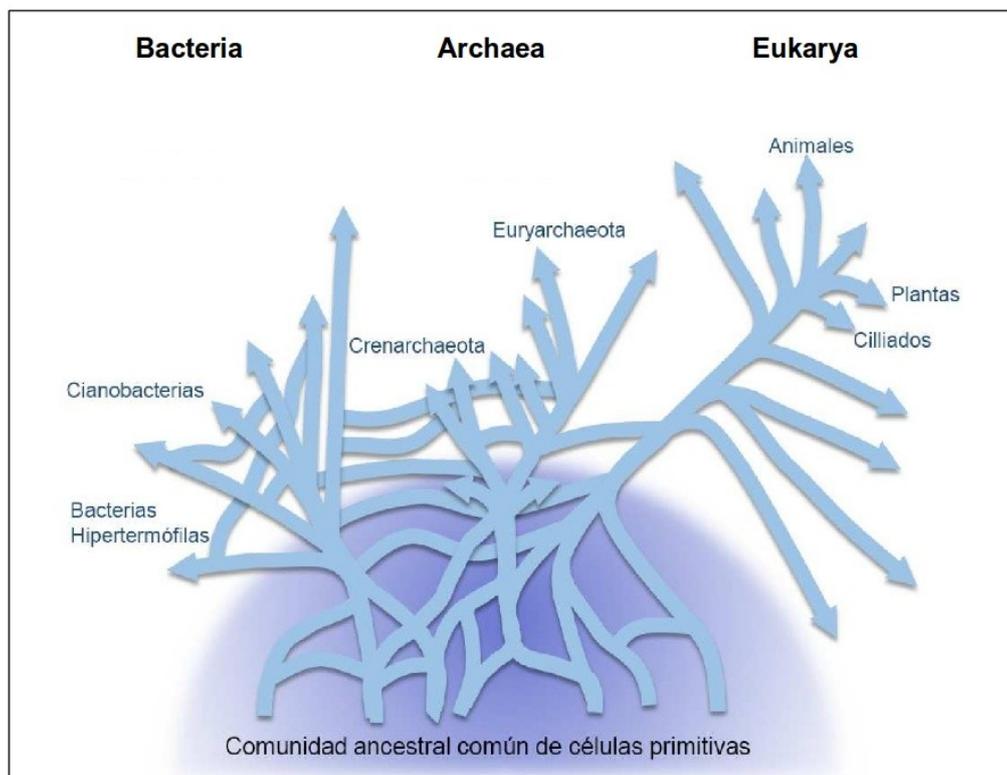


Figura 1.2. Árbol filogenético simplificado que incluye interacciones evolutivas por transferencia horizontal de genes en los seres vivos (Doolittle, 2000).

A lo largo de la evolución, los microorganismos han sido capaces de colonizar prácticamente todo tipo de ambientes en nuestro planeta incluyendo un rango amplio de condiciones de temperatura, pH, salinidad, etc. Esta colonización ha sido posible, en parte gracias a la gran diversidad metabólica y fisiológica alcanzada por los microorganismos, un aspecto muy importante a la hora de comprender la diversidad del mundo microbiano que no se restringe únicamente a la diversidad específica, sino que va mas allá y se complementa con un amplio rango de posibilidades metabólicas y modos de vida.

El camino seguido por la Microbiología hasta alcanzar los niveles de conocimiento actuales ha sido lento y difícil, generalmente ligado a nuevos desarrollos metodológicos. Hasta los años 70, los microorganismos se pensaban que eran escasamente diversos debido a que únicamente se detectaban al cultivarlos en el laboratorio. En la siguiente década comenzaron a teñirse los microorganismos con colorantes fluorescentes (naranja de acridina, DAPI, etc.) dirigidos a la tinción de las proteínas o ácidos nucleicos de las células (Hobbie et al., 1977; Porter y Feig, 1980). De este modo, se pudieron enumerar las bacterias presentes en distintos ambientes viéndose que eran enormemente abundantes. Por ejemplo, un mililitro de agua mineral potable contiene aproximadamente un millón de bacterias y un gramo de suelo puede contener alrededor de 10^{10} bacterias. Sin embargo, la diversidad existente en esas abundantes comunidades microbianas se creía que era reducida a unas pocas especies. Estas especies eran aquellas fácilmente cultivables en el laboratorio y clasificadas taxonómica y metabólicamente. Sin embargo, con el uso de técnicas de Biología Molecular se comenzó a descubrir una elevada diversidad de microorganismos de modo que se observó que no sólo eran muy abundantes si no también enormemente diversos. Con la introducción de las técnicas de secuenciación masiva o “new generation sequencing” (NGS) se ha podido observar que la diversidad microbiana es enorme y las últimas técnicas

Capítulo 1

disponibles a penas nos permiten evaluar la verdadera dimensión de esta gran diversidad. No obstante, aún hoy en día únicamente somos capaces de cultivar aproximadamente el 1% de los microorganismos presentes en muestras ambientales siguiendo métodos generales de cultivo, lo que sugiere que aún queda por estudiar una gran fracción de la enorme diversidad microbiana existente en nuestro planeta (Hugenholtz et al., 1998; González et al., 2003).

Con el desarrollo de métodos de secuenciación de última generación (NGS) las técnicas genómicas han experimentado un enorme desarrollo que están permitiendo en la actualidad el estudio y análisis detallado de los genomas bacterianos, incluso ofreciendo la posibilidad de analizar bacterias no cultivadas. Una vez capaces de acceder al genoma de los microorganismos, podemos comenzar a analizar el origen de sus genes y la evolución de los distintos microorganismos. Las técnicas genómicas abren las puertas al análisis de la expresión de los genes que contienen los genomas microbianos. Este es el campo de la transcriptómica que nos permite evaluar los niveles de expresión a nivel global de las células bajo condiciones específicas de crecimiento. Los avances de NGS también han servido para impulsar enormemente los estudios transcriptómicos de expresión génica.

A pesar de los avances actuales y los nuevos conceptos de abundancia y diversidad en Microbiología, aún no somos capaces de determinar eficientemente el crecimiento de las bacterias en ambientes naturales. Debido al desconocimiento del crecimiento bacteriano en la naturaleza, el concepto actual se basa en la creencia de que los microorganismos alternan condiciones de abundancia de nutrientes o condiciones favorables con períodos de escasez nutricional o condiciones desfavorables (Zambrano et al., 1993; Morita, 1997). En relación a este concepto, la frecuencia y duración de las condiciones limitantes (adversas o bajo estrés) parecen dominar la vida microbiana en su entorno natural (Zambrano et al., 1993; Morita, 1997). Sin embargo, el mundo microbiano en

condiciones que limitan su crecimiento es uno de los aspectos peor comprendidos de la Microbiología actual. Los mecanismos o estrategias utilizadas por los microorganismos para mantener su persistencia en el medio ambiente es un hueco de conocimiento que requiere investigación.

1.1 Extremófilos

La palabra extremofilo es un neologismo que fue acuñada en 1974 por el investigador MacElroy (MacElroy, 1974). Es un término híbrido en el que se unen la palabra del Latín *Extremus* (más externo, distante o alejado) y la palabra Griega *filia* (atracción, afecto por) resultando su significado en “amigo de condiciones extremas”

Debido a la alta diversidad microbiana y a su versatilidad metabólica los microorganismos son capaces de vivir y desarrollarse en una gran variedad de hábitats y condiciones (Cases y De Lorenzo, 2002). El cuerpo humano (por su importancia médica) y los ecosistemas marinos y de agua dulce (por sus implicaciones ambientales) han sido estudiados en profundidad, sin embargo, otros ambientes como aquellos más extremos (en comparación con los parámetros fisiológicos del ser humano) han permanecido durante muchos años prácticamente desconocidos ya que inicialmente se consideraron como zonas exentas de vida.

Los procariotas son los organismos extremófilos por excelencia aunque también se incluyen como extremos a algunas especies de protozoos, algas y hongos. Cuando las condiciones de los entornos extremos se vuelven mas exigentes los microorganismos dominantes son los procariotas (Horikoshi, 1998).

Capítulo 1

Desde un punto de vista antropocéntrico las condiciones extremófilas se definen generalmente como: temperaturas inferiores a 10° C (**psicrófilos**) y superiores a 40° C (**termófilos**); pH inferior a 5.0 (**acidófilos**) y superior a 8.0 (**alcalófilos**); presión superior a 1 atmósferas (**piezófilos**); concentración de sal superior a 30 g/L (**halófilos**) y baja disponibilidad de agua (condiciones de sequedad): actividad de agua inferior a 0.9 (**xerófilos**), entre otras. Cualquier microorganismo que requiera algunas de esas condiciones para vivir y crecer se considera extremófilo (Vorgias y Antranikian, 2004). Cuando un microorganismo necesita más de una condición extrema se denomina poliextremófilo (Canganella y Wiegel, 2010).

Los microorganismos extremófilos tienen una gran importancia por su alto potencial biotecnológico ya que atraen gran interés por sus posibles aplicaciones. Por ejemplo, proporcionan una variedad de biomoléculas como enzimas y compuestos que son únicos en la naturaleza (Vorgias y Antranikian, 2004) y presentan elevada estabilidad y durabilidad, aspectos de gran trascendencia en la industria biotecnológica (Vieille and Zeikus, 2001).

1.2 Termófilos

Los organismos termófilos son aquellos que crecen en condiciones de alta temperatura. La primera bacteria termófila descrita se atribuye a Miquel en 1878 y se trataba de un bacilo aislado del río Sena (Miquel, 1888), aunque en 1866 Brewer describió *Chlamydo bacterias* termófilas en geiseres de California (Brewer, 1866).

Los eucariotas pluricelulares generalmente no sobreviven a temperaturas superiores de 60°C (Tansey and Brock, 1972). La ameba *Echinamoeba thermanum* es de los pocos eucariotas que crecen de manera óptima en fuentes termales a 50° C (Baumgartner et al., 2003). A finales del siglo XIX y principios del siglo XX

se publicaron numerosos trabajos donde se describieron que las formas mas habituales de termófilos son los bacilos y tienen una naturaleza ubicua debido a la gran variedad de hábitats en los que han sido aislados (Morrison y Tanner, 1922). Se propuso el término termotolerante, para bacterias que crecían tanto a altas como a bajas temperaturas, reservando el término termófilos para bacterias que crecen exclusivamente a temperaturas altas (Schillinger, 1898).

En la actualidad los microorganismos se suelen clasificar según su temperatura óptima de crecimiento en psicrófilos (temperatura óptima $\leq 20^\circ\text{C}$), mesófilos (temperatura óptima entre 20 y 45°C), termófilos (temperatura óptima entre 45 y 60°C), termófilos extremos (temperatura óptima entre 60 y 80°C) e hipertermófilos (temperatura óptima $\geq 80^\circ\text{C}$) (Figura 1.3)

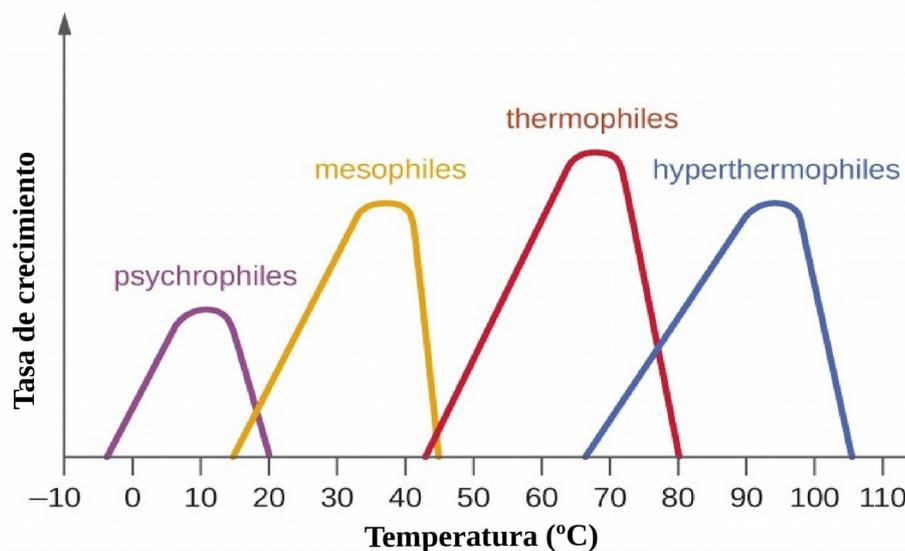


Figura 1.3. Clasificación de los microorganismos según su rango de temperatura de crecimiento.

(<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/temperature-and-microbial-growth/>).

Capítulo 1

El descubrimiento en 1969 de la bacteria *Thermus aquaticus* en el Parque Nacional de Yellowstone (Brock y Freeze, 1969) generó un gran interés en el estudio de los microorganismos termófilos y especialmente en el campo de la biotecnología debido al interés que despertó como fuente de enzimas termoestables, producción de exopolisacáridos, bacteriocinas etc. La ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (taq) es un componente esencial en biología molecular e hizo posible el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que tan de moda está hoy en día con el diagnóstico de coronavirus. Debido al gran potencial de los microorganismos termófilos y sus enzimas en procesos industriales, en las últimas décadas ha habido gran interés por la búsqueda de nuevos microorganismos termófilos.

Existen diversos hábitats en el que los microorganismos termófilos pueden desarrollarse (Mehta y Satyanarayana, 2013), algunos son naturales como las zonas volcánicas con actividad geotérmica, tanto superficiales (fumarolas, solfataras, fuentes termales y geysers) como subterráneas (reservas de petróleo, lagos y acuíferos, marinas y profundidades abisales) y suelos, sedimentos y cualquier superficie (hojas) calentada por la radiación solar. Otros ambientes se forman de forma natural aunque son aprovechados por el hombre como es el caso de las pilas de compost, y otros ambientes que son, o pueden ser, generados como consecuencia directa de la actividad humana y su industria. Es el caso de plantas de tratamiento de desechos en el rango termófilo, sistemas de calentamiento de agua, producción de productos químicos, procesos y efluentes térmicos de plantas de energía, procesos de limpieza y calentamiento en reactores y conductos de plantas de producción de alimentos y medicamentos entre otros entornos.

Los hábitats con temperaturas altas pueden presentar esas elevadas temperaturas de forma prolongada en el tiempo (fuentes termales, reservas de petróleo, etc) o variable, registrándose altas temperaturas en momentos puntuales de forma ocasional o periódica (superficies calentadas por la radiación solar, diversos procesos industriales que requieren calentamientos periódicos, etc.).

El suelo es uno de los hábitats con mayor diversidad microbiana, probablemente, debido a la variabilidad ambiental y a la gran heterogeneidad en su estructura. El clima influye directamente en el suelo, principalmente en su superficie (primeros 10 cm), a través de los cambios estacionales y los ciclos diarios. Dependiendo de la zona geográfica (latitud y altitud) estos cambios pueden ser mas o menos extremos sobre la superficie del suelo (Santana y González, 2015).

Mas del 55 % de las tierras emergidas de nuestro planeta se encuentran a latitudes menores de 40° N y 40° S. En esta zona se registran temperaturas elevadas de forma periódica y frecuente a lo largo del año (González et al., 2014) debido a que la incidencia de la radiación solar es mas intensa. En nuestro grupo de investigación hemos comprobado (Portillo et al., 2012) que a temperaturas ambientales de incluso menos de 30° C la superficie de suelos y sedimentos con escasa cobertura vegetal puede alcanzar temperaturas superiores de 45° C. Esta temperatura es adecuada para el desarrollo de microorganismos termófilos como es el caso de los representantes del género *Geobacillus* y otros géneros relacionados filogenéticamente (González et al., 2014).

Un ejemplo es la Península Ibérica donde existen suelos (por ejemplo, Sevilla a 37° N) expuestos aproximadamente un tercio del año a temperaturas ambientales superiores a los 30° C. En otros suelos en latitudes superiores a 40° N (ejemplo, Galicia, provincia de Lugo 42° N) esa frecuencia de altas temperaturas es muy inferior y sólo representan el 1,5% de los días del año (Figura 1.4)

Capítulo 1

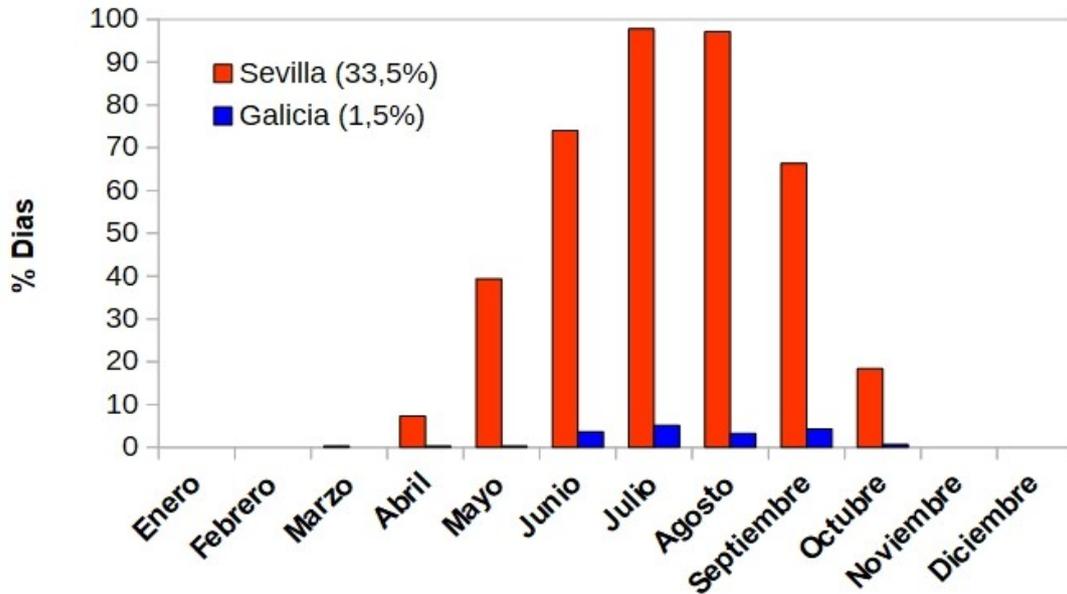


Figura 1.4. Porcentajes de días en los últimos 10 años en los que las temperaturas ambientales superan los 30° C para Sevilla y Galicia (provincia de Lugo).

Se ha considerado que eventos de altas temperaturas en la superficie de los suelos y sedimentos inhiben a numerosos microorganismos, induciendo la parada de la gran mayoría de procesos biológicos (Townsend et al., 1992). La presencia de microorganismos termófilos en suelos y sedimentos se conoce desde principios del siglo XX (Morrison y Tanner, 1922), pero en los últimos años gracias al desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva y al desarrollo de métodos de cultivo, estas bacterias han sido detectadas en todos los suelos estudiados (Marchant et al., 2002; Portillo et al., 2012; Santana et al., 2013; Zeigler, 2014). Los suelos son ambientes generalmente considerados moderados por su temperatura pero en la actualidad sabemos que las capas superiores de los suelos ofrecen condiciones periódicas adecuadas para el desarrollo de estos

termófilos (Santana y González, 2015). Sin embargo, aún se desconoce como estas bacterias termófilas, ubicuas en suelos, persisten en este entorno natural. El género bacteriano más representativo de estas bacterias termófilas del suelo es *Geobacillus* aunque se sabe que existen otros géneros, próximos filogenéticamente, que también viven en condiciones similares. Recientemente se ha citado que su contribución a los ciclos de carbono, nitrógeno y fósforo es significativa en periodos de temperaturas altas (Portillo et al., 2012), incluso se han propuesto como agentes biofertilizantes naturales (González y Portillo, 2010 a,b,c; Santana et al. 2013) y solubilizadores de fosfatos (González et al., 2016).

En la actualidad, debido a que nos encontramos inmersos en un marco de cambio climático, donde eventos de altas temperaturas serán cada vez mas frecuentes, unido a que los suelos son el mayor reservorio de materia orgánica (Jones et al., 2005; Davidson y Janssens, 2006), cabe esperar que los microorganismos extremófilos, y particularmente los termófilos, tengan una creciente relevancia en los ciclos biogeoquímicos naturales y en el balance de carbono suelo-atmósfera (Davidson y Janssens, 2006; Conan et al., 2011).

1.3 *Geobacillus* y microorganismos afines

Donk (1920) aisló por primera vez una bacteria formadora de esporas capaz de crecer a 65° C a partir de una muestra de maíz en conserva deteriorada. Esta bacteria fue clasificada como una nueva especie denominada *Bacillus stearothermophilus*. Con el paso del tiempo, esta especie se convirtió en un “cajón de sastre” donde se incluyeron muchas cepas aeróbicas, termófilas y formadoras de esporas.

En 1991, Ash y colaboradores, (1991) analizaron comparativamente las secuencias de genes ARNr 16s de 51 cepas de *Bacillus* termófilos y propusieron

Capítulo 1

un reordenamiento del género, agrupando a estas cepas en una línea evolutiva divergente (grupo 5) distinta de otras especies del género *Bacillus*.

En 2001, Nazina y col. (2001) propusieron que el llamado grupo 5 debería incluirse en un nuevo género que fue denominado *Geobacillus* y estaba inicialmente compuesto por ocho especies. Aliyu y colaboradores (2016) basándose en la comparación de secuencias del gen *recN* y de los genomas de 63 cepas originalmente asignadas al género *Geobacillus* sugirieron que el género debería dividirse en dos géneros distintos:

- **Género *Geobacillus***: Formado por once especies. Especie tipo *Geobacillus stearothermophilus*.
- **Género *Parageobacillus***: Formado por cinco especies. Especie tipo *Parageobacillus thermoglucosidasius*.

En la actualidad esta nueva clasificación está pendiente de ser definitivamente aprobada por el comité taxonómico de microorganismos procariontes pero esta diferenciación se utilizará en este trabajo con la previsión de que estos géneros queden adecuadamente clasificados de forma definitiva.

La palabra *Geobacillus* se divide en dos términos, la raíz Geo (geos) procedente del Griego que significa “Tierra” y Bacilo en latín Bacillus cuyo significado es “bastón”. El significado amplio de la palabra *Geobacillus* es “bacteria de la tierra”. El prefijo Griego Para significa “próximo, junto a”, el significado de *Parageobacillus* es, “cercano a *Geobacillus*”.

Basándonos en la descripción realizada por Nazina y colaboradores (2001) las células vegetativas de estos géneros son bastones que se pueden encontrar solos o formando cadenas cortas. Pueden ser inmóviles o tener flagelos peritricos.

La tinción Gram puede variar entre positiva y negativa aunque su pared celular tiene una estructura típica de Gram-positiva. Tienen la capacidad de formar una endospora cilíndrica o elipsoidal ubicada terminal o subterminalmente. Son aerobios o anaerobios facultativos y, generalmente, el oxígeno es el aceptor final de electrones aunque en algunas especies puede ser sustituido por el nitrato. Todas las especies han sido catalogadas como quimiorganotrófos termófilos obligados. El rango de temperatura de crecimiento en cultivos se encuentra entre 37 y 80°C con óptimos entre 50 y 60° C. Son neutrófilos con un pH óptimo de 6.2 a 7.5 y pueden crecer en un rango de pH entre 5.0 y 9.0. En cuanto a los requerimientos nutricionales de las especies analizadas no son exigentes, las cepas crecen en medios ricos con substratos complejos (por ejemplo, extracto de levadura y peptona) y en general no requieren factores de crecimiento adicionales. La mayoría de las cepas producen catalasas y son sensibles a lisozyima.

Estos géneros han sido estudiados ampliamente debido a su interés industrial y ambiental: producción de enzimas termoestables (Uma y Satyanarayana, 2003), exopolisacáridos (Wang et al., 2021) y bacteriocinas (Vaičikauskaitė et al., 2019); metabolización de herbicidas (McMullan et al., 2004) y compuestos halogenados (Moxley et al., 2019), se han propuesto como fertilizantes naturales (González y Portillo, 2010 a,b,c; Santana et al. 2013), y se han citado por ser capaces de inactivar el sistema quorum sensing (Seo et al., 2011) de algunas bacterias. También han tenido gran relevancia en las industrias de alimentos enlatados y en la industria láctea, ya que son los responsables del deterioro agrio de alimentos enlatados y productos como la leche evaporada o preparaciones de leche para bebés, generalmente por contaminación de los procesos de esterilización o higienización en los conductos industriales.

Capítulo 1

Una de las características más controvertidas de los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus* es su ubicuidad. Se han aislado especies en los siete continentes y en muy distintos ambientes (figura 1.5). Los científicos han podido aislar o detectar especies de estos géneros de muestras de una gran variedad de orígenes naturales y generados por el hombre (Tabla suplementaria 1.1). Se han identificado tanto en ambientes calientes (aguas termales, suelos geotérmicos, compost, yacimientos de petróleo, minas, chimeneas hidrotermales, superficies calentadas por el sol, calentadores de agua, planta de desechos urbanos etc.) como en ambientes fríos o templados (aire, suelos de latitudes y altitudes altas, sedimentos marinos y de ríos, alimentos, algas, plantas, industria alimentaria, etc.).

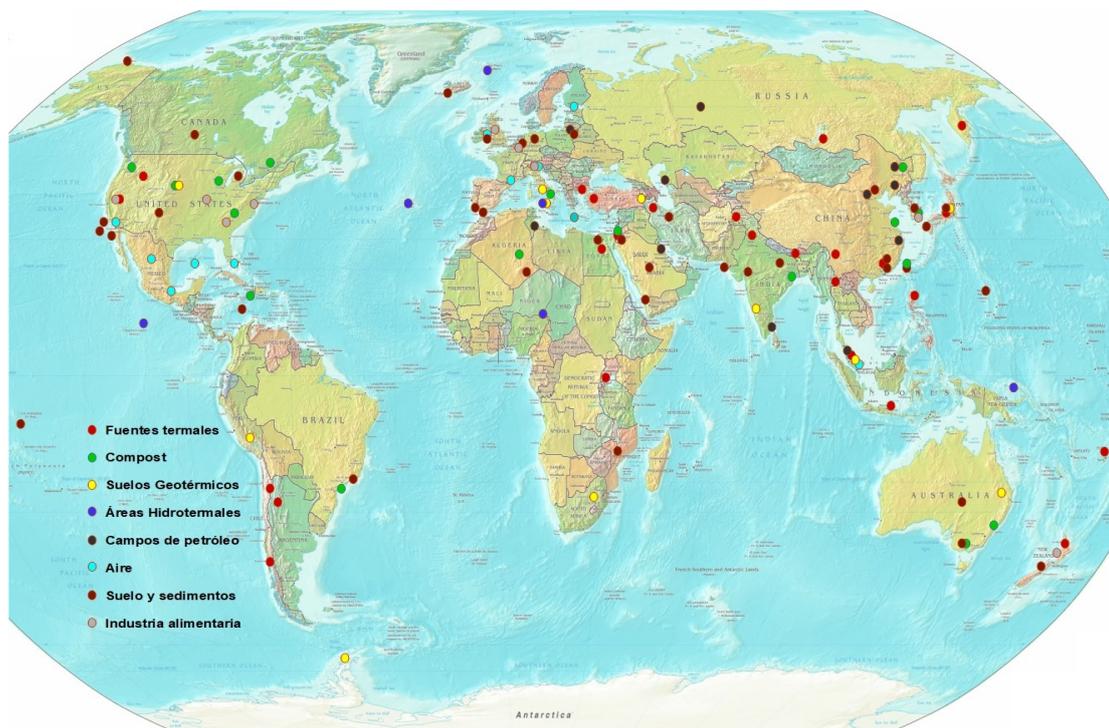


Figura 1.5. Ubicación geográfica y fuentes de aislamientos de especies de los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus*.

Se postula que esta distribución mundial se debe a la combinación de distintas características que presentan estos géneros: transporte atmosférico global (Marchant et al., 2008; Gaultier et al., 2018; Els et al., 2019; DeLeon-Rodriguez et al., 2013), altas tasas de crecimiento en condiciones termófilas (Pavlostathis et al., 2006) y mecanismos de resistencia (esporas) para sobrevivir durante largos periodos de tiempo (Zeigler, 2014).

Estas características han llevado a sugerir (Zeigler, 2014) que la presencia de estos géneros en diversos ecosistemas es consecuencia de haber sido transportados por agentes meteorológicos (e.g., viento) pero que derivan de zonas con actividad geotérmica y que no es probable que presenten actividad o contribuyan significativamente a procesos biogeoquímicos en otras localizaciones. Esta afirmación es insostenible con investigaciones más recientes por que bacterias del género *Geobacillus* y otros géneros afines son frecuentemente detectados en forma vegetativa en todos los suelos estudiados (Marchant et al., 2002; Portillo et al., 2012; Santana y González, 2015; Santana et al., 2013), incluso en algunos de latitudes altas en ambientes fríos (Wong et al., 2015). Además, se ha observado la incapacidad de esporular fácilmente ante una gran variedad de condiciones como baja temperatura o escasez de nutrientes en la mayoría de las cepas aisladas de suelos (Marchant et al., 2002). Ello pone en evidencia que las bacterias termófilas de suelos (representadas por *Geobacillus*, *Parageobacillus* y géneros afines de *Bacillales* termófilos) son especies endémicas capaces de vivir y persistir durante largos períodos de tiempo sin necesidad de formar esporas (Marchant et al., 2008). Por tanto, estas bacterias podría ser capaces de mantener su viabilidad en condiciones muy alejadas de sus conocidas óptimas de crecimiento en condiciones de laboratorio. Este aspecto necesita ser demostrado para ser capaz de evaluar su capacidad de desarrollo y persistencia en ambientes naturales como, por ejemplo, suelos.

Capítulo 1

Comprender como sobreviven los microorganismos en condiciones muy diferentes de las condiciones consideradas óptimas (según cultivos de laboratorio) es un área de la Microbiología que requiere especial atención y experimentación. El modelo de estudio que se sugiere en este trabajo es una bacteria termófila comunmente encontrada en ambientes considerados templados. La presencia y desarrollo de microorganismos extremófilos en ambientes moderados es una pregunta similar a estudiar como sobreviven los microorganismos, llamémosles comunes (de ambientes moderados o mesófilos) a situaciones extremas como, por ejemplo, temperaturas elevadas durante el verano o muy frías durante el invierno, eventos extremos de desecación por escasez de agua, etc. El estudio propuesto contribuirá a analizar estrategias de respuesta de los microorganismos a condiciones diferentes de las condiciones consideradas óptimas para su desarrollo.

1.4. Objetivos

El papel de los microorganismos más allá de lo que consideramos como condiciones óptimas para su crecimiento (determinadas por experimentos de laboratorio con cultivos) es tema de gran interés en microbiología ambiental y básico para comprender la dinámica de la comunidades microbianas y el papel y relevancia de los microorganismos en los ambientes naturales, tanto a nivel local (ecosistema) como global (cambio climático).

La **hipótesis de partida** de esta tesis es que los microorganismos son capaces de desarrollar un metabolismo significativo e incluso crecer en condiciones muy diferentes de las que consideramos que son sus condiciones óptimas de crecimiento.

Para abordar esta idea se utilizará un microorganismo termófilo aislado de suelos del Parque Nacional de Doñana (Huelva, España), *Parageobacillus thermoglucosidasius* cepa 23.6 (CECT 9776).

Con objeto de alcanzar ese objetivo general se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1- Desarrollo de un sistema de cultivo apropiado para el análisis de tasas de crecimiento muy reducidas, cercanas a crecimiento cero. Hito necesario para los siguientes objetivos concretos.

2- Secuenciación y análisis del genoma de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6. Hito necesario para los análisis transcriptómicos de los siguientes objetivos concretos y para comprender la capacidad genómica de esta cepa.

3- Evaluar el comportamiento de la cepa estudiada bajo un amplio rango de tasas de crecimiento por análisis transcriptómico de su expresión génica. La limitación de nutrientes es el factor utilizado para limitar su crecimiento. Permitirá alcanzar el hito de comprender la estrategia de persistencia de esta cepa en condiciones adversas, por ejemplo, por limitación nutricional.

4- Evaluar el comportamiento de la cepa estudiada, en base a análisis transcriptómico de expresión génica, durante ciclos de temperatura al fluctuar de una temperatura elevada (óptima, 60° C) a una baja (20° C) simulando un ciclo de temperatura observado en las capas superiores de suelos (ejemplo, en Sevilla). Estos datos permitirán alcanzar el hito de comprender la estrategia de persistencia de la cepa estudiada frente a cambios de temperatura en condiciones observadas en suelos naturales a lo largo de ciclos diarios de la temperatura.

Capítulo 1

Cada uno de estos objetivos concretos ha quedado reflejado en un capítulo de este trabajo.

1.5. Bibliografía

- Abd Rahman, R. N., Leow, T. C., Salleh, A. B., Basri, M. (2007) *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC microbiology*, 7: 77.
- Abu-Zinada, A. H., Hossain, A., Yonis, H. I., Elwan, S. H. (1981) *Bacillus stearothermophilus* from Saudi Arabian Soils. *Folia microbiologica*, 26(5): 364-369.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F. (2009) Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of microbiological methods*, 79(3): 321–328.
- Adlan, N. A., Sabri, S., Masomian, M., Ali, M., Rahman, R. (2020) Microbial Biodegradation of Paraffin Wax in Malaysian Crude Oil Mediated by Degradative Enzymes. *Frontiers in microbiology*, 11: 565608.
- Aliyu, H., Lebre, P., Blom, J., Cowan, D., De Maayer, P. (2016) Phylogenomic re-assessment of the thermophilic genus *Geobacillus*. *Systematic and applied microbiology*, 39: 527-533.
- Alkhalili, R. N., Hatti-Kaul, R., Canbäck, B. (2015) Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain ZGt-1, an Antibacterial Peptide-Producing Bacterium from Hot Springs in Jordan. *Genome announcements*, 3(4): e00799-15.
- Al-Mailem, D. M., Kansour, M. K., Radwan, S. S. (2015) Moderately thermophilic, hydrocarbonoclastic bacterial communities in Kuwaiti desert

Capítulo 1

soil: enhanced activity via Ca(2+) and dipicolinic acid amendment. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 19(3): 573-583.

André, S., Vallaey, T., Planchon, S. (2017) Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in microbiology*, 168(4): 379-387.

Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., Collins, M. D. (1991) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Applied Microbiology*, 13:202-206

Bartholomew, J. W., Paik, G. (1966) Isolation and identification of obligate thermophilic sporeforming bacilli from ocean basin cores. *Journal of bacteriology*, 92(3): 635-638.

Baumgartner, M., Yapi, A., Grobner-Ferreira, R., Stetter, K.O. (2003) Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* n. sp., an extremely thermophilic amoeba thriving in hot springs. *Extremophiles*, 7:267-274.

Benammar, L., Inan Bektaş, K., Menasria, T., Beldüz, A. O., Güler, H. I., Bedaida, I. K., Gonzalez, J. M., Ayachi, A. (2020) Diversity and enzymatic potential of thermophilic bacteria associated with terrestrial hot springs in Algeria. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 51(4): 1987-2007.

Bezuidt, O. K., Makhalanyane, T. P., Gomri, M. A., Kharroub, K., Cowan, D. A. (2015) Draft Genome Sequence of Thermophilic *Geobacillus* sp. Strain Sah69, Isolated from Saharan Soil, Southeast Algeria. *Genome announcements*, 3(6): e01447-15.

- Bibi, Z., Qader, S. A., Aman, A. (2015) Calcium alginate matrix increases the stability and recycling capability of immobilized endo- β -1,4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 19(4): 819-827.
- Bibra, M., Kunreddy, V. R., Sani, R. K. (2018) Thermostable Xylanase Production by *Geobacillus* sp. Strain DUSELR13, and Its Application in Ethanol Production with Lignocellulosic Biomass. *Microorganisms*, 6(3): 93.
- Boonmak, C., Takahasi, Y., Morikawa, M. (2013) Draft Genome Sequence of *Geobacillus thermoleovorans* Strain B23. *Genome announcements*, 1(6): e00944-13.
- Bose, S., Mukherjee, T., Sen, U., Roy, C., Rameez, M. J., Ghosh, W., Mukhopadhyay, S. K. (2016) Genome Sequence of the Multiple-Protease-Producing Strain *Geobacillus thermoleovorans* N7, a Thermophilic Bacterium Isolated from Paniphala Hot Spring, West Bengal, India. *Genome announcements*, 4(5): e01202-16.
- Brewer, W.H. (1886) Note on the organisms of the geysers of California. *Am. J. Sci.* 92, 429.
- Bryanskaya, A. V., Rozanov, A. S., Logacheva, M. D., Kotenko, A. V., Peltek, S. E. (2014) Draft Genome Sequence of *Geobacillus icigianus* Strain G1w1T Isolated from Hot Springs in the Valley of Geysers, Kamchatka (Russian Federation). *Genome announcements*, 2(5): e01098-14.

Capítulo 1

- Brock, T.D., and Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n. a non-sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol*, 98:289–297.
- Brumm, P. J., Land, M. L., Mead, D. A. (2015) Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, a novel biomass degrader isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Standards in genomic sciences*, 10: 73.
- Brumm, P. J., Land, M. L., Mead, D. A. (2016) Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. WCH70, a thermophilic strain isolated from wood compost. *Standards in genomic sciences*, 11: 33.
- Burgess, E. A., Wagner, I. D., Wiegel, J. (2007) Thermal Environments and Biodiversity. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*, 2:13-29.
- Burgess, S. A., Flint, S. H., Lindsay, D., Cox, M. P., Biggs, P. J. (2017) Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC microbiology*, 17(1): 140.
- Çağlayan, M., Bilgin, N. (2011) Cloning and sequence analysis of novel DNA polymerases from thermophilic *Geobacillus* species isolated from hot springs in Turkey: characterization of a DNA polymerase I from *Geobacillus kaue* strain NB. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(5-6): 1188-1200.
- Canganella, F., Wiegel, J. (2011) Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Die Naturwissenschaften*. 98:253-279.

- Cases, I., de Lorenzo, V. (2002) The grammar of (micro)biological diversity. *Environmental microbiology*, 4:623–627.
- Caspers, M. P., Boekhorst, J., de Jong, A., Kort, R., Nierop Groot, M., Abee, T. (2016) Draft Genome Sequences of Four Thermophilic Spore Formers Isolated from a Dairy-Processing Environment. *Genome announcements*, 4(4): e00757-16.
- Chakraborty, K., Bhattacharyya, B. K., Sen, S. K. (2000) Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Folia microbiologica*, 45(3): 207-210.
- Chamkha, M., Mnif, S., Sayadi, S. (2008) Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus* from a Tunisian high-temperature oil field. *FEMS microbiology letters*, 283(1): 23-29.
- Charbonneau, D. M., Meddeb-Mouelhi, F., Boissinot, M., Sirois, M., Beauregard, M. (2012) Identification of thermophilic bacterial strains producing thermotolerant hydrolytic enzymes from manure compost. *Indian journal of microbiology*, 52(1): 41-47.
- Cho, T. J., Rhee, M. S. (2019) Underrecognized niche of spore-forming bacilli as a nitrite-producer isolated from the processing lines and end-products of powdered infant formula. *Food microbiology*, 80: 50-61.
- Conant R. T., Ryan M. G., Agren G. I., Birge H. E., Davidson E. A., Eliasson P. E., Evans S. E., Frey S. D., Giardina C. P., Hopkins F., Hyvönen R., Kirschbaum U. F., Lavalley J. M., Leifeld J., Parton W. J., Steinweg J. M.,

Capítulo 1

- Wallenstein M. D., Wetterstedt J. A. M., Bradford M. A. (2011) Temperature and soil organic matter decomposition rates – synthesis of current knowledge and a way forward. *Global Change biology*, 17: 3392-3404
- Cohn, F. (1893) Ueber thermogene bakterien. Ber. Deutsch. Bot. Gessel, II, 66. Original not seen. Reviewed by Mace, E. (1912) *Traite pratique de bacteriologie*, v I.
- Cortez, Y., Paul, S., Villena, G. K., Correa, M. (2016) Isolation and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Strains from an Amazonian Geothermal Spring in Peru. *Microbiology Research Journal International*, 15(5): 1-8.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic and its limits. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 99:10494-10499.
- Daas, M. J., van de Weijer, A. H., de Vos, W. M., van der Oost, J., van Kranenburg, R. (2016) Isolation of a genetically accessible thermophilic xylan degrading bacterium from compost. *Biotechnology for biofuels*, 9: 210
- Daas, M., Vriesendorp, B., van de Weijer, A., van der Oost, J., van Kranenburg, R. (2018) Complete Genome Sequence of *Geobacillus thermodenitrificans* T12, A Potential Host for Biotechnological Applications. *Current microbiology*, 75(1): 49-56.
- Das, S., Jean, J. S., Kar, S., Chou, M. L., Chen, C. Y. (2014) Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from

agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of hazardous materials*, 272: 112-120.

Davidson, E. A., Janssens, I. A. (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440:165-173.

DeLeon-Rodriguez, N., Latham, T. L., Rodriguez-R, L. M., Barazesh, J. M., Anderson, B. E., Beyersdorf, A. J., Ziemba, L. D., Bergin, M., Nenes, A., Konstantinidis, K. T. (2013) Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7): 2575-2580.

de Souza, Y., da Mota, F. F., Rosado, A. S. (2017) Draft Genome Sequence of *Geobacillus* sp. LEMMY01, a Thermophilic Bacterium Isolated from the Site of a Burning Grass Pile. *Genome announcements*, 5(19): e00200-17.

Donk, P. J. (1920) A highly resistant thermophilic organism. *Jour. Bact.*, 5, 373.

Doolittle, W. F. (2000) Uprooting the tree of life. *Sci. Am.* 282: 90-95.

Egan, K., Kelleher, P., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Cotter, P. D., Hill, C. (2017) Genome Sequence of *Geobacillus stearothermophilus* DSM 458, an Antimicrobial-Producing Thermophilic Bacterium, Isolated from a Sugar Beet Factory. *Genome announcements*, 5(43): e01172-17

Els, N., Larose, C., Baumann-Stanzer, K., Tignat-Perrier, Romie, Keuschnig, Christoph, Vogel, Timothy M., Sattler, Birgit (2019) Microbial composition in

Capítulo 1

seasonal time series of free tropospheric air and precipitation reveals community separation. *Aerobiologia* **35**: 671-701 .

Elumalai, P., Parthipan, P., Narenkumar, J., Anandakumar, B., Madhavan, J., Oh, B. T., Rajasekar, A. (2019) Role of thermophilic bacteria (*Bacillus* and *Geobacillus*) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment. *3 Biotech*, *9*(3): 79.

Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., Tang, Y., Liu, X., Han, W., Peng, X., Liu, R., Wang, L. (2007) Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13): 5602–5607.

Fields, M. L., Chen Lee, P. P. (1974) *Bacillus stearothermophilus* in soils of Iceland. *Applied microbiology*, *28*(4): 638–640.

Fong, J. C., Svenson, C. J., Nakasugi, K., Leong, C. T., Bowman, J. P., Chen, B., Glenn, D. R., Neilan, B. A., Rogers, P. L. (2006) Isolation and characterization of two novel ethanol-tolerant facultative-anaerobic thermophilic bacteria strains from waste compost. *Extremophiles: life under extreme conditions*, *10*(5): 363-372.

Fujii, K., Tominaga, Y., Okunaka, J., Yagi, H., Ohshiro, T., Suzuki, H. (2018) Microbial and genomic characterization of *Geobacillus thermodenitrificans* OS27, a marine thermophile that degrades diverse raw seaweeds. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*(11): 4901-4913.

- Gaughran, E.R. (1947) The thermophilic microorganisms. *Bacteriological reviews*, 11(3):189-225.
- Gaultier, N. E., Junqueira, A., Uchida, A., Purbojati, R. W., Houghton, J., Chénard, C., Wong, A., Kolundžija, S., Clare, M. E., Kushwaha, K. K., Panicker, D., Putra, A., Kee, C., Premkrishnan, B., Heinle, C. E., Lim, S., Vettath, V. K., Drautz-Moses, D. I., Schuster, S. C. (2018). Genome Sequence of *Geobacillus thermoleovorans* SGAir0734, Isolated from Singapore Air. *Genome announcements*, 6(27): e00636-18.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010a) Procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo. P201031177. España. Patente del CSIC. 29 Julio 2010.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010b) Microorganismo heterótrofo termófilo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* y su uso para la producción de sulfatos. PCTES2010070851. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010c) Microorganismo heterótrofo termófilo CECT7628 del género *Ureibacillus* y su uso para la producción de sulfatos PCTES2010070852. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.
- González, J.M., Ortiz-Martinez, A., González-del Valle, M. A., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C. (2003) An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *Journal of Microbial Methods*, 55:459-463.

Capítulo 1

González, J.M., Portillo, M.C., Belda-Ferre. P., Mira, A. (2012) Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *Plos One*, 7 (1):e29973

González, J. M., Portillo, M. C., Piñero-Vidal, M. (2014) Latitude-dependent underestimation of microbial extracellular enzyme activity in soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2427-2434.

González, J. M., Delgado, J. A. Gómez, E. J. Santana, M., Cruz, C. M. (2016) Microorganismos termófilos para solubilización de fosfatos a temperaturas elevadas. P201630900. España. Patente del CSIC 1 Julio 2016.

Govil, T., Sharma, W., Chauhan, N. K., Kumar, S., Salem, D. R., Sani, R. K. (2019) "MINES" method for genomic DNA extraction from deep biosphere biofilms. *Journal of microbiological methods*, 167: 105730.

Hae-Jeon C., Sang-Hyun Y., Mee-Jeong L., Myo-Jeong-, Ki-Sung K., In-Won L., Jung-Wan K., Byung-Ha O., Hyun-Soo L., Vera A. S., Kwan-Hwa P. (1998) Characterization of a Thermostable Cyclodextrin Glucanotransferase Isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (3): 952-959

Hawumba, J. F., Theron, J., Brözel, V. S. (2002). Thermophilic protease-producing *Geobacillus* from Buranga hot springs in Western Uganda. *Current microbiology*, 45(2): 144-150.

- Hobbie, J. E., Daley, R. J., Jasper, S. (1977) Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 33(5): 1225-1228.
- Horikoshi, K. (1998) Extremophiles: microbial life in extreme environments. *Introduction. In: Horikoshi K, Grant WD (eds) Wiley-Liss, New York.*
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180: 4765-4774.
- Itoh, T. (2003) Taxonomy of non methanogenic hyperthermophilic and related thermophilic Archaea. *J. Biosci. Bioengineer*, 96:203–212.
- Jeon, S. J., Park, A. K., Kim, B. K., Park, H., Lee, J. H., Kim, H. W., Shin, S. C. (2016) Complete genome sequence of the crude oil-degrading thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. JS12. *Journal of biotechnology*, 230: 28-29.
- Jones, C., McConnell, C., Coleman, H., Cox, P., Falloon, P., Jenkinson, D., Powlson, D. (2005) Global climate change and soil carbon stocks: predictions from two contrasting models for the turnover of organic carbon in soil. *Change Biology*, 11:154-166.
- Jorquera, M. A., Gabler, S., Inostroza, N. G., Acuña, J. J., Campos, M. A., Menezes-Blackburn, D., Greiner, R. (2018) Screening and Characterization of Phytases from Bacteria Isolated from Chilean Hydrothermal Environments. *Microbial ecology*, 75(2): 387-399.

Capítulo 1

- Kadnikov, V. V., Mardanov, A. V., Poltarau, A. B., Sokolova, D. S., Semenova, E. M., Ravin, N. V., Tourova, T. P., Nazina, T. N. (2016) Genome sequencing and annotation of *Geobacillus* sp. 1017, a hydrocarbon-oxidizing thermophilic bacterium isolated from a heavy oil reservoir (China). *Genomics data*, 11: 95-97.
- Kaunietis, A., de Jong, A., Pranckutė, R., Buivydas, A., Kuipers, O. P. (2016) Draft Genome Sequences of Two *Geobacillus* Species Strains, Isolated from Oil Wells and Surface Soil above Oil Pools. *Genome announcements*, 4(5): e01129-16.
- Kim, J., Nanmori, T., Shinke, R. (1989) Thermostable, Raw-Starch-Digesting Amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 55(6): 1638-1639.
- Kimura, H., Asada, R., Masta, A., Naganuma, T. (2003) Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. *Applied and environmental microbiology*, 69(1): 644-648.
- Kuisiene, N., Raugalas, J., Chitavichius, D. (2004) *Geobacillus lituanicus* sp. Nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(Pt 6): 1991–1995.
- La Duc, M. T., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D., Venkateswaran, K. (2007) Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Applied and environmental microbiology*, 73(8): 2600-2611.

- Lee, Y. J., Park, M. K., Park, G. S., Lee, S. J., Lee, S. J., Kim, B. S., Shin, J. H., Lee, D. W. (2017) Complete genome sequence of the thermophilic bacterium *Geobacillus subterraneus* KCTC 3922T as a potential denitrifier. *Journal of biotechnology*, 251: 141-144.
- Lee, L. S., Goh, K. M., Chan, C. S., Annie Tan, G. Y., Yin, W. F., Chong, C. S., Chan, K. G. (2018) Microbial diversity of thermophiles with biomass deconstruction potential in a foliage-rich hot spring. *MicrobiologyOpen*, 7(6): e00615.
- Le Goff, O., Bru-Adan, V., Bacheley, H., Godon, J. J., Wéry, N. (2010) The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *Journal of applied microbiology*, 108(1): 325-340.
- Lemos, L. N., Pereira, R. V., Quaggio, R. B., Martins, L. F., Moura, L., da Silva, A. R., Antunes, L. P., da Silva, A. M., Setubal, J. C. (2017) Genome-Centric Analysis of a Thermophilic and Cellulolytic Bacterial Consortium Derived from Composting. *Frontiers in microbiology*, 8: 644.
- Ma, L., Zhao, Y., Meng, L., Wang, X., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Lü, X. (2020) Isolation of Thermostable Lignocellulosic Bacteria From Chicken Manure Compost and a M42 Family Endocellulase Cloning From *Geobacillus thermodenitrificans* Y7. *Frontiers in microbiology*, 11: 281.
- MacElroy, M. (1974) Some comments on the evolution of extremophiles. *Byosystems* 6: 74-75.

Capítulo 1

- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002) The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 4:595-602.
- Marchant, R., Franzetti, A., Pavlostathis, S. G., Tas, D. O., Erdbrugger, I., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., Banat, I. M. (2008) Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport?. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(5): 841-852.
- Marks, T. J., Hamilton, P. T. (2014) Characterization of a thermophilic bacteriophage of *Geobacillus kaustophilus*. *Archives of virology*, 159(10): 2771-2775.
- Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E. (2002) Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Systematic and applied microbiology*, 25(3): 450-455.
- McMullan, G., Christie, J. M., Rahman, T. J., Banat, I. M., Ternan, N. G., Marchant, R. (2004) Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 2): 214-217.
- Mehta, D. Satyanarayana, T., (2013) Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*, 1:3-60.

- Miquel, P. (1888) Monographie d'un bacille vivant au delà de 70 centigrades. *Ann. Micrographie*, 1:3-10
- Miyazaki, K., Hase, E., Tokito, N. (2020) Complete Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain E55-1, Isolated from Mine Geysers in Japan. *Microbiology resource announcements*, 9(20): e00339-20.
- Mohr, T., Aliyu, H., Kuchlin, R., Zwick, M., Cowan, D., Neumann, A., de Maayer, P. (2018) Comparative genomic analysis of *Parageobacillus thermoglucosidasius* strains with distinct hydrogenogenic capacities. *BMC genomics*, 19(1): 880.
- Morita, R. Y. (1997) Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle. *New York, NY: Chapman & Hall*.
- Morrison, L. E., Tanner, F. W. (1922) Studies on Thermophilic Bacteria: I. Aerobic Thermophilic Bacteria from Water. *Journal of bacteriology*, 7(3):343-366.
- Moxley, E., Puerta-Fernandez, E., Gómez, E. J., González J. M. (2019) Influence of Abiotic Factors Temperature and Water Content on Bacterial 2-Chlorophenol Biodegradation in Soils. *Frontiers in Environmental Science*, 7: 2296-665x
- Muccee, F., Ejaz, S. (2020) Whole genome shotgun sequencing of POPs degrading bacterial community dwelling tannery effluents and petrol contaminated soil. *Microbiological research*, 238, 126504.

Capítulo 1

- Muhsd Sakaff, M. K., Abdul Rahman, A. Y., Saito, J. A., Hou, S., Alam, M. (2012) Complete genome sequence of the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans* CCB_US3_UF5. *Journal of bacteriology*, 194(5): 1239.
- Nadia, S., Michael, K., Yasser A-F., Rolf, S., Stefan, L. (2007) Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*, 42: 1090-1100.
- Najar, I. N., Sherpa, M. T., Das, S., Das, S., Thakur, N. (2018) Microbial ecology of two hot springs of Sikkim: Predominate population and geochemistry. *The Science of the total environment*, 637-638: 730-745.
- Najar, I. N., Sherpa, M. T., Das, S., Verma, K., Dubey, V. K., Thakur, N. (2018) *Geobacillus yumthangensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a north-east Indian hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(11): 3430-3434.
- Najar, I. N., Sherpa, M. T., Das, S., Das, S., Thakur, N. (2020) Diversity analysis and metagenomic insights into antibiotic and metal resistance among Himalayan hot spring bacteriobiome insinuating inherent environmental baseline levels of antibiotic and metal tolerance. *Journal of global antimicrobial resistance*, 21: 342–352.
- Najar, I. N., Sherpa, M. T., Das, S., Thakur, N. (2020) Bacterial diversity and functional metagenomics expounding the diversity of xenobiotics, stress, defense and CRISPR gene ontology providing eco-efficiency to Himalayan Hot Springs. *Functional & integrative genomics*, 20(4): 479-496.

- Narayan, V. V., Hatha, M. A., Morgan, H. W., Rao, D. (2008) Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the savusavu hot springs in fiji. *Microbes and environments*, 23(4): 350–352.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., Ivanov, M. V., (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51:433–446.
- Nazina, T. N., Sokolova, D., Grigoryan, A. A., Shestakova, N. M., Mikhailova, E. M., Poltarau, A. B., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Osipov, G. A., Belyaev, S. S. (2005) *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Systematic and applied microbiology*, 28(1): 43-53.
- Ng, I. S., Li, C. W., Yeh, Y. F., Chen, P. T., Chir, J. L., Ma, C. H., Yu, S. M., Ho, T. H., Tong, C. G. (2009) A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 13(3): 425-435.

Capítulo 1

- Ortiz, E. M., Berretta, M. F., Navas, L. E., Benintende, G. B., Amadio, A. F., Zandomeni, R. O. (2015) Draft Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Isolate T6, a Thermophilic Bacterium Collected from a Thermal Spring in Argentina. *Genome announcements*, 3(4): e00743-15.
- Oztug, M., Cebeci, A., Mumcu, H., Akgoz, M., Karaguler, N. G. (2020) Whole-Genome Sequence of *Geobacillus thermoleovorans* ARTRW1, Isolated from Armutlu Geothermal Spring, Turkey. *Microbiology resource announcements*, 9(24): e00269-20.
- Pace, N. R., Sapp, J., Goldenfeld, N. (2012) Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 1011-1018.
- Pan, L. J., Tang, X. D., Li, C. X., Yu, G. W., Wang, Y. (2017) Biodegradation of sulfamethazine by an isolated thermophile-*Geobacillus* sp. S-07. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(5): 85.
- Panosyan, H., Di Donato, P., Poli, A., Nicolaus, B. (2018) Production and characterization of exopolysaccharides by *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 and *Geobacillus toebii* ArzA-8 strains isolated from an Armenian geothermal spring. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 22(5): 725-737.
- Panosyan, H., Margaryan, A., Birkeland, N. K. (2020) Geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: potential sources of hydrolase-producing

thermophilic bacilli. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 24(4): 519–536.

Pavlostathis, S. G., Marchant, R., Banat, I. M., Ternan, N. G., McMullan, G. (2006) High growth rate and substrate exhaustion results in rapid cell death and lysis in the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans*. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1): 84-95.

Pedros-Alió, C. (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14: 257-263.

Petkauskaite, R., Blom, J., Goesmann, A., Kuisiene, N. (2017) Draft genome sequence of pectic polysaccharide-degrading moderate thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 101594. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 48(1): 7-8.

Piceno, Y. M., Pecora-Black, G., Kramer, S., Roy, M., Reid, F. C., Dubinsky, E. A., Andersen, G. L. (2017) Bacterial community structure transformed after thermophilically composting human waste in Haiti. *PloS one*, 12(6): e0177626.

Pillot, G., Davidson, S., Auria, R., Combet-Blanc, Y., Godfroy, A., Liebgott, P. P. (2020) Production of Current by Syntrophy Between Exoelectrogenic and Fermentative Hyperthermophilic Microorganisms in Heterotrophic Biofilm from a Deep-Sea Hydrothermal Chimney. *Microbial ecology*, 79(1): 38-49.

Capítulo 1

- Poli, A., Romano, I., Caliendo, G., Nicolaus, G., Orlando, P., Falco, A. d., Lama, L., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (2006) *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus* subsp. nov., a hydrocarbon-degrading, heavy metal resistant bacterium from hot compost. *The Journal of general and applied microbiology*, 52(4): 223-234.
- Poli, A., Salerno, A., Laezza, G., di Donato, P., Dumontet, S., Nicolaus, B. (2009) Heavy metal resistance of some thermophiles: potential use of alpha-amylase from *Anoxybacillus amylolyticus* as a microbial enzymatic bioassay. *Research in microbiology*, 160(2): 99-106.
- Poli, A., Laezza, G., Gul-Guven, R., Orlando, P., Nicolaus, B. (2011) *Geobacillus galactosidasius* sp. nov., a new thermophilic galactosidase-producing bacterium isolated from compost. *Systematic and applied microbiology*, 34(6): 419-423.
- Poli, A., Guven, K., Romano, I., Pirinccioglu, H., Guven, R. G., Euzéby, J. P., Matpan, F., Acer, O., Orlando, P., Nicolaus, B. (2012) *Geobacillus subterraneus* subsp. *aromaticivorans* subsp. nov., a novel thermophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a hot spring in Sırnak, Turkey. *The Journal of general and applied microbiology*, 58(6): 437-446.
- Poltaraus, A. B., Sokolova, D. S., Grouzdev, D. S., Ivanov, T. M., Malakho, S. G., Korshunova, A. V., Tourova, T. P., Nazina, T. N. (2016) Draft Genome Sequence of *Geobacillus subterraneus* Strain K, a Hydrocarbon-Oxidizing Thermophilic Bacterium Isolated from a Petroleum Reservoir in Kazakhstan. *Genome announcements*, 4(4): e00782-16.

- Pore, S. D., Arora, P., Dhakephalkar, P. K. (2014) Draft Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain FW23, Isolated from a Formation Water Sample. *Genome announcements*, 2(3): e00352-14.
- Porter, K. G., Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25(5): 942-948.
- Portillo, M. C., Santana, M., González, J. M. (2012) Presence and potencial role of thermophilic bacteria in temperate terrestrial environments. *Die Naturwissenschaften*, 99: 43-53.
- Puopolo, R., Gallo, G., Mormone, A., Limauro, D., Contursi, P., Piochi, M., Bartolucci, S., Fiorentino, G. (2020) Identification of a New Heavy-Metal-Resistant Strain of *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from a Hydrothermally Active Volcanic Area in Southern Italy. *International journal of environmental research and public health*, 17(8): 2678.
- Radchenkova, N., Vassilev, S., Panchev, I., Anzelmo, G., Tomova, I., Nicolaus, B., Kuncheva, M., Petrov, K., Kambourova, M. (2013) Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(1): 31-43.
- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., Sani, R. K. (2010) Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource technology*, 101(22): 8798-8806.

Capítulo 1

- Rawat, N., Joshi, G. K. (2019). Bacterial community structure analysis of a hot spring soil by next generation sequencing of ribosomal RNA. *Genomics*, 111(5): 1053–1058.
- Rekadwad, B. N., Khobragade, C. N. (2016) Bioinformatics data supporting revelatory diversity of cultivable thermophiles isolated and identified from two terrestrial hot springs, Unkeshwar, India. *Data in brief*, 7: 1511-1514.
- Ren, Y., Strobel, G., Sears, J., Park, M. (2010) *Geobacillus sp.*, a thermophilic soil bacterium producing volatile antibiotics. *Microbial ecology*, 60(1): 130-136.
- Sadiq, F. A., Flint, S., Yuan, L., Li, Y., Liu, T., He, G. (2017) Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International journal of food microbiology*, 262: 89-98.
- Sahay, H., Yadav, A. N., Singh, A. K., Singh, S., Kaushik, R., Saxena, A. K. (2017) Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. *3 Biotech*, 7(2): 118.
- Santana, M., Portillo, M. C., González, J. M., Clara, I. E. (2013) Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176:47-56.
- Santana, M. M., González, J. M. (2015) High temperature microbial activity in upper soil layers. *FEMS microbiology letters*, 362(22): fnv182.

- Sari, B., Faiz, O., Genc, B., Sisecioglu, M., Adiguzel, A., Adiguzel, G. (2018) New xylanolytic enzyme from *Geobacillus galactosidasius* BS61 from a geothermal resource in Turkey. *International journal of biological macromolecules*, 119: 1017-1026.
- Sarkar, S., Banerjee, R., Chanda, S., Das, P., Ganguly, S., Pal, S. (2010) Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting. *Bioresource technology*, 101(8): 2892-2895.
- Schultz, J., Kallies, R., Nunes da Rocha, U., Rosado, A. S. (2019) Draft Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain LEMMJ02, a Thermophile Isolated from Deception Island, an Active Volcano in Antarctica. *Microbiology resource announcements*, 8(42): e00920-19.
- Seo, M. J., Lee, B. S., Pyun, Y. R., Park, H. (2011) Isolation and characterization of N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus caldoxylosilyticus* YS-8. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(9): 1789-1795.
- Shahinyan, G., Margaryan, A., Panosyan, H., Trchounian, A. (2017) Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *BMC microbiology*, 17(1): 103.
- Siddiqui, M. A., Rashid, N., Ayyampalayam, S., Whitman, W. B. (2014) Draft Genome Sequence of *Geobacillus thermopakistanensis* Strain MAS1. *Genome announcements*, 2(3): e00559-14.

Capítulo 1

- Singh, D. N., Sood, U., Singh, A. K., Gupta, V., Shakarad, M., Rawat, C. D., Lal, R. (2019) Genome Sequencing Revealed the Biotechnological Potential of an Obligate Thermophile *Geobacillus thermoleovorans* Strain RL Isolated from Hot Water Spring. *Indian journal of microbiology*, 59(3): 351-355.
- Siristova, L., Melzoch, K., Rezanka, T. (2009) Fatty acids, unusual glycopospholipids and DNA analyses of thermophilic bacteria isolated from hot springs. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 13(1): 101-109.
- Soy, S., Nigam, V. K., Sharma, S. R. (2019). Cellulolytic, amyolytic and xylanolytic potential of thermophilic isolates of Surajkund hot spring. *Journal of biosciences*, 44(5): 124
- Sudan, S. K., Kumar, N., Kaur, I., Sahni, G. (2018) Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic α -amylase from hot springs, India. *International journal of biological macromolecules*, 117: 831-839.
- Sun, Y., Ning, Z., Yang, F., Li, X. (2015) Characteristics of Newly Isolated *Geobacillus* sp. ZY-10 Degrading Hydrocarbons in Crude Oil. *Polish journal of microbiology*, 64(3): 253-263.
- Sung, M. H., Kim, H., Bae, J. W., Rhee, S. K., Jeon, C. O., Kim, K., Kim, J. J., Hong, S. P., Lee, S. G., Yoon, J. H., Park, Y. H., Baek, D. H. (2002) *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(Pt 6): 2251-2255.

- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F., Horikoshi, K. (1997) Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS microbiology letters*, 152(2): 279-285.
- Tansey, M.R., Brock, T.D. (1972) The upper temperature limit for eukaryotic organism. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 69: 2426-2428.
- Thebti, W., Riahi, Y., Gharsalli, R., Belhadj, O. (2016) Screening and characterization of thermo-active enzymes of biotechnological interest produced by thermophilic *Bacillus* isolated from hot springs in Tunisia. *Acta biochimica Polonica*, 63(3): 581–587.
- Tomita, K., Ikeda, N., Ueno, A. (2003) Isolation and characterization of a thermophilic bacterium, *Geobacillus thermocatenuatus*, degrading nylon 12 and nylon 66. *Biotechnology letters*, 25(20): 1743-1746.
- Tourova, T.P., Sokolova, D.S., Semenova, E.M., Shumkova, E. S., Korshunova, A. V., Babich, T. L., Poltarau, A. B., Nazina, T. N. (2016) Detection of *n*-alkane biodegradation genes *alkB* and *ladA* in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the genera *Aeribacillus* and *Geobacillus*. *Microbiology* **85**: 693-707
- Townsend, A. R., Vitousek, P. M., Holland, E. A. (1992) Tropical soils dominate the short-term carbon cycle feedbacks to increased global temperatures. *Climate Change*, 22: 293-303.

Capítulo 1

- Uma Maheswar Rao, J. L., Satyanarayana, T. (2003) Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca²⁺-independent alpha-amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Letters in applied microbiology*, 36(4): 191-196.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Frey-Klett, P. (2009) Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology*, 17: 378-378
- Vaičikauskaitė, M., Ger, M., Valius, M., Maneikis, A., Lastauskienė, E., Kalėdienė, L., Kaunietis, A. (2019) Geobacillin 26 - high molecular weight bacteriocin from a thermophilic bacterium. *International journal of biological macromolecules*, 141, 333-344.
- Valladares Juárez, A. G., Dreyer, J., Göpel, P. K., Koschke, N., Frank, D., Märkl, H., Müller, R. (2009) Characterisation of a new thermoalkaliphilic bacterium for the production of high-quality hemp fibres, *Geobacillus thermoglucosidasius* strain PB94A. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(3): 521-527.
- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 65(1): 1-43.
- Vorgias, C. E., Antranikian, G. (2004) Extremophiles: pH, temperature, and salinity. *In: Bull, A. T. (de.) Microbial Diversity and Bioprospecting. ASM Press, Washington.*

- Wang, L., Tang, Y., Wang, S., Liu, R. L., Liu, M. Z., Zhang, Y., Liang, F. L., Feng, L. (2006) Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 10(4): 347-356.
- Wang, C. M., Shyu, C. L., Ho, S. P., Chiou, S. H. (2007) Species diversity and substrate utilization patterns of thermophilic bacterial communities in hot aerobic poultry and cattle manure composts. *Microbial ecology*, 54(1): 1-9.
- Wang, Y., Zhang, X. (2010) Genome analysis of deep-sea thermophilic phage D6E. *Applied and environmental microbiology*, 76(23): 7861-7866.
- Wang, J., Goh, K. M., Salem, D. R., Sani, R. K. (2019) Genome analysis of a thermophilic exopolysaccharide-producing bacterium - *Geobacillus* sp. WSUCF1. *Scientific reports*, 9(1): 1608.
- Wang, M., Miao, J., Wang, X., Li, T., Zhu, H., Liu, D., Shen, Q. (2020) Genomic and Transcriptome Analyses of a Thermophilic Bacterium *Geobacillus stearothermophilus* B5 Isolated from Compost Reveal Its Enzymatic Basis for Lignocellulose Degradation. *Microorganisms*, 8(9): 1357.
- Wang, J., Salem, D. R., Sani, R. K. (2021) Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1: Characterization and bioactivities. *New biotechnology*, 61: 29-39.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 6578-6583.

Capítulo 1

- Wiegand, S., Rabausch, U., Chow, J., Daniel, R., Streit, W. R., Liesegang, H. (2013) Complete Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain GHH01, a Thermophilic Lipase-Secreting Bacterium. *Genome announcements*, 1(2): e0009213.
- Wissuwa, J., Stokke, R., Fedøy, A. E., Lian, K., Smalås, A. O., Steen, I. H. (2016) Isolation and complete genome sequence of the thermophilic *Geobacillus* sp. 12AMOR1 from an Arctic deep-sea hydrothermal vent site. *Standards in genomic sciences*, 11: 16.
- Woese, C. R., Fox, G. E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74: 5088–5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87: 4576–4579.
- Wong, M. L., An, D., Caffrey, S. M., Soh, J., Dong, X., Sensen, C. W., Oldenburg, T. B., Larter, S. R., Voordouw, G. (2015) Roles of Thermophiles and Fungi in Bitumen Degradation in Mostly Cold Oil Sands Outcrops. *Applied and environmental microbiology*, 81(19): 6825-6838.
- Wu, S., Liu, B., Zhang, X. (2006) Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(6): 1210-1216.

- Xu, C., Sun, X., Jin, M., Zhang, X. (2017) A Novel Benzoquinone Compound Isolated from Deep-Sea Hydrothermal Vent Triggers Apoptosis of Tumor Cells. *Marine drugs*, 15(7): 200.
- Yang, S. H., Cho, J. K., Lee, S. Y., Abanto, O. D., Kim, S. K., Ghosh, C., Lim, J. S., Hwang, S. G. (2013) Isolation and Characterization of Novel Denitrifying Bacterium *Geobacillus* sp. SG-01 Strain from Wood Chips Composted with Swine Manure. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 26(11): 1651-1658.
- Yao, N., Ren, Y., Wang, W. (2013) Genome Sequence of a Thermophilic *Bacillus*, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM465. *Genome announcements*, 1(6): e01046-13
- Yasir, M., Qureshi, A. K., Khan, I., Bibi, F., Rehan, M., Khan, S. B., Azhar, E. I. (2019) Culturomics-Based Taxonomic Diversity of Bacterial Communities in the Hot Springs of Saudi Arabia. *Omics: a journal of integrative biology*, 23(1): 17-27.
- Yavuz, E., Gunes, H., Harsa, S., Yenidunya, A. F. (2004) Identification of extracellular enzyme producing thermophilic bacilli from Balçova (Agamemnon) geothermal site by ITS rDNA RFLP. *Journal of applied microbiology*, 97(4): 810-817.
- Zambrano, M. M., Siegele, D. A., Almirón, M., Tormo, A., Kolter, R. (1993) Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102): 1757-1760.

Capítulo 1

- Zeigler, D. R. (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 53: 1893–1900.
- Zeigler, D. R. (2005) Application of a recN sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 55: 1171–1179.
- Zeigler, D. R. (2014) The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology (Reading, England)*, 160: 1-11
- Zhang, J., Zhang, X., Liu, J., Li, R., Shen, B. (2012) Isolation of a thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. SH-1, capable of degrading aliphatic hydrocarbons and naphthalene simultaneously, and identification of its naphthalene degrading pathway. *Bioresource technology*, 124: 83-89.
- Zhao, H., Yu, H., Yuan, X., Piao, R., Li, H., Wang, X., Cui, Z. (2014) Degradation of lignocelluloses in rice straw by BMC-9, a composite microbial system. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(5): 585-724.
- Zhao, C., Chu, Y., Li, Y., Yang, C., Chen, Y., Wang, X., Liu, B. (2017) High-throughput pyrosequencing used for the discovery of a novel cellulase from a thermophilic cellulose-degrading microbial consortium. *Biotechnology letters*, 39(1): 123-131.
- Zheng, B., Zhang, F., Chai, L., Yu, G., Shu, F., Wang, Z., Su, S., Xiang, T., Zhang, Z., Hou, D., She, Y. (2014) Permanent draft genome sequence of

Geobacillus thermocatenulatus strain GS-1. *Marine genomics*, 18PB: 129-131.

Zhu, Y., Wang, G., Ni, H., Xiao, A., Cai, H. (2014) Cloning and characterization of a new manganese superoxide dismutase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT3. *World journal of microbiology & biotechnology*, 30(4): 1347-1357.

Zhu, Y., Li, H., Ni, H., Xiao, A., Li, L., Cai, H. (2015) Molecular cloning and characterization of a thermostable lipase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT9. *World journal of microbiology & biotechnology*, 31(2): 295-306.

Zhu, L., Li, M., Guo, S., Wang, W. (2016) Draft Genome Sequence of a Thermophilic Desulfurization Bacterium, *Geobacillus thermoglucosidasius* Strain W-2. *Genome announcements*, 4(4): e00793-16.

Capítulo 1

1.6. Anexo

Tabla suplementaria 1.1. Diversidad ambiental de aislamientos de cepas del género *Geobacillus* y *Parageobacillus*

Especie	Hábitat	Referencia
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	Suelo volcan Stromboli	
<i>G. toebii</i>	Compost	Poli et al., 2009
<i>G. thermoleovorans</i>	Fuente termal	
<i>Geobacillus</i> sp. C170	Manantial de aguas termales en Akhourik, Armenia	Shahinyan et al., 2017
<i>Geobacillus</i> spp.	Manantial de aguas termales en la selva amazonica del Perú	Cortez et al., 2016
<i>Geobacillus</i> sp. DUSELR13	Mina de Oro Homestake, Dakota del sur	Bibra et al., 2018
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> ArZA-6		Panosyan et al., 2018
<i>Geobacillus toebii</i> ArZA-8	Sedimentos de un Manantial de agua termales, Armenia	
<i>Geobacillus</i> spp.		Panosyan et al., 2020
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales de Sikkim, India	Najar et al., 2018
<i>Geobacillus yumthangensis</i>		Najar et al., 2020
<i>Geobacillus</i> spp.	Suelo de aguas termales de Tapovan, India	Rawat y Joshi 2019
<i>Geobacillus</i> spp. K1C	Aguas termales de Manikarna, India	Sudan et al., 2018
<i>Geobacillus galactosidasius</i> BS61	Aguas termales de Rize/Ayder, Turquía	Sari et al., 2018
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales, Turquía	Adiguzel et al., 2009
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	Aguas termales de Savusavu, Fiji	Narayan et al., 2008
<i>Geobacillus icigianus</i>	Aguas termales de Surajkund, India	Soy et al., 2019
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales, Túnez	Thebti et al., 2016
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales de Buranga, Uganda	Hawunba et al., 2002
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	Aguas termales de Yellowstone, Estados Unidos	Brumm et al., 2015

Especie	Hábitat	Referencia
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales, Argelia	Benammar et al., 2020
<i>Geobacillus</i> sp. T6	Aguas termales en Salta, Argentina	Ortiz et al., 2015
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales de Gönen and Hisaralan, Turquía	Çağlayan y Bilgin, 2011
<i>Geobacillus</i> sp. ZGt-1	Aguas termales de Zara, Jordania	Alkhalili et al., 2015
<i>Geobacillus icigianus</i> Strain G1w1	Lodos de aguas termales en Kamchatka, Rusia	Bryanskaya et al., 2014
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales	Rekadwad y Khobragade, 2016
<i>Geobacillus</i> spp.	Biomasa vegetal en Aguas termales de Sungai Klah, Malasia	Lee et al., 2018
<i>Geobacillus thermopakistaniensis</i> MAS1.	Aguas termales, Pakistán	Siddiqui et al., 2014
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Sedimentos de aguas termales, Arabia Saudi	Yasir et al., 2019
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales en Himalaya, India	Sahay et al., 2017
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales	Siristova et al., 2009
<i>Geobacillus</i> spp.	Aguas termales en Xiamen, China	Zhao et al., 2017
<i>Geobacillus</i> spp.	Chimeneas hidrotermales en Islas Eolias, Italia	Maugeri et al., 2002
<i>Geobacillus</i> spp.	Sedimentos de las Fosas Marianas	Takami et al., 1997
<i>Geobacillus</i> spp.	Chimeneas hidrotermales, Papua Nueva Guinea	Kimura et al., 2003
<i>Geobacillus</i> spp.	Chimeneas hidrotermales en el Océano Pacífico	Wang y Zhang, 2010
<i>Geobacillus</i> spp.	Sedimentos de Aguas termales de el Tatio y Liquiñe, Chile	Jorquera et al., 2018
<i>Geobacillus</i> sp. 12AMOR1	Sedimentos de Chimeneas hidrotermales en Jan Mayen, Océano Ártico	Wissuwa et al., 2016
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Lodos hidrotermales del volcán Campi Flegrei, Italia	Puopolo et al., 2020
<i>Geobacillus</i> spp.	Lodos y agua de chimeneas hidrotermales, Turquía	Yavuz et al., 2004
<i>Geobacillus</i> sp. E263	Chimeneas hidrotermales en el Océano Pacífico.	Xu et al., 2017
<i>Geobacillus</i> spp.	Chimeneas hidrotermales del volcán Capelinhos, Islas Azores	Pillot et al., 2020
<i>Geobacillus toebii</i>	Aguas termales, Bulgaria	Radchenkova et al., 2013
<i>Geobacillus</i> sp. MT-1	Chimeneas hidrotermales en el Océano Pacífico.	Wu et al., 2006
<i>Geobacillus</i> sp. EPT3	Sedimentos de Chimeneas hidrotermales en el Océano Pacífico	Zhu et al., 2014
<i>Geobacillus</i> sp. EPT9		Zhu et al., 2015

Especie	Hábitat	Referencia
<i>Geobacillus subterraneus</i> KCTC 3922T	Yacimiento petrolífero de Liaohe, China	Lee et al., 2017
<i>Geobacillus jurassicus</i>	Yacimiento petrolífero de Dagang, China	Nazina et al., 2005
<i>Geobacillus</i> sp. SH-1,	Yacimiento petrolífero	Zhang et al., 2012
<i>Geobacillus</i> spp.	Yacimiento petrolífero en Sfax, Tunez	Chamkha et al., 2008
<i>Geobacillus lituanicus</i>	Yacimiento petrolífero, Lituania	Kuisiene et al., 2004
<i>Geobacillus</i> sp. FW23	Yacimiento petrolífero de Mehsana, India	Pore et al., 2014
<i>Geobacillus</i> spp.	Yacimiento petrolífero en la cuenca del río Cauvery, India	Elumalai et al., 2019
<i>Geobacillus subterraneus</i>	Agua de yacimientos petrolíferos en Rusia, Kazajistán y China	Nazina et al., 2001
<i>Geobacillus uzenensis</i>		
<i>Geobacillus subterraneus</i> K	Yacimiento petrolífero en Kazajistán	Poltaraus et al., 2016
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> W-2	Yacimiento petrolífero en China	Zhu et al., 2016
<i>Geobacillus</i> sp. 1017	Agua de yacimiento petrolífero de Dagang, China	Kadnikov et al., 2016
<i>Geobacillus</i> spp.	Yacimiento petrolífero	Tourova et al., 2016
<i>Geobacillus</i> sp. ZY-10	Yacimiento petrolífero	Sun et al., 2015
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	Yacimiento petrolífero de Dagang, China	Wang et al., 2006
<i>Geobacillus zalihae</i>	Efluentes de Industria de aceite de palma, Malasia	Abd et al., 2007
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> OS27	Algas marinas	Fujii et al., 2018
<i>Geobacillus</i> spp.	Salas blancas	La Duc et al., 2007
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> SGAir0734	Aire de Singapur	Gaultier et al., 2018
<i>Geobacillus</i> spp.	Aire de los Alpes (3106 m), Austria	Els et al., 2019
<i>Geobacillus</i> spp.	Aerosol de industrias de compostaje	Le Goff et al., 2010
<i>Geobacillus</i> spp.	Troposfera	DeLeon-Rodriguez et al., 2013

Especie	Hábitat	Referencia
<i>Geobacillus sp. strain WSUCF1</i>	Mina	Govil et al., 2019
<i>Geobacillus galactosidasius</i>	Compost, Italia	Poli et al., 2011
<i>Geobacillus spp.</i>	Compost	Sarkar et al., 2010
<i>Geobacillus spp.</i>	Compost	Rastogi et al., 2010
<i>Geobacillus toebii</i>	Compost de Pomigliano, Italia	Poli et al., 2006
<i>Geobacillus thermodenitrificans T12</i>	Compost, Holanda	Daas et al., 2018
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Compost	Marks y Hamilton 2014
<i>Geobacillus spp.</i>	Compost de estiércol	Charbonneau et al., 2012
<i>Geobacillus spp.</i>	Compost	Daas et al., 2016
<i>Geobacillus sp. WCH70</i>	Compost de madera	Brumm et al., 2016
<i>Geobacillus sp. WSUCF1</i>	Suelo de una instalación de Compostaje	Wang et al., 2019
<i>Geobacillus toebii</i>	Compost de heno, Korea	Sung et al., 2002
<i>Geobacillus sp. SG-01</i>	Compost de estiércol de cerdo y madera	Yang et al 2013
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	Compost del zoo de Sao Paulo	Lemos et al., 2017
<i>Geobacillus thermodenitrificans Y7</i>	Compost de estiércol de pollo	Ma et al., 2020
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	Compost de desechos urbanos	Fong et al., 2006
<i>Geobacillus spp.</i>	Compost	Zhao et al., 2014
<i>Geobacillus spp.</i>	Compost de desechos urbanos, Haití	Piceno et al., 2017
<i>Geobacillus sp. JS12</i>	Compost en Namhae, Korea	Jeon et al., 2016
<i>Geobacillus stearothermophilus B5</i>	Compost	Wang et al., 2020
<i>Geobacillus sp. 70PC53</i>	Compost de estiércol de cerdo y arroz	Ng et al., 2009
<i>Geobacillus sp. S-07</i>	Compost	Pan et al., 2017

Especie	Hábitat	Referencia
<i>Geobacillus spp.</i>	Compost	Wang et al., 2007
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Industria alimentaria, Alimentos enlatados.	André et al., 2017
<i>Geobacillus spp.</i>	Industria alimentaria, leche en polvo	Sadiq et al., 2017
<i>Geobacillus spp.</i>	Industria alimentaria, leche en polvo	Cho y Rhee 2019
<i>Geobacillus thermoglucosidans</i> TNO-09.023	Industria alimentaria, fábrica de leche	Caspers et al., 2016
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> TNO-09.027	Industria alimentaria, fábrica de remolacha	Egan et al., 2017
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 458,	Suelo de compost, Lituania	Petkauskaite et al., 2017
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM 101594	Industria textil	Valladares Juárez et al., 2009
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> PB94A	Suelo de agricultura, Taiwan	Das et al., 2014
<i>Geobacillus spp.</i>	Suelo	Zeigler, 2005
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> YN	Suelo de desierto, Egipto	Nadia et al., 2007
<i>Geobacillus spp.</i>	Suelo con contaminantes orgánicos	Muccee y Ejaz, 2020
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Suelo de desierto, Arabia Saudi	Abu-Zinada et al., 1981
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Suelo	Kim et al., 1989
<i>Geobacillus spp.</i>	Suelo de desierto, Kuwaiti	Al-Maillem et al., 2015
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Suelo de Islandia	Fields y Chen Lee, 1974
<i>Geobacillus sp.</i> LEMMY01	Compost	De Souza et al., 2017
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> KIBGE-IB29.	Industria procesamiento de acero	Bibi et al., 2014
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Suelo	Chakraborty et al., 2000
<i>Geobacillus sp.</i> Strain GHH01	Suelo de jardín botánico de Hamburgo, Alemania	Wiegand et al., 2013
<i>Geobacillus spp.</i>	Suelo de yacimientos petrolíferos	Kaunietis et al., 2016

Especie	Hábitat	Referencia
<i>Geobacillus</i> spp.	Suelo de bosque de pino, España	Portillo et al., 2012
<i>Geobacillus</i> spp.	Suelo de campos de olivos, Portugal	Santana et al., 2013
<i>Geobacillus</i> sp Sah69	Suelo de Sahara, Argelia	Bezuidt et al., 2015
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Sedimentos marinos	Bartholomew y Paik, 1966
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ET1	Suelo, Korea	Hae-Jeon et al., 1998
<i>Geobacillus</i> sp. E55-1	Sedimentos de la mina Geysir, Estados Unidos	Miyazaki et al., 2020
<i>Geobacillus</i> sp. LEMMJ02	Sedimento de la Isla Deception, Antartida	Schultz et al., 2019
<i>Geobacillus</i> spp.	Suelo de Yellowstone, Estados Unidos	Ren et al., 2010
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Industria alimentaria, fabrica de productos lacteos	Buergess et al., 2017
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	Suelo	Tomita et al., 2003
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	Yacimiento petrolífero, China	Feng et al., 2007
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> DSM465.	Yacimiento petrolífero, China	Yao et al., 2013
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> ARTRW1,	Aguas termales, Turquía	Oztug et al., 2020
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5	Aguas termales, Malasia	Muhd et al., 2012
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> N7	Aguas termales de Paniphala, India	Bose et al., 2016
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> RL	Aguas termales de Manikaran, India	Singh et al., 2019
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> B23.	Yacimiento petrolífero, Japón	Boonmak et al., 2013
<i>Geobacillus subterraneus</i>	Aguas termales, Turquía	Poli et al., 2012
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> GS-1	Yacimiento petrolífero, China	Zheng et al., 2014
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	Suelo	Mohr et al., 2018
<i>Geobacillus</i> spp.	Suelo, Irlanda	Marchan et al., 2002
<i>Geobacillus</i> spp.	Aire y agua de lluvia, Irlanda	Marchan et al., 20

Respuesta fisiológica de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

2.1 Resumen

En la naturaleza, las tasas de crecimiento de los microorganismos son frecuentemente muy bajas debido a la escasez y competencia por los nutrientes. Para comprender la vida de los microorganismos, y específicamente de los termófilos, en ambientes naturales es importante estudiar su respuesta a tasas de crecimiento cercanas a cero. Para ello, se cultivó *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en un quimiostato modificado (retentostato) con el fin de obtener tasas de crecimiento muy bajas. Durante el cultivo experimental se analizaron la acumulación de biomasa, número de células, viabilidad y biovolumen. Durante el cultivo con retentostato, la tasa de crecimiento específica disminuyó hasta $0,0002 \text{ h}^{-1}$ correspondiéndose con un tiempo de duplicación de 141 días. Las células se mantenían activas en el sistema de cultivo. Medidas del biovolumen celular mostraron que el número de células pequeñas ($< 3 \mu\text{m}^3$) aumentó al disminuir la tasa de crecimiento. Las células en división presentaban una morfología filamentosa. Ello sugiere que la citocinesis se ve afectada en condiciones de crecimiento mínimo.

2.2 Introducción

Las bacterias, al igual que otras formas de vida, son sistemas bioquímicos que convierten los sustratos del medio ambiente en estructuras celulares y productos. Las reacciones químicas que ocurren en el interior celular constituyen una red metabólica compleja y se pueden clasificar como anabólicas o catabólicas (Alberts et al., 2002). Las reacciones anabólicas o biosintéticas son las encargadas de formar las biomoléculas que la célula necesita a partir de sus precursores o moléculas más sencillas (requieren energía), por ejemplo, síntesis de aminoácidos a partir de azúcares y amonio. Las reacciones catabólicas o de degradación transforman los sustratos en moléculas más pequeñas, conservando la energía que se libera, por ejemplo, en forma de trifosfato de adenosina (ATP). De esta forma la célula obtiene energía para su funcionamiento. Los intermediarios de las reacciones catabólicas están entrelazados con las reacciones de biosíntesis (Alberts et al., 2002).

En la naturaleza, el crecimiento de los microorganismos está determinado por la concentración de nutrientes asimilables y factores ambientales y fisicoquímicos (temperatura, pH, salinidad etc.). La disponibilidad de los nutrientes depende del ambiente y es variable en el tiempo (Koch, 1997; Demoling et al., 2007). Russel y Cook ilustraban que si el crecimiento bacteriano no estuviese limitado por la disponibilidad de sustratos esenciales y condiciones ambientales, una bacteria con un volumen celular de $1\mu\text{m}^3$ y un tiempo de duplicación de 20 minutos, sería capaz de multiplicarse dando lugar a una biomasa final que superaría al volumen de la Tierra en 48 horas (Russel y Cook, 1995).

Las condiciones óptimas de crecimiento para un microorganismo representan un concepto antropológico refutado por el estudio de los microorganismos en

Capítulo 2

condiciones controladas en el laboratorio. Gracias a estos estudios se han logrado grandes hitos científicos y un gran desarrollo biotecnológico. Sin embargo, entender como viven o se desarrollan los microorganismos en la naturaleza es una tarea pendiente en el área de la microbiología ambiental.

El concepto actual sobre el crecimiento bacteriano en la naturaleza se basa en la alternancia de condiciones óptimas de crecimiento con periodos de escasez de nutrientes o condiciones desfavorables (Zambrano et al., 1993; Morita 1997). Los entornos naturales, como por ejemplo los suelos, son muy heterogéneos y presentan una gran variabilidad lo que determina la frecuencia y duración de condiciones favorables o desfavorables para el crecimiento bacteriano (Zambrano et al., 1993; Morita 1997).

Comprender el comportamiento de los microorganismos cuando las condiciones ambientales son diferentes de las que creemos adecuadas para esas especies no es un tema sencillo (Wiegel 1990; Cuecas et al., 2014). Durante muchos años se ha establecido que las bacterias en condiciones adversas inician procesos de supervivencia en los que su abundancia decrece progresivamente y las células intentan resistir a través de procesos de transformación u ahorro energético (Amy y Morita, 1983). Algunas bacterias Gram-positivas pueden formar esporas como estructuras de resistencia que germinarán cuando la condiciones vuelvan a ser apropiadas. También se ha citado que las situaciones de estrés conducen a la inhibición de la división celular y a estados de progresiva dormancia pudiendo alcanzar situaciones de pérdida de su viabilidad o estadios de inactividad que pueden o no llegar a la muerte o lisis celular (Kjelleberg et al., 1987; González et al., 1992).

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Los microorganismos del suelo frecuentemente experimentan escasez de nutrientes asimilables (Ferenci, 2001), siendo a menudo el carbono orgánico el nutriente limitante para muchos de los microorganismos que habitan en el suelo (Alden et al., 2001; Ekblad y Nordgren, 2002). Como consecuencia de limitaciones nutricionales o condiciones ambientales, la tasa de crecimiento específica (μ) de los microorganismos en la naturaleza es generalmente mucho menor a la tasa máxima observada en cultivos de laboratorio (Koch, 1997; Ferenci, 2001). En condiciones de escasez nutricional los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir: inducción o inhibición de quimiostasis y motilidad; secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares (proteasas, glucosidasas, etc); formación de biopelículas; esporulación o formas de resistencia o dormancia, etc. (Msadek, 1999; Errington, 2003; Veening et al., 2008).

El funcionamiento de los microorganismos requiere un gasto energético. Cuando las condiciones ambientales son favorables, los microorganismos invierten los abundantes nutrientes existentes en la obtención de energía y producción de biomasa celular (producción de nuevos constituyentes celulares, síntesis de proteínas estructurales y enzimas, etc) que llevan al crecimiento y aumento del número de células. Sin embargo, cuando existe escasez de nutrientes la energía obtenida ha de utilizarse preferentemente para procesos de mantenimiento celular (reparación de proteínas y ADN, mantenimiento del equilibrio osmótico, etc.) (Pirt, 1965; Nyström. 2004; van Bodegom, 2007). Si los microorganismos utilizan el sustrato consumido exclusivamente en procesos catabólicos, tendremos una tasa de crecimiento cero, o dicho de otro modo, no se produce aumento de la biomasa total del cultivo.

Capítulo 2

En teoría, el crecimiento cero es un estado en el que los microorganismos están metabólicamente activos pero usan la energía que obtienen únicamente para procesos de mantenimiento (Pirt, 1965). Las esporas se consideran formas de resistencia y presentan escasa o nula actividad metabólica por lo que no se consideran un estadio fisiológico de crecimiento activo.

Para comprender mejor el ciclo de vida de los microorganismos en la naturaleza es de gran relevancia estudiar sus tasas de crecimiento reducidas y cercanas a cero. Estas condiciones de actividad y persistencia a baja tasa de crecimiento constituyen importantes huecos en nuestro conocimiento y comprensión del comportamiento y respuestas microbianas en la naturaleza. Con frecuencia, la comunidad científica ha estudiado el crecimiento microbiano dividiéndolo en cuatro fases principales: **Fase lag**, las células se adaptan a las nuevas condiciones ambientales (no hay crecimiento celular); **Fase exponencial**, las células se multiplican a su tasa máxima de crecimiento específico; **Fase estacionaria**, donde las células responden a la limitación de recursos reduciendo su tasa de crecimiento y generando formas de resistencia que les permita sobrevivir posibles periodos de inactividad o situaciones adversas; **Fase de muerte celular** lleva a un descenso de biomasa y reducción del número de células. Esta es la secuencia típica observable en un crecimiento microbiano en el laboratorio en un matraz con medio de cultivo (cultivo discontinuo o “batch”) (Figura 2.1)

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

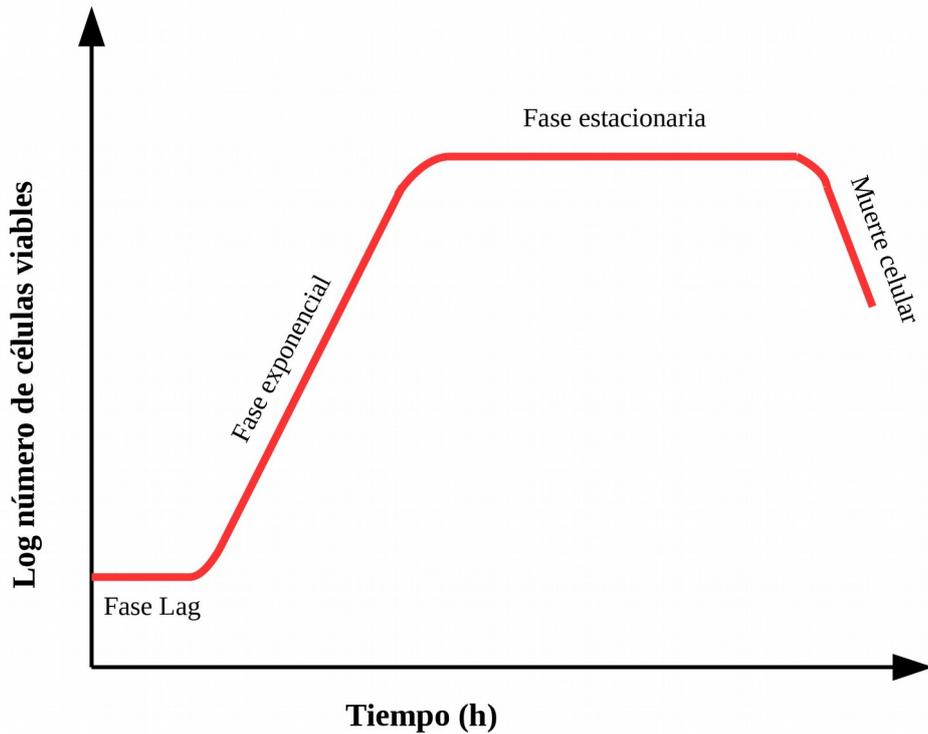


Figura 2.1. Fases de la curva de crecimiento de microorganismos en un cultivo discontinuo o en “batch”.

El cultivo en “batch” es un sistema cerrado de sustrato y biomasa (van Verseveld, et al., 1984) que normalmente se lleva a cabo en matraces o biorreactores donde se controlan parámetros como el pH, oxígeno disuelto y agitación, previniendo así las fluctuaciones ambientales que ocurren durante el cultivo.

En este tipo de cultivos no se pueden controlar las tasas de crecimiento, la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria o de crecimiento cero

Capítulo 2

suele ser bastante rápida y las condiciones ambientales cambian a lo largo del tiempo de incubación del cultivo. Estas características hacen prácticamente imposible estudiar la células a tasas de crecimiento bajas ya que es un sistema diseñado para desarrollar un crecimiento óptimo y obtener un nivel elevado de biomasa microbiana.

Un método de cultivo que permite el desarrollo de microorganismos en condiciones ambientales controladas y a tasas de crecimiento específicas y controladas es el Quimiostato (Figura 2.2) (Novick y Szilard, 1950; Herbert, et al., 1956) . Se trata de un sistema de crecimiento continuo, abierto para sustrato y biomasa (van Verseveld, et al., 1984). El volumen del cultivo se mantiene constante eliminando medio de cultivo utilizado y biomasa a la vez que se introduce con el mismo flujo medio de cultivo fresco.

En este tipo de biorreactores (quimiostatos) la tasa de crecimiento específica viene determinada por la tasa de dilución (D), que se define como el flujo de entrada de medio dividido por el volumen total del cultivo. A escalas de laboratorio (1-2 L), la tasa de dilución mínima está restringida a valores de 0.02 h^{-1} (Boender et al., 2009; Daran-Lapujade, et al., 2009; Overkamp et al., 2015). Cuando la tasa de dilución supera a la tasa de crecimiento del microorganismo a estudiar en las condiciones evaluadas, la concentración microbiana desciende drásticamente ya que se produce un lavado progresivo del cultivo (Figura 2.2) debido a que entra más medio del que el cultivo puede utilizar.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

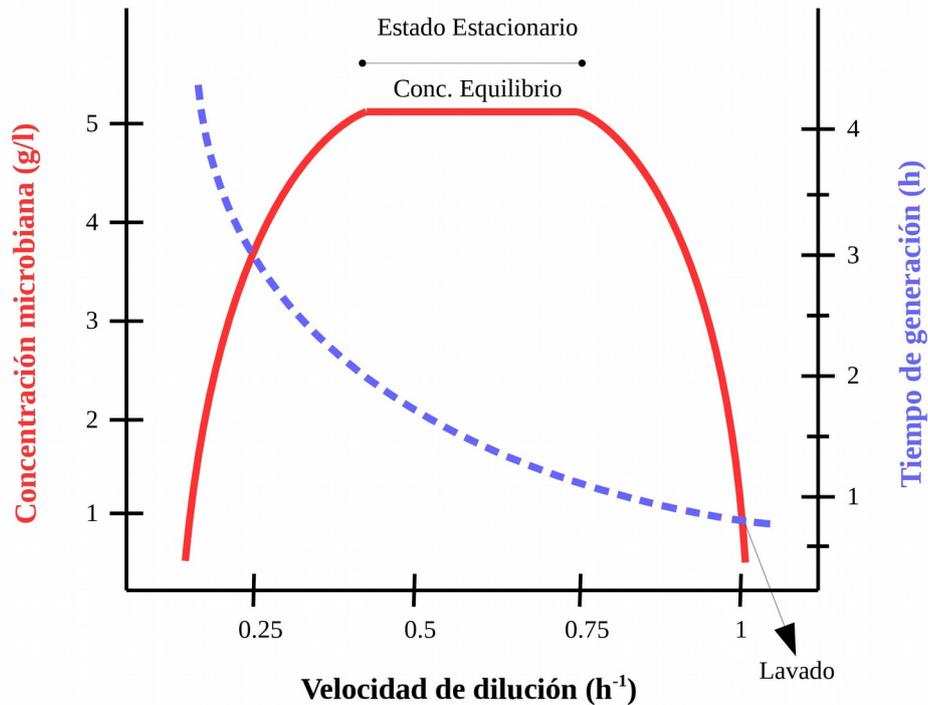


Figura 2.2. Relación de la concentración microbiana y el tiempo de generación a diferentes tasas de dilución en un quimiostato

Para disminuir aún más las tasas de crecimiento específicas, el quimiostato puede ser equipado en la salida de los efluentes con un sistema de filtrado (filtración tangencial) que retenga las células y elimine únicamente el sobrenadante. A este tipo de bioreactores se les conoce como retentostato (Herbert, 1961) (Figura 2.3). El retentostato es un sistema en continuo, abierto para los sustratos y cerrado para la biomasa (van Verseveld, et al., 1984).

Capítulo 2

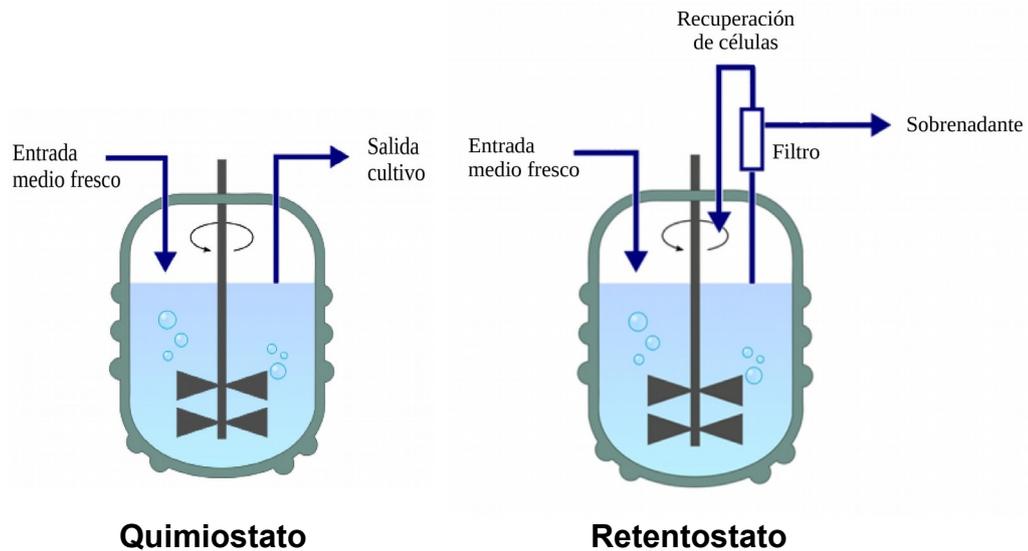


Figura 2.3 Esquema de un quimiostato y un retentostato (las células son retenidas por un filtro tangencial eliminando solo el sobrenadante).

La tasa de dilución en el retentostato es la misma que en el quimiostato, pero al ir aumentando la biomasa en el bioreactor debido a la retención celular, la cantidad de sustrato disponible para cada célula disminuye progresivamente. Como consecuencia la energía disponible para el crecimiento cada vez es más limitante hasta el punto de obtener con el tiempo tasas de crecimiento muy reducidas, cercanas a cero (Figura 2.4) (Ercan et al., 2015; van Mastrigt, et al., 2018). Al final del proceso, el sustrato es mayoritariamente catabolizado siendo destinado principalmente a procesos de mantenimiento.

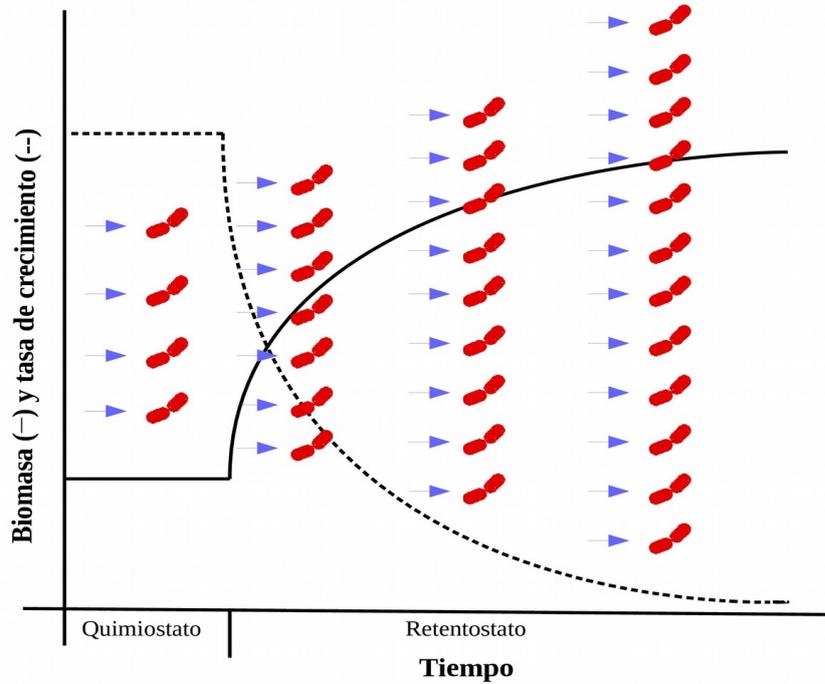


Figura 2.4. Relación de biomasa y tasa de crecimiento a lo largo del tiempo en un quimioestado y en un retentostato.

Distintas evidencias parecen sugerir la posibilidad de que diversos tipos bacterianos sean capaces de vivir en condiciones no óptimas (Keep et al., 2006; Marchant et al., 2008). Un ejemplo de estos microorganismos son las bacterias termófilas, principalmente del Phylum Firmicutes, que se han aislado de forma vegetativa en todos los suelos estudiados (Marchant et al., 2002, 2008; Portillo et al., 2012; Santana et al., 2013). Se ha sugerido que los representantes de estos termófilos de suelos, por ejemplo *Geobacillus*, sobreviven en el suelo presentando actividad muy reducida y un crecimiento muy bajo pero mantenido en el tiempo (Marchant et al., 2002, 2008).

Capítulo 2

Las características que presentan géneros como *Geobacillus* y *Parageobacillus* como: capacidad de formar esporas, motilidad celular (Nazina et al., 2001), una gran diversidad metabólica (Suzuki, 2018), actividad enzimática extracelular máxima a baja disponibilidad de agua (Gómez et al., 2021), elevada persistencia de enzimas extracelulares en suelos (Gómez et al., 2020) y elevada transferencia horizontal de genes (Esin et al., 2018), facilitan su supervivencia en una gran variedad de condiciones ambientales y son probablemente un reflejo de la variabilidad de sus hábitats y la flexibilidad de su capacidad adaptativa a esos ambientes.

Los estudios en retentostato de microorganismos a tasas de crecimiento específica reducidas o cercanas a cero, representan un área escasamente explorada en el campo de la Microbiología. Especialmente, estos estudios no han sido llevados a cabo hasta la fecha con microorganismos termófilos y podría ser de gran interés ya que muchos de estos microorganismos se encuentran en una gran variedad de nichos (Suzuki, 2018) en los que el crecimiento cero es probablemente un estado común de persistencia y adaptación a esas condiciones ambientales.

Aquí describimos el cultivo de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6, (aislada de suelos de Doñana, CECT9776) en un retentostato con el objetivo de investigar las respuestas fisiológicas a tasas de crecimiento específico cercanas a cero.

2.3. Materiales y métodos.

El bioreactor utilizado ha sido diseñado por el grupo de investigación para el desarrollo de la tesis. Consta de un reactor cilíndrico de vidrio (volumen máximo de 2l) con camisa termostática por la cual circula agua procedente de un baño con refrigeración AP07R-20 (VWR, Atlanta, Georgia, USA), un refrigerador Davis, una bomba de aire “Eheim 400” (Eheim, Deizisau, Alemania), un difusor de aire, cuatro bombas peristálticas “Welco WPM2” (Welco, Tokio, Japón), una bomba de gran caudal “Welco WP1200”, un medidor de pH autoclavable “BOQU pH5806/S8” (Boqu, Shangai, China) y un filtro tangencial autoclavable con un tamaño de poro de 0,2 μm “MiniKros Hollow fiber filter” (C02-P20U-05N PES/0.2 μm ; Repligen Co., Rancho Domínguez, California, EE. UU).

La mezcla del cultivo en el interior de la cubeta se realizaba mediante agitación magnética ajustable y la aireación del cultivo.

Las bombas peristálticas y el medidor de pH son controlados por un programa diseñado a tal fin por el grupo de investigación, escrito en C y utilizando el sistema operativo linux Raspian instalado en un ordenador de placa simple Rapsberry Pi3.

2.3.1 Quimiostato

Antes de comenzar con el cultivo en el bioreactor, se prepararon precultivos inoculando una única colonia de una placa de agar nutritivo NB (composición por litro: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 15 g de agar) en 20 ml de medio de cultivo NB líquido (misma composición pero sin agar) y se incubó a 60° C durante toda la noche. A la mañana siguiente se traspasaron 0,5 ml del cultivo ya crecido a un matraz con 50 ml de NB y se incubó a 60° C hasta alcanzar la fase exponencial que se utilizó como inóculo de los biorreactores. Durante el

Capítulo 2

cultivo en los biorreactores el pH se mantuvo a 7.0 mediante la adición automática de ácido clorhídrico 0,1 M.

Se realizaron cultivos de quimiostato con medio NB diluido 5 veces por duplicado a una tasa de dilución, D (definida como la relación entre la tasa de alimentación del medio, 0,045 l/h, y el volumen de cultivo, 1,7 l) de $0,025 \text{ h}^{-1}$. Los bioreactores se hicieron funcionar a 60° C en condiciones aeróbicas con un caudal de aire de $3 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ y una velocidad de agitación de 500 r.p.m.

La formación de espuma en el bioreactor debido a la mezcla vigorosa y el burbujeo con aire se evitó añadiendo 1 ml del agente antiespumante (Xiameter ACP-1500) cada 12 horas.

La configuración experimental para el cultivo en retentostato de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 requirió una modificación importante con respecto a otros estudios a tasas de crecimiento cercano a cero (Ercan et al., 2013; Overkamp et al., 2015). La alta temperatura (60° C) empleada para el crecimiento de la cepa 23.6 provocaba una acentuada evaporación del medio de cultivo a lo largo del tiempo, haciendo que disminuyese el volumen del bioreactor. Para evitar la pérdida de volumen y no alterar la tasa de dilución, se instaló en la cabeza del bioreactor un refrigerador Davis por el cual circulaba agua a 20° C haciendo que el vapor de agua generado se condensase y regresase al bioreactor.

El estado estacionario en el quimiostato se definió como la condición en la que los parámetros de cultivo (densidad óptica a 600 nm) eran constantes durante al menos 2 cambios del volumen de trabajo.

2.3.2 Retentostato

Se iniciaron dos experimentos individuales de retentostato a partir de cultivos de quimiostato a la tasa de dilución de $0,025 \text{ h}^{-1}$. Después de alcanzar la estabilidad en el quimiostato, los biorreactores se cambiaron al modo retentostato, haciendo pasar el cultivo a través del sistema de filtración tangencial para retener la biomasa y eliminar el sobrenadante. Para verificar el buen funcionamiento del filtro se sembraron periódicamente $100 \mu\text{l}$ del cultivo filtrado (sin bacterias) en placas de agar NB y se incubaron a 60° C durante toda la noche. Los cultivos en retentostato se hicieron funcionar en las mismas condiciones (temperatura, pH, caudal medio, oxigenación, velocidad de agitación, adición antiespumante) que en modo quimiostato.

La pureza del cultivo puede ser un problema con cultivos a largo plazo. Una de las ventajas de trabajar con un microorganismo termófilo es que permite reducir posibles problemas de contaminación cruzada. Las altas temperaturas (60° C) y el flujo de aire ascendente caliente que se genera dificulta mucho la contaminación por otros microorganismos.

2.3.3. Medidas

Durante el cultivo de quimiostato y retentostato, se extrajeron muestras del bioreactor para determinar diferentes parámetros: concentraciones de biomasa (peso seco de las células), densidad óptica a 600 nm , unidades formadoras de colonias (UFC), recuento al microscopio del número total de células, biovolumen celular y análisis al microscopio electrónico de transmisión.

El volumen extraído en cada muestreo fue el mínimo (12 ml), con el fin de influir lo menos posible en el volumen del bioreactor. Se tomaron un total de 10 muestras

Capítulo 2

a lo largo del tiempo: T0 = quimiostato, T1= 2 días, T2= 4 días, T3 = 7 días, T4= 14 días, T5= 21 días, T6= 20 días, T7= 35 días, T8= 45 días y T9= 52 días. También se cogieron muestras (1ml) durante la fase exponencial (Exp) y el periodo de estabilización del quimiostato (T0.1; T0.2; T0.3).

El peso seco de las células se determinó por duplicado filtrando 5 ml de cultivo a través de filtros de membrana de acetato de celulosa (0,22 μm diámetro de poro) previamente pesados. Los filtros con las células recogidas fueron secados a 105° C durante 24 h y tras alcanzar la temperatura ambiente pesados.

Para estimar la fracción de células muertas en muestras de cultivo, se utilizó el compuesto fluorescente, bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC₄(3)) (máximo excitación 490 nm y máximo emisión 516 nm, verde), que solo penetra en células con membranas dañadas que son permeables (Beck y Huber, 1997). Se añadió 4 μl de DiBAC₄(3) (25 μM disuelto en etanol) a 100 μl de cultivo (concentración final 1 μM) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La enumeración de las fracciones de células vivas se realizó restando las células marcadas con DiBAC₄(3) al total del número de células en cada tiempo. Para estos recuentos se utilizó un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop 2 equipado con un cassette de fluorescencia BP 450-490/FT150/LP515.

Adicionalmente, las unidades formadoras de colonias (UFC) se estimaron mediante el método de siembra en microgotas. Se hicieron diluciones seriadas (1/10) de la muestra en medio de cultivo líquido NB (entre 4 y 7 diluciones) y se sembraron por triplicado 10 μl de las tres últimas diluciones en placas de agar NB. Se esperó a que la gota se secase y se incubó a 60° C durante toda la noche.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

El recuento del número total de células se llevó a cabo en un microscopio óptico de contraste de fase Olympus BX40F-3 (aumentos totales 400x) utilizando un hemocitómetro para bacterias (EKDS, 0.02 mm profundidad, $1/400 \times 1/16 \text{ mm}^2$). Las células se fijaron con formaldehído (concentración final 2%). Se hicieron fotos de todas las muestras a las bacterias comprendidas en las mismas 12 cuadrículas y siguiendo el mismo patrón de recuento.

Debido a la forma de bacilo de la cepa 23.6, el biovolumen celular se calculó siguiendo la fórmula $Vol = (\pi/4) \cdot A^2 \cdot (L - (1/3) \cdot A)$ (Bratbak, 1985), donde A es la anchura de la célula y L es la longitud. Las medidas celulares se llevaron a cabo en el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) utilizando como referencia un objetivo micrométrico de 0.01 mm (Nikon Co., Tokio, Japón).

Para el análisis al microscopio electrónico de transmisión (TEM, Zeiss Libra 120) se fijaron las células con glutaraldehído pH 7.2 (concentración final 2,5%) durante una hora a temperatura ambiente y a 4° C durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron las células tres veces en tampón cacodilato 0.2 M pH 6.5 y se conservaron en frío (4° C). El resto del proceso de preparación de las muestras fue llevada a cabo por el Servicio de Microscopia de la Universidad de Sevilla (CITIUS) donde se realizó la observación y su fotografiado.

2.3.4. Cálculo de la tasa de crecimiento en un cultivo continuo

En un cultivo continuo (quimioestado) la tasa de crecimiento está limitada por el flujo de nutrientes en un volumen determinado, dicho con otras palabras, la tasa de dilución en el cultivo. La dilución en un cultivo continuo representa el aporte de nutrientes en el tiempo. La tasa de crecimiento se iguala a la tasa de dilución a lo largo del tiempo porque los nutrientes aportados son directamente proporcionales

Capítulo 2

al crecimiento que el cultivo puede experimentar en condiciones constantes (Herbert et al., 1956).

La ecuación 1 muestra el cálculo de la tasa de dilución en un quimiostato.

$$D = F / V \quad \text{(ecuación 1)}$$

donde D, es la tasa de dilución (h^{-1}); F, es el flujo de medio de cultivo fresco (l/h); y V, el volumen de cultivo (l) en el bioreactor.

Comparación y cálculo de la tasa de crecimiento y del tiempo de duplicación.

$$\mu = \text{Ln}(2) / t_g \quad t_g = \text{Ln}(2) / \mu$$

μ , tasa de crecimiento (h^{-1})

t_g , tiempo de duplicación o tiempo de generación

$\text{Ln}(2) = 0.693$, es el logaritmo natural de 2.

La cinética de crecimiento de cultivos en continuo con retención de células (retentostato) se predice en base a una ecuación de balance de masa para biomasa (ecuación 2) (van Verseveld et al., 1986). Esta ecuación asume (i) una retención completa de las células en el retentostato y (ii) un volumen constante. En base al filtro utilizado (0.2 μm diámetro de poro) en el sistema de filtración tangencial para la retención de las células en el retentostato y la determinación experimental de que no se pierde un número significativo de células en el desecho, la primera asunción es correcta establecerla. El volumen se mantiene constante a lo largo del experimento, lo que supone también correcto el segundo punto.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

$$dC_x/dt = \mu C_x \quad \text{(ecuación 2)}$$

C_x , concentración de biomasa (g/l)

t, tiempo de incubación

dC_x/dt , Variación de la concentración de biomasa con respecto al tiempo de incubación (o derivada de la biomasa a lo largo del tiempo)

μ , tasa de crecimiento (h^{-1})

A partir de la ecuación 2, podemos expresar la variación de la concentración de biomasa con respecto al tiempo a través de la ecuación 3 en la que la variación de la biomasa sigue un modelo logarítmico de limitación del crecimiento a lo largo del tiempo de experimentación en el retentostato. Este modelo logarítmico se ajusta a la progresiva limitación en la tasa de crecimiento de las células en el retentostato a diferencia de las publicaciones previas en la que se proponía un modelo exponencial de aumento de la biomasa (Boender et al., 2009; Ercan et al., 2013; Overkamp et al., 2015). Esta corrección es crítica para poder calcular la tasa de crecimiento en función del tiempo en el retentostato.

$$C_x = A \ln(t) + B \quad \text{(ecuación 3)}$$

C_x , indica la concentración de biomasa (g/l)

t, tiempo de incubación

A y B son parámetros que determinan la curva al representar C_x vs. t.

A partir de la ecuación 2 se puede estimar la tasa de crecimiento μ :

$$\mu = (dC_x/dt) / C_x \quad \text{(ecuación 4)}$$

Capítulo 2

Para estimar μ tendremos que calcular la derivada a la ecuación 2 en función del tiempo. Esto puede realizarse utilizando el modelo presentado en la ecuación 3.

$$(dC_x/dt) = C_x' = A(1/t) \quad \text{(ecuación 5)}$$

C_x , indica la concentración de biomasa (g/l)

C_x' , derivada a la curva en t o pendiente de la curva para cada tiempo.

t, tiempo de incubación

A, es el coeficiente de regresión obtenido por regresión no lineal de los datos de biomasa frente al tiempo.

Evaluando la fracción de células viables en el retentostato podemos comprobar la fracción de células viables o en crecimiento en el cultivo. Para considerar esta fracción de células en casos en los que se pudiera ver significativamente afectado el número de células activas en el cultivo, podríamos estimar la tasa de crecimiento correspondiente sólo a células viables en el cultivo a través de la expresión (ecuación 6).

$$\mu = (dC_x/dt) / C_{x, \text{viable}} \quad \text{(ecuación 6)}$$

μ , tasa de crecimiento (h^{-1}) de las células activas.

(dC_x/dt) pendiente de la recta en t, o, lo que es igual, derivada a la curva en t.

$C_{x, \text{viable}}$, representa la fracción activa de la biomasa total.

2.4. Resultados

Parageobacillus thermoglucosidasius es una especie descrita con la capacidad de formar esporas. Esta característica dificultaría la estimación de los parámetros del cultivo debido a la inactividad de las endosporas y a su acumulación (Jørgensen et al., 2010). Por lo tanto, en este supuesto, las tasas de crecimiento sería difícil que tendiesen a cero durante el proceso de cultivo en modo retentostato.

Debido a que la esporulación interferirá con el objetivo de alcanzar un estado de crecimiento muy reducido o cercano a cero, en este estudio se usó la cepa 23.6 porque en estudios previos en el laboratorio solo se observó la formación de esporas cuando en el medio de cultivo había concentraciones altas de manganeso (Charney et al., 1951). La cepa 23.6 se creció a diferentes temperaturas y en medios con distinta composición de nutrientes y pH. El estrés generado por la escasez de nutrientes en los cultivos en modo retentostato no indujo la formación de esporas en la cepa 23.6.

El uso de una cepa que no requiere modificación genética nos permite interpretar la respuesta “natural” del organismo de una forma mas fidedigna Y este estudio representa el primer caso en el que una cepa termófila no modificada ha sido utilizada para obtener tasas de crecimiento muy reducidas, cercanas a cero.

Para el cultivo de retentostato, los biorreactores fueron equipados con un sistema de filtración de flujo tangencial. Estos filtros fueron elegidos por su gran superficie de filtración, minimizando el riesgo de obstrucción durante el cultivo. Durante 52 días la filtración continua del cultivo se llevo a cabo sin obstrucciones.

Para alcanzar un flujo de alimentación de 45 ml/h las bombas peristálticas están equipadas con tubos de un diámetro interior de 1 mm. Uno de los experimentos

Capítulo 2

se detuvo a los 21 días debido a una obstrucción generada en el tubo de alimentación.

Al tratarse de un cultivo en continuo, tanto en quimiostato como en retentostato la velocidad de entrada de medio tiene que ser la misma que la de salida de desechos para mantener así el volumen constante en el bioreactor. El burbujeo vigoroso que mantiene la oxigenación del cultivo puede introducir burbujas de aire en el tubo de salida y provocar una diferencia entre el volumen de entrada y el de salida. Para evitar esto el tubo de salida termina en una pieza de vidrio con forma de U, impidiendo que las burbujas incidan directamente y se introduzcan en el tubo de salida.

El burbujeo y la evaporación que tiene lugar a 60°C hace que algunas células asciendan y queden retenidas en los filtros de venteo. Con el tiempo estos filtros se saturan e impiden que el aire pueda salir con facilidad. La retención del aire en el interior del bioreactor genera un aumento de la presión y como consecuencia una disminución del burbujeo, poniendo en riesgo la oxigenación del cultivo. Para que las condiciones se mantengan constantes durante el proceso debemos reemplazar periódicamente los filtros de venteo.

Otro posible riesgo de este tipo de sistemas de cultivo en retentostato y quimiostato es que los microorganismos pudieran, con el paso del tiempo, acceder a la fuente externa de nutrientes o medio fresco. Debido a que la velocidad de alimentación es lenta (45 ml/h) las bacterias móviles podrían alcanzar el medio de cultivo fresco y comenzar su consumo incontroladamente. Para evitar el crecimiento a lo largo del tubo de suministro de medio de cultivo fresco se instaló un gotero en el tubo donde el medio fresco es impulsado por aire

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

estéril hacia el bioreactor e impide que los microorganismos puedan progresar hacia el interior del tubo de aporte de nuevo medio para el cultivo.

2.4.1 Crecimiento y viabilidad

Se cultivó *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en condiciones de retentostato aeróbico en medio NB diluido 5 veces. Se realizaron con éxito dos cultivos independientes de retentostato uno durante 21 días (retentostato 1) y otro durante 52 días (retentostato 2) para estudiar la adaptación de la cepa 23.6 a tasas de crecimiento específicas cercanas a cero.

El crecimiento de las células de la cepa 23.6 siguió una distribución logarítmica, la biomasa se acumulada en el bioreactor hasta alcanzar una asíntota horizontal (la variación de la biomasa con respecto al tiempo llega a ser insignificante, tiende a cero) (retentostato 2) indicando que el crecimiento es cercano a cero al final del experimento (Figura 2.5). A pesar de las diferencias en biomasa de ambos experimentos las tasas de crecimiento específicas (μ) de cada tiempo son similares. A los 21 días, μ disminuyó de $0,025 \text{ h}^{-1}$ a $0,00056 \text{ h}^{-1}$ y $0,00093 \text{ h}^{-1}$ (retentostato 1 y 2, respectivamente) (Figura 3.5). Al final del cultivo del retentostato 2 (52 días) se alcanzó un mínimo de 0.0002 h^{-1} que corresponde con un tiempo de duplicación de aproximadamente 141 días.

Capítulo 2

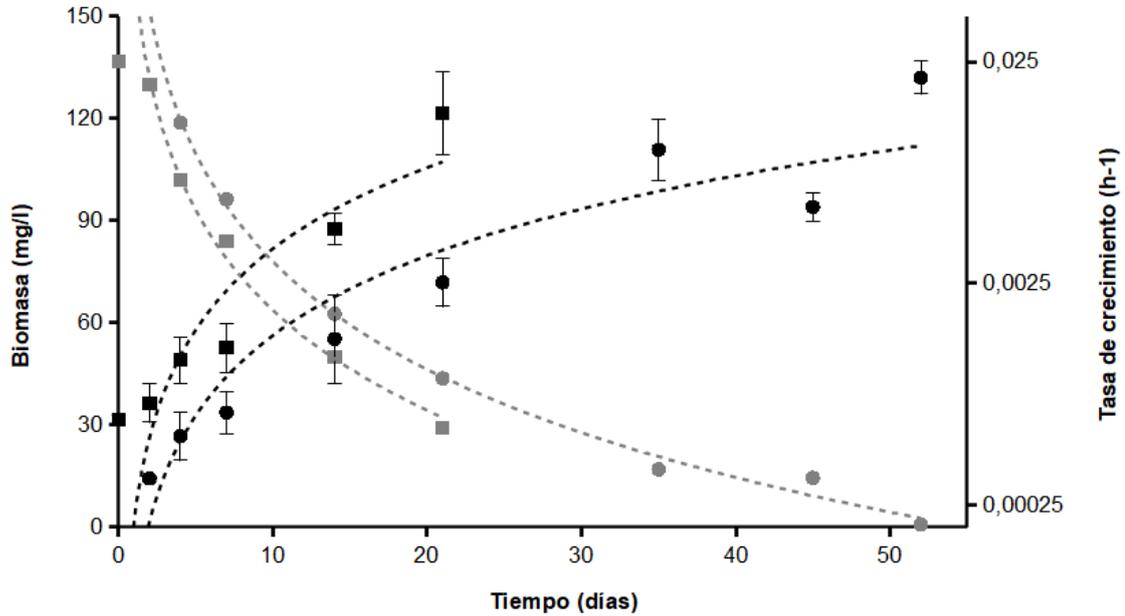


Figura 2.5. Crecimiento de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en cultivo en continuo con recirculación de células: retentostato 1 (cuadrados) y retentostato 2 (círculos). Evolución de la concentración de biomasa (puntos y líneas negras) y de la tasa de crecimiento específica (puntos y líneas grises) en el tiempo.

Durante el experimento se han cumplido las premisas de un cultivo en retentostato: El volumen del cultivo no ha variado significativamente, los recuentos periódicos de UFC en el efluente mostraron que no se perdía biomasa del bioreactor y según se evaluó con microscopía de fluorescencia, demostramos que se mantenía la viabilidad de los cultivos, con un valor de 99%, aproximadamente, en las etapas iniciales (T0-T6) bajando a un 96% al final del cultivo (T7-T9).

En la representación de los datos se ha considerado una viabilidad del 100 %. Esto se ha basado en el mantenimiento de los recuentos de UFCs y la representación de casi la totalidad de células con un sistema de envueltas

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

celulares intacta evaluado por recuentos de microscopía con el colorante fluorescente vital, DiBAC₄(3). En cualquier caso, en base a los cálculos efectuados, sólo se observarían diferencias significativas cuando la viabilidad del cultivo fuese inferior al 70% del total de células (Figura 2.6). Los cambios drásticos en la tasas de crecimiento se observarían cuando la viabilidad se reduzca bruscamente y la proporción de células dañadas aumente muy considerablemente (Figura 2.6)

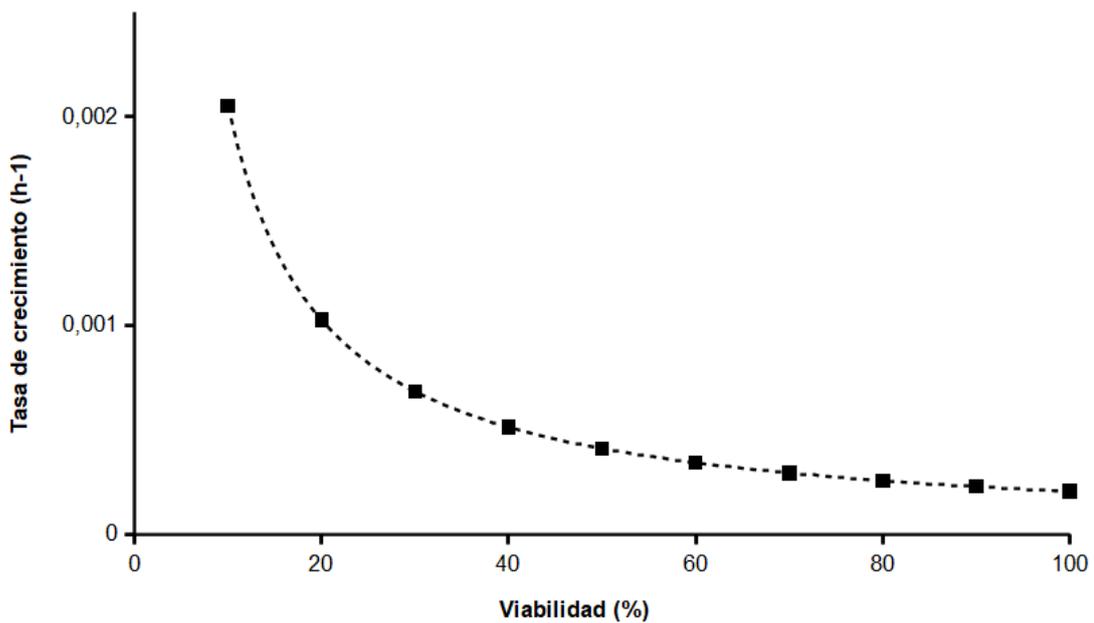


Figura 2.6. Estimación de la variación en la tasa específica de crecimiento con respecto a cambios de viabilidad en el cultivo. Nótese la respuesta asintótica para una mayoría de células activas/viables en el cultivo y sólo se observa un incremento exponencial en los cálculos de la tasa de crecimiento específico para aquellos casos en los que la fracción de células intactas activas se vea seriamente comprometida.

3.4.2. Morfología celular

Se evaluó la morfología y el biovolumen celular de la cepa 23.6 durante los experimentos en retentostato, incluyendo la fase exponencial (Exp) de crecimiento y de quimiostato (T0.1-T0.3). Se muestran solo los resultados del retentostato 2 para simplificar y facilitar su comprensión ya que los resultados del retentostato 1 fueron muy similares y el experimento número 2 fue el de mayor duración.

Durante la fase previa al retentostato los tamaños celulares en cada tiempo son similares y se van reduciendo conforme se alcanza la estabilización de la tasa de crecimiento en el quimiostato (Figura 2.7). En el retentostato la morfología celular pareció ser más heterogénea, dominando las células cortas. Al disminuir la tasa de crecimiento específica, comenzaron a aparecer células que eran más largas que la célula típica (tamaño estándar durante crecimiento constante), algunas alcanzando longitudes de más de 30 veces la de la célula única vegetativa habitual al comienzo del cultivo de retentostato (Figura 2.7, T9).

Con el fin de entender mejor los cambios de morfología de la cepa 23.6 durante su cultivo en retentostato se establecieron grupos de tamaños según su biovolumen (μm^3): < 3 , 3-5, 5-8, 8-12 y > 12 . Las células con un biovolumen inferior a $3 \mu\text{m}^3$ no se estarían dividiendo o han completado su división, el resto de tamaños si implicaría un estado de división o aumento progresivo de biomasa celular.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

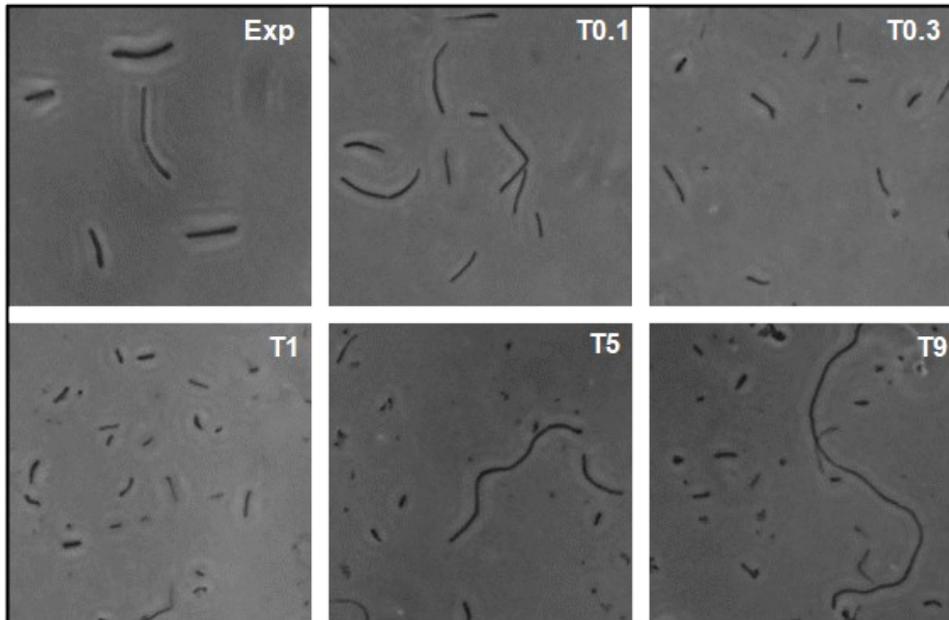


Figura 2.7. Cambios en la morfología celular de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 durante el cultivo en retentostato.

En la figura 2.8 se representa el porcentaje de cada grupo de tamaño desde el inicio del cultivo hasta el final del retentostato. En la fase exponencial, como era de esperar, no se observan células con un biovolumen inferior a $3 \mu\text{m}^3$ y más del 95% de las células están comprendidas en las clases de tamaños superiores.

Durante el proceso de estabilización del quimiostato el tamaño celular se va reduciendo de forma progresiva ya que el biovolumen celular se va concentrando en las tres clases de tamaño con un biovolumen inferior. Alcanzar una tasa de crecimiento constante se ve reflejado en una estabilización del tamaño celular en las clases de tamaños.

Capítulo 2

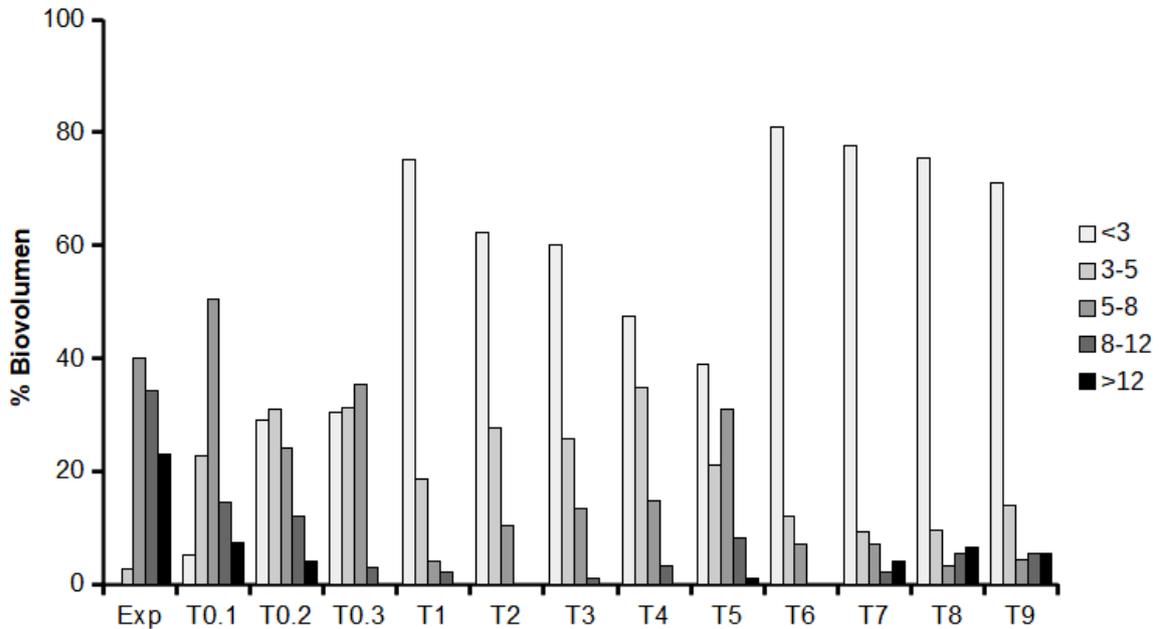


Figura 2.8. Porcentajes de las cinco clases de tamaño dados por el biovolumen de las células de *Parageobacillus thermoglucosidasius* durante su cultivo en fase exponencial (Exp), en quimiostato (T0.1 a T0.3) y en retentostato (T0 a T9).

En el periodo de retentostato el biovolumen dominante general es inferior a $3 \mu\text{m}^3$ y los cambios en el biovolumen celular concuerdan con la disminución progresiva de las tasas de crecimiento específica. Se observa como en las primeras etapas del retentostato (Figura 2.8, T1-T5), cuando las velocidades de crecimiento no son tan bajas, el biovolumen inferior a $3 \mu\text{m}^3$ disminuye rápidamente del mismo modo que aumentan los biovolúmenes superiores a $5 \mu\text{m}^3$. Por otro lado, en las etapas finales del retentostato (Figura 2.8, T6-T9) la disminución del biovolumen inferior a $3 \mu\text{m}^3$ es mucho más lenta debido a que las tasas de crecimiento son muy bajas. En este periodo los biovolúmenes superiores a $8 \mu\text{m}^3$ dominan el estado de división celular, llegándose a registrar células con un biovolumen máximo de 101

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

μm^3 . El hecho de que se observe descenso en el número de células de menor tamaño también confirma, una vez más, la existencia de crecimiento celular que, como hemos visto, se reduce progresivamente a lo largo del tiempo de incubación en el retentostato como resultado de la limitación de recursos disponibles para las células del cultivo.

2.5. Discusión.

2.5.1. Crecimiento en situaciones limitantes

Se implementó una configuración para cultivar el microorganismos termófilo *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a tasas de crecimiento extremadamente bajas y se estudió su adaptación a condiciones de crecimiento cercanas a cero mediante el análisis de la acumulación de biomasa, la viabilidad del cultivo y su morfología.

Utilizar una bacteria termófila tiene la ventaja de que reduce mucho el riesgo de contaminación con otros microorganismos y no requiere introducir modificaciones genéticas que favorezcan su identificación, pero también tiene inconvenientes que hemos tenido que solventar con varias adaptaciones en el bioreactor como: (i) la instalación de un gotero para evitar que las células de *P. thermoglucosidasius* 23.6 crezcan por la línea de alimentación de medio y genere obstrucciones, (ii) la instalación de un refrigerador Davis que impida la pérdida de volumen del bioreactor por evaporación y no se altere la tasa de dilución. Debido a la prolongada duración experimental y el elevado número de elementos que intervienen en el cultivo en un retentostato, existen riesgos que pueden desestabilizar el cultivo. Este tipo de cultivos son muy laboriosos y hemos dedicado mucho tiempo y esfuerzo en la configuración del retentostato.

Capítulo 2

En diferentes estudios de cultivos en retentostato (Boender et al., 2009; Ercan et al., 2013; Overkamp et al., 2015) las tasas de crecimiento específicas se han calculado ajustando el aumento de la biomasa en el tiempo a una ecuación exponencial $C_x = A \cdot e^{B \cdot t} + C$ (Figura 2.9). El modelo exponencial de crecimiento indicaría un aumento exponencial de la biomasa en el tiempo y es típico en las etapas iniciales de un cultivo en "batch" (Figura 2.1) donde hay un exceso de nutrientes y los microorganismos alcanzan su máxima tasa de crecimiento.

Por el contrario en un cultivo de retentostato, donde los nutrientes por célula bacteriana disminuyen con el tiempo, observamos que el aumento de la biomasa no es exponencial si no que tiende a alcanzar su asíntota con el tiempo al experimentar una reducción progresiva de la tasa de crecimiento, ajustándose mas a un modelo logarítmico (Figura 2.9).

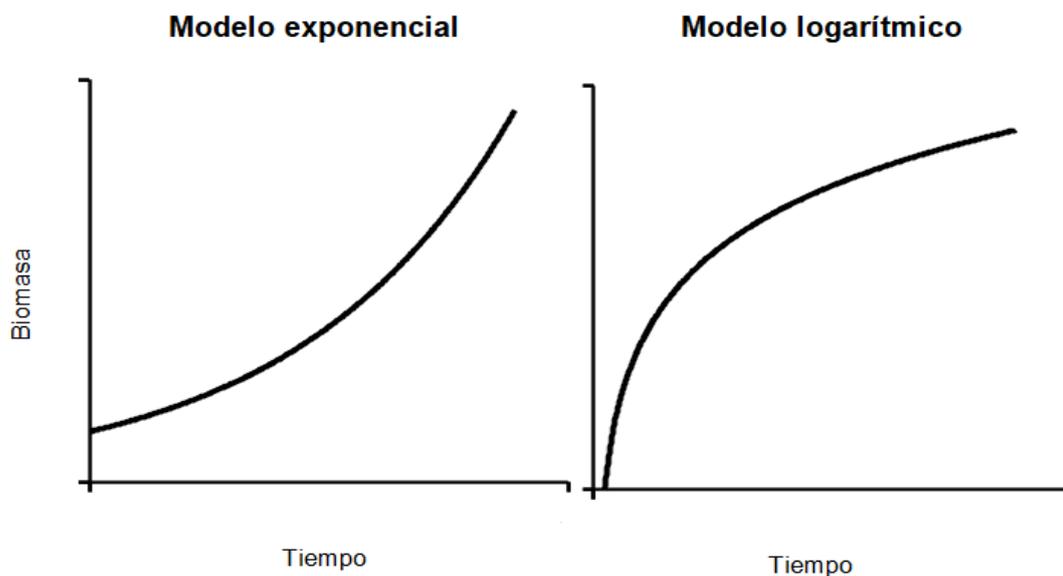


Figura 2.9. Comparación de la evolución de la biomasa en el tiempo en un modelo de crecimiento exponencial y logarítmico.

Esta confusión también ha podido ser debido a un error en la explicación matemática del proceso aunque los cálculos pudieran haberse efectuado

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

correctamente. Este hecho queda por confirmar pero lo que es un hecho es que el modelo logaritmo se ajusta al modelo de trabajo que lo justifica y cuadra con los resultados experimentales (nuestros datos y los de otros autores) (Boender et al., 2009; Ercan et al., 2013; Overkamp et al., 2015) y la conceptualización del proceso encaminado a la limitación del crecimiento celular a lo largo del tiempo.

En general los termófilos cultivados en “batch” presentan tasas de crecimiento muy altas (Manchant y Banat, 2010), por ejemplo, la cepa 23.6 durante la fase exponencial tiene un tiempo de duplicación de 18 minutos. Altas tasas de crecimiento conllevan a un rápido consumo de los nutrientes. Pavlostathis y colaboradores describen que en *Geobacillus thermoleovorans* el agotamiento de los nutrientes induce un colapso de la población acompañado de una lisis celular extensa que no se puede revertir mediante la adición de más nutrientes (Pavlostathis et al., 2006).

En nuestro experimento hemos demostrado que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 alcanza tasas de crecimiento específico extremadamente bajas ($0,0002 \text{ h}^{-1}$ al final del cultivo) y que mantiene una viabilidad alta durante todo el cultivo. Nuestros datos confirman que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 es capaz de persistir a tasas de crecimiento muy reducidas. Por lo tanto, reduciendo la tasa de crecimiento en función de la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales, representaría una estrategia de adaptación a ambientes cambiantes encaminada a mantener la persistencia de estas células en esos ecosistemas. Un ejemplo, de estos ecosistemas naturales serían los suelos, donde estas células termófilas habitan manteniendo su viabilidad. Estos resultados están de acuerdo con las perspectivas planteadas por Marchant et al. (2002, 2008) pero descartan los planteamientos de Zeigler (2014) que atribuyen la presencia de termófilos en

Capítulo 2

suelos meramente al azar y a la dispersión de células desde ambientes geotérmicos o cálidos (i.e., zonas geotermales o desiertos).

Este hito es importante porque refuerza la idea de que los microorganismos termófilos pueden vivir en condiciones que no son óptimas para su crecimiento. Hoy en día, es un hecho que los suelos albergan una comunidad compleja y omnipresente de microorganismos termófilos, representados principalmente por los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus*, que desempeñan funciones de importancia en el ecosistema suelo (Portillo et al. 2002; Santana et al. 2003; Santana y González, 2015; Gómez et al., 2021) y que han desarrollado mecanismos adaptativos y una estrategia propia de persistencia en estos ambientes.

2.5.2. Biovolumen celular en relación a la tasa de crecimiento

La presencia de células largas en cultivos de cepas del género *Geobacillus* ha sido descrita previamente (Marchant et al., 2002). En este caso la proporción de células largas aumenta durante la fase exponencial (tasas de crecimiento altas) y posteriormente se produce la división celular de dichas células.

La división celular es un proceso cíclico y nuestros resultados muestran que la duplicación del ADN y otros componentes celulares son más rápidos que la citocinesis, favoreciendo el desarrollo de células largas. Sin embargo, la reducida tasa de crecimiento en retentostato implica la generación de un gran número de células reducidas y un bajo número de células alargadas. En la figura 2.10 se muestra varias moléculas de ADN en una misma célula de la cepa 23.6 durante la fase exponencial de crecimiento.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

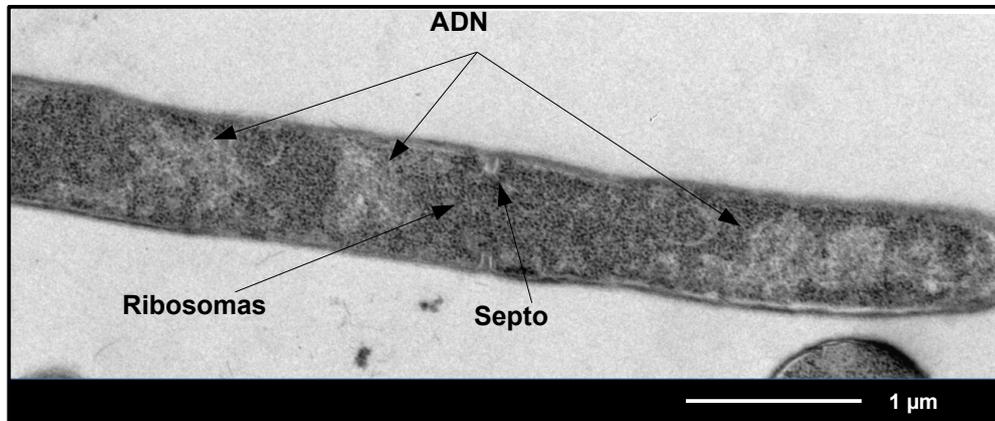


Figura 2.10. Fotografía al microscopio electrónico de transmisión de una célula de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 durante la fase exponencial de crecimiento.

Al disminuir la velocidad de crecimiento parece que la formación del septo se ralentiza aun mas dando lugar a células muy largas. Sin embargo el número de células alargadas en exceso es reducido debido a las reducidas tasas de crecimiento durante el cultivo en retentostato.

Un cultivo de *Bacillus subtilis* (género taxonómicamente cercano a *Parageobacillus*) en retentostato (Overkamp et al., 2015) describe el mismo fenómeno que nosotros, a medida que disminuye la tasa de crecimiento aumenta la presencia de células largas. Anteriormente también se había observado esta morfología en *Bacillus subtilis* (Ohnishi et al., 1999; Gregory et al., 2008; Cozy y Kearns, 2010) y se propuso que las causas estaban relacionadas con la división celular, separación y composición de la membrana.

La regulación de la división celular es un proceso complejo (Jensen et al., 2005; Adams y Errington., 2009; Treuner-Lange y Søgaard-Andersen., 2014;) y posiblemente una amplia variedad de causas puede generar este tipo de

Capítulo 2

morfología. No obstante, los diferentes biovolúmenes celulares observados en este estudio parecen corroborar la existencia de una tasa de crecimiento muy baja y confirma esta estrategia para la persistencia de esas células en condiciones drásticamente limitantes de su crecimiento.

2.6. Conclusiones

Como consecuencia de que las células experimentaron una drástica limitación nutricional en el cultivo en retentostato, las células han sido capaces de persistir en un estado metabólicamente activo pero a tasas de crecimiento extremadamente reducidas. Este trabajo muestra que el cultivo en retentostato es un sistema de cultivo controlado y estable, adecuado para el estudio de microorganismos termófilos como *Parageobacillus thermoglucosidasius* y de su capacidad para persistir en ambientes adversos o a través de períodos de escasa disponibilidad de nutrientes o condiciones adversas.

Los estudios próximos se centrarán en analizar la adaptación de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero en cultivos de retentostato mediante análisis transcriptómico, lo que complementará los resultados obtenidos a través de este sistema de cultivo imprescindible para el análisis de las células a tasas muy reducidas de crecimiento de forma que podremos comprender mejor algunas de las estrategias adaptativas de estas células.

2.7. Bibliografía

- Adams, D. W., Errington, J. (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9): 642–653.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Catalysis and the use of energy by cells. *In Molecular Biology of the Cell*, (Garland Science), pp: 68-91.
- Aldén, L., Demoling, F., Bååth, E. (2001) Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Applied and environmental microbiology*, 67(4): 1830-1838.
- Amy, P. S., Morita, R. Y. (1983) Starvation-survival patterns of sixteen freshly isolated open-ocean bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 45(3), 1109-1115.
- Beck, P., Huber, R. (1996) Detecction of cell viability in cultures of hyperthermophiles. *FEMS Microbiology Letters*, 148(1): 11-14.
- Boender, L. G., de Hulster, E. A., van Maris, A. J., Daran-Lapujade, P. A., Pronk, J. T. (2009) Quantitative physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero specific growth rates. *Applied and environmental microbiology*, 75(17): 5607-5614.
- Bratbak G. (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Applied and environmental microbiology*, 49(6): 1488-1493.

Capítulo 2

- Charney, J., Fisher, W. P., Hegarty, C. P. (1951) Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *Journal of bacteriology*, 62(2): 145-148.
- Cozy, L. M., Kearns, D. B. (2010) Gene position in a long operon governs motility development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 76(2) 273- 285.
- Demoling, F., Figueroa, D., Bååth E. (2007) Comparison of factors limiting bacterial growth in different soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(10): 2485-2495.
- Ekblad, A., Nordgren, A. (2002) Is growth of soil microorganisms in boreal forests limited by carbon or nitrogen availability?. *Plant and Soil* 242: 115-122 .
- Ercan, O., Smid, E. J., Kleerebezem, M. (2013) Quantitative physiology of *Lactococcus lactis* at extreme low-growth rates. *Environmental microbiology*, 15(8): 2319-2332.
- Ercan, O., Bisschops, M. M., Overkamp, W., Jørgensen, T. R., Ram, A. F., Smid, E. J., Pronk, J. T., Kuipers, O. P., Daran-Lapujade, P., Kleerebezem, M. (2015) Physiological and Transcriptional Responses of Different Industrial Microbes at Near-Zero Specific Growth Rates. *Applied and environmental microbiology*, 81(17): 5662-5670.
- Errington J. (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature reviews. Microbiology*, 1(2): 117-126.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

- Esin, A., Ellis, T., Warnecke, T. (2018) Horizontal gene flow into *Geobacillus* is constrained by the chromosomal organization of growth and sporulation. *BioRxiv*.
- Ferenci T. (2001) Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state. *Environmental microbiology*, 3(10): 605-611
- Gómez, E. J., Delgado, J. A., González, J. M. (2020) Persistence of microbial extracellular enzymes in soils under different temperatures and water availabilities. *Ecology and evolution*, 10(18): 10167-10176.
- Gómez, E. J., Delgado, J. A., Gonzalez, J. M. (2021) Influence of water availability and temperature on estimates of microbial extracellular enzyme activity. *PeerJ*, 9: e10994.
- González, J. M., Iriberry, J., Egea, L., Barcina, I. (1992) Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, 58(3): 998-1004.
- Gregory, J. A., Becker, E. C., Pogliano, K. (2008) *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes & development*, 22(24): 3475-3488.
- Herbert, D., Elsworth, R., Telling, R. C. (1956) The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *Journal of general microbiology*, 14(3): 601-622.

Capítulo 2

Herbert, D. (1961) A theoretical analysis of continuous culture systems. *In Continuous Culture of Micro-organism*, (London: Society of chemical industry), pp: 21-53.

Jensen, S. O., Thompson, L. S., Harry, E. J. (2005) Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *Journal of bacteriology*, 187(18): 6536-6544.

Jørgensen, T. R., Nitsche, B. M., Lamers, G. E., Arentshorst, M., van den Hondel, C. A., Ram, A. F. (2010) Transcriptomic insights into the physiology of *Aspergillus niger* approaching a specific growth rate of zero. *Applied and environmental microbiology*, 76(16): 5344-5355.

Keep, N. H., Ward, J. M., Cohen-Gonsaud, M., Henderson, B. (2006) Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends in microbiology*, 14(6): 271-276.

Kjelleberg, S., Hermansson, M., Mårdén, P., Jones, G. W. (1987) The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annual review of microbiology*, 41: 25-49.

Koch A. L. (1997) Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(3): 305-318.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002) The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 4:595-602.

Marchant, R., Banat, I. (2010) The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1887-1896.

Morita, R. Y. (1997) Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle. *New York, NY: Chapman & Hall*.

Msadek T. (1999) When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, 7(5): 201-207.

Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., Ivanov, M. V., (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51:433– 446.

Novick, A., Szilard, L. (1950) Description of the chemostat. *Science (New York, N.Y.)*, 112(2920): 715-716.

Capítulo 2

- Nyström T. (2004) Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition?. *Molecular microbiology*, 54(4): 855-862.
- Ohnishi, R., Ishikawa, S., Sekiguchi, J. (1999) Peptidoglycan hydrolase LytF plays a role in cell separation with CwIF during vegetative growth of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 181(10): 3178-3184.
- Overkamp, W., Ercan, O., Herber, M., van Maris, A. J., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P. (2015) Physiological and cell morphology adaptation of *Bacillus subtilis* at near-zero specific growth rates: a transcriptome analysis. *Environmental microbiology*, 17(2): 346-363.
- Pavlostathis, S. G., Marchant, R., Banat, I. M., Ternan, N. G., McMullan, G. (2006) High growth rate and substrate exhaustion results in rapid cell death and lysis in the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans*. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1): 84-95.
- Pirt S. J. (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 163(991): 224-231.
- Portillo, M. C., Santana, M., Gonzalez, J. M. (2012) Presence and potencial role of thermophilic bacteria in temperate terrestrial environments. *Die Naturwissenschaften*, 99:43-53.
- Russell, J. B., Cook, G. M. (1995) Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological reviews*, 59(1): 48-62.

Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Santana, M., Portillo, M. C., Gonzalez, J. M., Clara, I. E. (2013) Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176:47-56.

Suzuki H. (2018) Peculiarities and biotechnological potential of environmental adaptation by *Geobacillus* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24): 10425-10437.

Treuner-Lange, A., Søgaard-Andersen, L. (2014) Regulation of cell polarity in bacteria. *The Journal of cell biology*, 206(1): 7-17.

van Bodegom P. (2007) Microbial maintenance: a critical review on its quantification. *Microbial ecology*, 53(4): 513-523.

van Mastrigt, O., Abee, T., Lillevang, S. K., Smid, E. J. (2018) Quantitative physiology and aroma formation of a dairy *Lactococcus lactis* at near-zero growth rates. *Food microbiology*, 73: 216-226.

van Verseveld, H. K., Arbige, M. Chesbro, W. R. (1984) Continuous culture of bacteria with biomass retention. *Trends in Biotechnology*, 2(1): 8-12.

van Verseveld, H. W., de Hollander, J. A., Frankena, J., Braster, M., Leeuwerik, F. J., Stouthamer, A. H. (1986) Modeling of microbial substrate conversion, growth and product formation in a recycling fermentor. *Antonie van Leeuwenhoek*, 52(4) 325-342.

Capítulo 2

Veening, J. W., Igoshin, O. A., Eijlander, R. T., Nijland, R., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P. (2008) Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. *Molecular systems biology*, 4: 184.

Zambrano, M. M., Siegele, D. A., Almirón, M., Tormo, A., Kolter, R. (1993) Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102): 1757-1760.

Zeigler, D. R. (2014) The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology (Reading, England)*, 160:1-11.

**Análisis genómico de la cepa
Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6**

3.1. Resumen.

La genómica es una ciencia que nos permite comprender la relación entre la información genética codificada en el ADN y la fisiología del microorganismo, así como aspectos bioquímicos y evolutivos. Se secuenció y ensambló el genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6, una cepa termófila aislada del suelo en el Parque Nacional de Doñana (Huelva) (CECT9776). La secuenciación identificó 4 moléculas de ADN circular: El genoma principal o Tmp1 (3.870.682 pb), Tmp2 (102283 bp), un megaplásmido, Tmp3 (50843 pb), un plásmido, y un bacteriófago, Tmp4 (55505 pb). El pangenoma de la cepas de *P. thermoglucosidaius* es abierto y ha identificado en Tmp1 y Tmp2 puntos calientes de transferencia horizontal de genes constituido por genes únicos y elementos genéticos móviles (transposasas). El sesgo del uso de codones establece una relación entre los genes únicos y Tmp3, que contiene en su secuencia un elemento integrativo y conjugativo. El bacteriófago identificado pertenece a la familia *Syphoviridae* y no está integrado en el genoma principal. El gran número de regiones CRISPR presentes en Tmp1 y la homología de 11 espaciadores con Tmp4 podría explicar porque el fago no se integra en el genoma principal. La información genómica de *Parageobacillus thermoglucosidaius* 23.6 sugiere que podría tener la plasticidad de incorporar ADN a su genoma a través de diferentes estrategias de transferencia horizontal de genes (transformación, conjugación y traducción), lo que facilitaría su capacidad de adaptación a nuevos medios y a cambios producidos en el ambiente.

3.2 Introducción

3.2.1 Genómica

En 1986 Thomas H. Roderick propuso una nueva disciplina basada en el mapeo, secuenciación y análisis del ADN (Yadav, 2007) a la que denominó genómica. Es una ciencia que se centra en estudiar la secuencia de ADN de un organismo.

Inicialmente los métodos tradicionales de secuenciación eran lentos y costosos, ralentizando el desarrollo de esta disciplina. Por ejemplo, el proyecto del genoma humano supuso aproximadamente una inversión de 2.500 millones de euros y fue llevado a cabo durante 13 años. Sin embargo, gracias al avance de las nuevas técnicas de secuenciación masiva o NGS (Next Generation Sequencing) y el desarrollo de técnicas informáticas para su análisis (Hall, 2007), en la actualidad secuenciar el genoma de un ser humano cuesta menos de 1.000 Euros y se puede hacer en un día.

26 años después de la primera publicación del genoma completo de la bacteria *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995) hay aproximadamente medio millón de genomas publicados en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/>) siendo la mayoría de procariotas. Este desarrollo tecnológico ha llevado a un avance significativo en las investigaciones actuales, refiriéndose al siglo XXI como “el siglo de los genomas”

La determinación de la secuencia completa de un microorganismo resulta muy útil para comprender la relación entre la información que alberga el ADN y la fisiología del microorganismo, así como conocer aspectos bioquímicos y evolutivos y acceder a genes con interés biotecnológico.

Capítulo 3

El principal reto al que se enfrenta la comunidad cuando comienza a analizar un genoma es interpretar esa gran cantidad de información de la que disponemos (Pedros-Alió, 2006). Gracias al gran número de genomas secuenciados y disponibles en las bases de datos se pueden hacer estudios comparativos, como, por ejemplo, filogenias de genes o grupos de genes determinados o análisis del Pangenoma.

El término Pangenoma fue acuñado en 2005 por Tettelin et al. (2005) y describe la unión de entidades de secuencia (generalmente genes o marcos de lectura abiertos, ORF) compartidos por genomas de interés. La resolución filogenética del grupo taxonómico de interés es ilimitada y depende del objetivo del estudio, existen proyectos enfocados a nivel de especie, nivel de género e incluso a nivel de clase, filo o reino (Vernikos et al., 2015).

En la literatura científica existe variabilidad a la hora de nombrar las combinaciones del conjunto de secuencias. Nosotros vamos a seguir la nomenclatura descrita por Tettelin et al. (2005) (Figura 3.1):

- **Pangenoma:** engloba todo el repertorio de genes accesibles al taxón estudiado

- **Genoma central:** contiene genes compartidos por todas las cepas dentro del taxón. Incluye genes responsables de los aspectos básicos de la biología de las células estudiadas y sus principales rasgos fenotípicos.

- **Genoma prescindible:** contiene genes compartidos por un subconjunto de cepas. Contribuye a la diversidad de especies, podría codificar vías y funciones bioquímicas complementarias que no son esenciales para el crecimiento pero que confieren ventajas selectivas, como la adaptación a diferentes nichos, resistencia a antibióticos, etc.

- **Genes específicos o únicos:** aquellos genes detectados en un solo organismo del grupo analizado. Permiten identificar fenómenos de intercambio de

material genético entre distintos microorganismos y aspectos interesantes de su historia evolutiva.

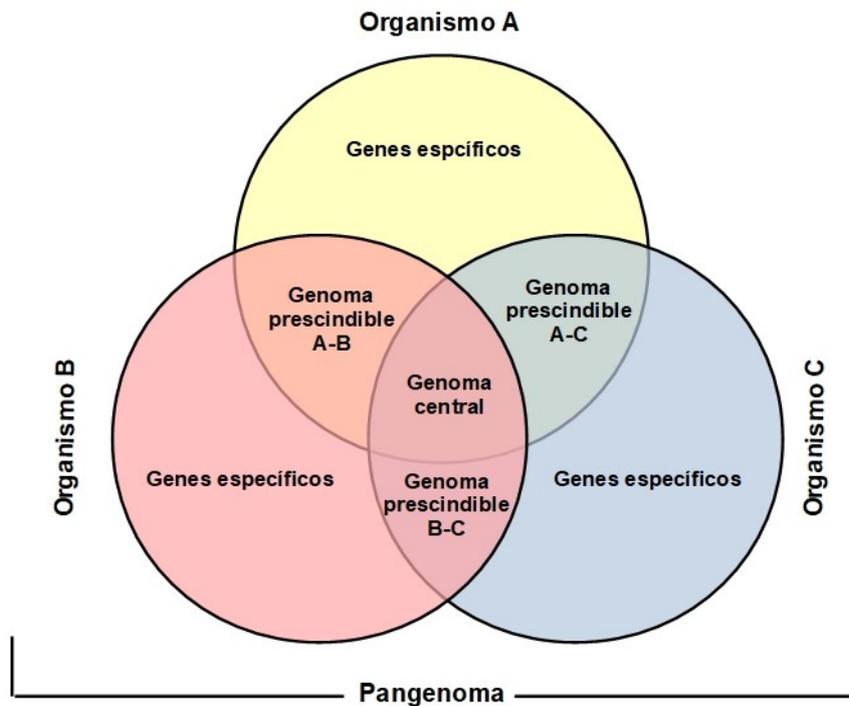


Figura 3.1. Esquema y nomenclatura de la combinación de genes entre tres organismos.

Los análisis de pangenoma proporcionan un marco para determinar la diversidad genómica en un grupo taxonómico a analizar. Podemos diferenciar entre pangenoma cerrado (representa prácticamente la variabilidad de genes existentes) y pangenoma abierto (el conjunto de datos es limitado y no alcanza a representar la variabilidad real existente en el taxón) (Figura 3.2). Las limitaciones en el número de representantes en los pangenomas abiertos suelen deberse a

Capítulo 3

que aún nos queda una gran diversidad microbiana por descubrir en nuestro planeta (González et al. 2020).

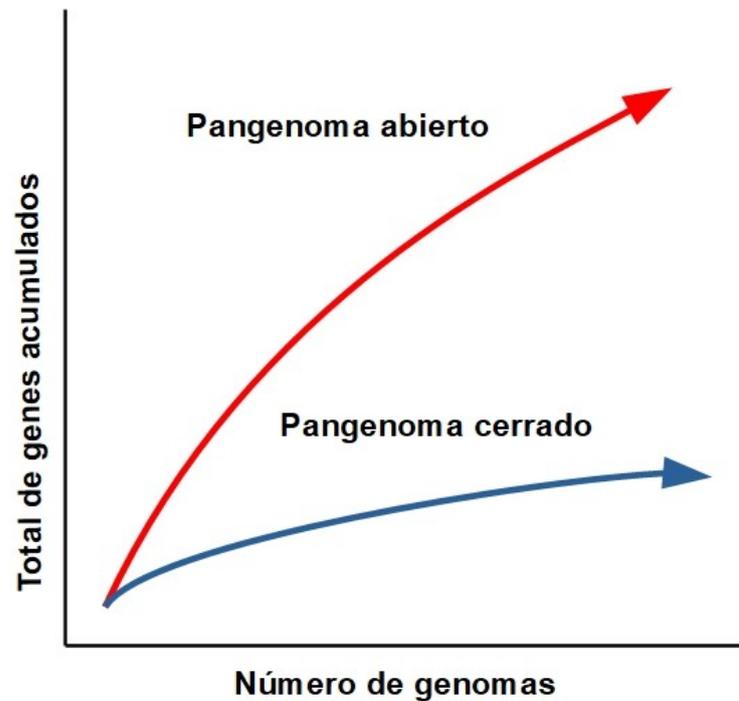


Figura 3.2. Representación teórica de un pangenoma abierto y cerrado.

2.2.2 Tránsito Horizontal de Genes

En 1928 Griffith observó que el carácter virulento de *Streptococcus pneumoniae* se podía transmitir entre cepas de la misma especie. Estos hallazgos sirvieron para establecer la necesidad de estudiar los mecanismos y consecuencias de la transferencia de ADN. Décadas más tarde se observó que las transferencias de genes se producían incluso entre organismos de especies diferentes (Syvanen, 1985) y, en la actualidad, esta aceptada la elevada promiscuidad existente en el intercambio de ADN entre microorganismos (Frost et al., 2005).

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

Bajo este contexto, a principios de los años 90 nace el concepto de transferencia horizontal de genes (HGT, Horizontal Gene Transfer), refiriéndose a la transferencia de fragmentos de ADN entre distintas especies. Estas observaciones hicieron cambiar la idea tradicional de herencia vertical, proponiéndose una nueva visión de los árboles filogenéticos que incluyen ramas entrecruzadas adquiriendo apariencia de red (Figura 1.2) (Doolittle, 2000).

Los mecanismos mas importantes por los que se produce la transferencia horizontal de genes entre microorganismos son (Furuya y Lowy, 2006) (Figura 3.3):

- **Transformación:** Ciertos microorganismos tienen la capacidad de captar, integrar y expresar fragmentos de ADN extracelular liberados, por ejemplo, durante la lisis bacteriana.

- **Conjugación:** Transferencia de ADN que requiere el contacto entre dos células a través de pilis o adhesinas de la superficie celular. La maquinaria conjugativa suele estar codificada por genes que están presentes en plásmidos.

- **Traducción:** Secuencias de ADN que se transfieren de unos microorganismos a otros mediante la infección por bacteriófagos que transportan esa información génica. Estos fagos pueden o no integrarse en la célula receptora dando lugar a procesos de lisis o lisogénesis en la interacción célula huésped y virus.

- **Agentes de transferencia de genes (Gene transfer agents, GTAs):** son partículas producidas por la célula huésped que se asemejan a los bacteriófagos, capaces de transferir contenido genético (Lang et al., 2017). A diferencia de los fagos, no tienen la capacidad de autopropagarse y se liberan a través de la lisis celular.

Capítulo 3

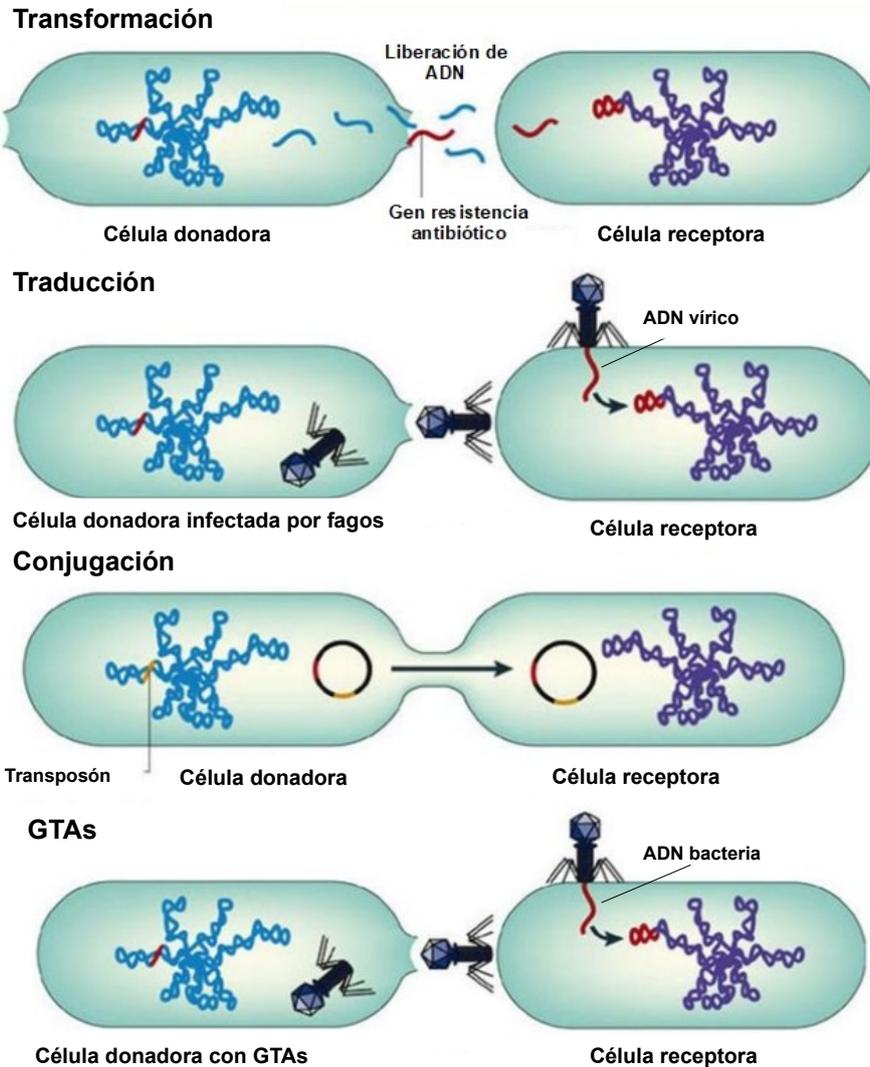


Figura 3.3. Representación de cuatro mecanismos diferentes por los que se producen transferencia horizontal de genes. (Modificación de la figura descrita en Furuya y Lowy, 2006).

En la transferencia de fragmentos de ADN entre células desempeña un papel importante la existencia de elementos genéticos móviles (MGE; “Mobile genetic elements”) que directamente podrían influir en fenómenos de HGT. Los MGE son

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

elementos del genoma que tienen la capacidad de moverse o transferirse de una parte a otra del genoma o a plásmidos de una célula o de células diferentes (Siguier et al., 2014). El estudio de los MGE presentes en un genoma nos proporciona información que puede servir para deducir la historia evolutiva de un genoma.

Como ejemplos de MGEs podemos citar a los plásmidos, los bacteriófagos, o las secuencias de inserción (Insertion Sequence; IS). Las ISs son los MGE autónomos más sencillos. Estas secuencias constan de un gen que codifica una transposasa y generalmente, unas secuencias repetitivas cortas (IR, Inverted Repeat) flanqueando dicho gen en ambos extremos. La autonomía de las ISs se debe a la transposasa, que tras reconocer las secuencias repetitivas situadas a los extremos de la IS, es la responsable de su escisión e inserción de material genético en distintos lugares del genoma.

La HGT representa un mecanismo que acelera el curso de la evolución, especialmente en procariotas (Hilario y Gogarten, 1993; Frost et al., 2005). Los procesos de transferencia horizontal tienen gran relevancia en la estructura del genoma de los microorganismos y en su fisiología. Como resultado de estos procesos los microorganismos pueden ganar o perder genes o capacidades funcionales. Un ejemplo típico es la incorporación de genes de resistencia a antibióticos o de virulencia, o delección/disrupción de genes al eliminarse o insertarse fragmentos de ADN (Darmon y Leach, 2014). Estos cambios pueden ser importantes para la adaptación de los seres vivos a determinadas condiciones de su medio ambiente. Existen evidencias de una alta proporción de intercambio de genes entre microorganismos termófilos (van Wolferen et al., 2013; Urbieto et al., 2015; Cuecas et al., 2017).

Capítulo 3

Gracias al avance en las técnicas de secuenciación del ADN y a la facilidad actual para secuenciar genomas, el estudio de los eventos de HGT ha experimentado un gran avance (Koonin y Galperin, 1997). Entre los métodos para detectar fenómenos de HGT se encuentran: las comparaciones basadas en la determinación del contenido G+C, la frecuencia de uso de codones, la frecuencia de tetranucleótidos u otros oligonucleótidos y el empleo de índices de similitud. Estudios comparativos de genes o regiones del genoma que difieran en los valores de estos parámetros dentro de taxones determinados serían indicadores de posibles fenómenos de HGT (Lawrence y Ochman, 2002; Dufraigne et al., 2005).

Todos estos métodos presentan limitaciones ya que se desconoce estrictamente hablando la historia del genoma de cualquier microorganismo (González et al., 2005). Las estimaciones realizadas dependen de los genomas y genes disponibles, que son los que se utilizan como referencia en estos análisis pero hemos de recordar que aun estamos lejos de tener una representación completa de la inmensa diversidad genética y taxonómica existente en el mundo microbiano. Otro factor que limita la detección de fenómenos de HGT se conoce con el nombre de “amelioration”. Este fenómeno representa el proceso por el cual un fragmento de ADN transferido adquiere progresivamente características (frecuencia del uso de codones, contenido en G+C, tasa de mutación) propias del genoma del microorganismo donde se ha insertado (Lawrence y Ochman, 1997). Por tanto, un evento ancestral de HGT podría llegar a ser indetectable y los fenómenos HGT son relativamente más fácilmente identificables. En los últimos años, se han realizado varios estudios para evaluar los distintos métodos de detección de HGT concluyendo que la combinación de distintos métodos mejora significativamente la fiabilidad en los análisis de HGT (Becq et al., 2010; Ravenhall et al., 2015).

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

Condiciones extremas, como altas temperaturas, representan ambientes que favorecen el desarrollo de mecanismos de adaptación. Los eventos de HGT representan mecanismos importantes que facilitan la adaptación de los microorganismos a estos ambientes (Aravind et al., 1998; Zhaxybayeva et al., 2009; van Wolferen et al., 2013; Cuecas et al., 2017).

3.2.3. Genómica en *Geobacillus* y *Parageobacillus*

La amplia gama de aplicaciones biotecnológicas que presentan los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus* (producción de bioetanol, biorrefinamiento, biorremediación de ambientes contaminados, producción de proteínas recombinantes y biocatalizadores termoestables, etc.) junto con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y análisis bioinformático ha dado como resultado la publicación de un gran número de genomas de estos géneros (Tabla 3.1) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=geobacillus>).

A fecha de Julio de 2021 hay un total de 139 genomas ensamblados de estos géneros en la base de datos del NCBI, de los cuales 40 están completos. Se han secuenciado 34 plásmidos, siendo el género *Parageobacillus*, el que en proporción de especies, presenta mayor número (11). El tamaño de los genomas oscila entre 3.32 – 3.95 Mpb y el porcentaje medio en G+C varía entre 43.3% para el género *Parageobacillus* y 52% en *Geobacillus*.

Capítulo 3

Tabla 3.1. Características de los genomas ensamblados de las especies de *Geobacillus* y *Parageobacillus*

Especie	N.º Genomas ensamblados	N.º Genomas completos	N.º Plásmidos	Tamaño medio (Mb)	% G+C medio
<i>Geobacillus</i> ssp.	48	10	7	3.47	52
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	6	2	1	3.56	51,94
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	22	4	1	3.51	52,35
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	8	4	4	3.52	48,94
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	10	5	2	3.52	52,3
<i>Geobacillus subterraneus</i>	6	3	4	3.58	52
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	3	1	0	3.56	51,9
<i>Geobacillus jurassicus</i>	1	0	0	3.45	52,2
<i>Geobacillus zalihae</i>	5	2	0	3.55	52,2
<i>Geobacillus vulcani</i>	1	1	0	3.38	52,4
<i>Geobacillus lituanicus</i>	1	1	1	3.49	52,17
<i>Geobacillus uzenensis</i>	1	0	0	3.35	52,2
<i>Geobacillus proteiniphilus</i>	1	0	0	3.57	51,8
<i>Geobacillus genomosp. 3</i>	1	1	1	3.48	52,82
<i>Geobacillus icigianus</i>	1	0	0	3.45	52
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	14	4	11	3.95	43,43
<i>Parageobacillus toebii</i>	6	2	3	3.32	42,2
<i>Parageobacillus caldxylosilyticus</i>	4	0	0	3.81	44

Una característica identificable de estos géneros es la presencia de un gran número de transposones, que contrastan con números bajos en su parientes mesófilos mas cercanos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (Takami et al. 2004b; Feng et al., 2007). En concreto *Parageobacillus thermoglucosidasius* codifica 41 transposasas donde 39 están asociadas con los elementos IS: IS4, IS3, IS911, IS116, IS110, IS902, IS653 (Hussein, 2015).

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

La presencia de estas secuencias indica que la transferencia horizontal de genes puede haber sido una característica importante para estos organismos y que ha participado activamente en la historia evolutiva de estas especies.

Otra de las características a resaltar del género es el alto número de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) presentes en su genoma. Las regiones CRISPR típicamente consisten en varias repeticiones directas no contiguas, separadas por tramos de secuencias variables llamadas espaciadores (Jansen et al., 2002). Con bastante frecuencia cerca de estas secuencias se localizan las proteínas asociadas a CRISPR (CAS). Se cree que los CRISPR junto con las proteínas CAS proporcionan un mecanismo de resistencia frente a bacteriófagos específicos (Barrangou et al., 2007).

El mayor número de motivos CRISPR se encuentra en el genoma de *Geobacillus zalihae* SURF-114 con 9 regiones repetitivas y *Parageobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93 es el que presenta más proteínas CAS, con un total de 112 (Husseini, 2015).

Los bacteriófagos se encuentran presentes en abundancia en la naturaleza, se pueden detectar en casi todos los nichos biológicos y constituyen una enorme fuente de biodiversidad (Casas y Rohwer, 2007; Angly et al., 2006; Breitbart et al., 2004). Se cree que los fagos juegan un papel muy importante en el equilibrio ecológico de la vida microbiana y en su diversidad actuando como reguladores de las comunidades microbianas (Suttle, 2005).

Actualmente, en la base de datos del NCBI solo se incluyen seis genomas de bacteriófagos termófilos relacionados con el género *Geobacillus* (tabla 3.2).

Capítulo 3

Tabla 3.2. Características de fagos que infectan a cepas del genero *Geobacillus* y *Parageobacillus*

Nombre	Huesped	Tamaño Kb	ORF	% G+C	N.º Referencia	Bibliografía
GBK2	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	38,7	58	52	NC_023612.1	Marks y Hamilton, 2014
DE6	<i>Geobacillus</i> sp. E263	49	80	46,06	NC_019544.1	Wang y Zhang, 2010
GBSV1	<i>Geobacillus</i> sp. 6k51	34,5	53	43,39	NC_008376.1	Liu et al., 2009
TP-84	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 2184	47,1	75	45,54	NC_041918.1	Skowron et al., 2018
GVE2	<i>Geobacillus</i> sp. E263	40,2	54	44,85	NC_009552.1	Wang y Zhang, 2008
GVE3	<i>Paraeobacillus thermoglucosidasius</i>	140,4	225	29,62	NC_029073.1	Van Zyl et al., 2015

Los fagos anotados pertenecen al Orden Caudovirales, contienen ADN de doble cadena que puede ser lineal o circular. Todos tienen aproximadamente las mismas características en cuanto a tamaño, ORF y % G+C exceptuando GVE3 que presenta un mayor tamaño y un contenido en G+C bastante inferior.

En comparación con los mesófilos, los fagos termófilos han sido muy poco estudiados (Rice et al., 2001) y prometen ser una nueva fuente de material genético y enzimas con aplicaciones potenciales en biotecnología e industria (Zhang et al., 2017). El hecho de que solo 6 genomas estén publicados en el NCBI, con respecto a los 139 genomas ensamblados de *Geobacillus* y *Parageobacillus*, es una evidencia de que no se han estudiado en profundidad, porque el alto número de secuencias CRISPR en los genomas de estos géneros parece indicar que tienen una relación bastante estrecha. La abundancia de secuencias CRISPR y genes *cas* en estos genomas podría explicar la ausencia de fagos insertados (ciclo lisogénico) lo que dificulta su detección (Hussein, 2015).

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Muestreo

Las muestras para el aislamiento de microorganismos termófilos se recolectaron de la superficie (0-5 cm) de suelos situados en el Parque Nacional de Doñana, concretamente en la zona circundante de la Laguna de Santa Olalla (Almonte, Huelva; 36°58'N, 6°28'O). El suelo tiene las características típicas de un sistema dunar, es de tipo arenoso con escasa vegetación de matorral y pastizal. La superficie del suelo es la zona de mayor fluctuación térmica y el sur-oeste de España representa una de las zonas más cálidas de la Península Ibérica (Santana y González, 2015) .

3.3.2 Identificación, secuenciación y anotación de la cepa

Un gramo de muestras de suelo resuspendido en 10 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) fue agitado en un vórtex durante 5 minutos previo a la inoculación en medio de cultivo para aislar cepas de bacterias termófilas en suelos. 100 µl de la mezcla se sembraron por extensión en placas con agar nutritivo (NB, composición por litro: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 15 g de agar) y se incubaron durante 3 días a 60° C. Las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas de termófilos heterótrofos aeróbicos, se sembraron hasta extinción en nuevas placas de NB incubándose a 60° C durante 24 horas. Este proceso se repitió tres veces con la finalidad de obtener colonias puras.

El ADN genómico de los aislados puros se obtuvo con el kit de extracción ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep (Zymo research, Irvine, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de emplear el kit se incubaron previamente

Capítulo 3

las células obtenidas por centrifugación con una solución de lisozima (1 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este paso previo facilita la lisis celular y aumenta la cantidad de ADN extraído.

Para obtener la identificación taxonómica de los aislados, se realizó la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes de ARNr 16S utilizando los cebadores 616F (5'-TTTTATAAAAGGTTGATTGT) y 907R (5'-CCCCGTCAATTCATTTGAGTTT). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 µl, que contenían 5 µl de tampón de PCR 1X, 1 µl de dNTP (500 µM), 1 µl de cada cebador (2,5 µM), 1,5 µl de MgCl₂ (0,16 µM), 1 µl de ADN genómico (40 ng), 39,2 µl de agua desionizada y 0,3 µl de Biotaq DNA Polymerase (5 u/µl). El ciclo de PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad T-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las reacciones de ciclo de PCR incluyeron un paso de desnaturalización inicial a 95° C durante 1 min, seguido de 40 ciclos a 95° C durante 15 s, hibridación a 55° C durante 15 s, extensión a 72° C durante 1 minuto. El último ciclo fue seguido de 10 minutos a 72° C. Los fragmentos obtenidos durante la amplificación por PCR anterior, se purificaron con el kit Clean Easy PCR purification (Canvax, Córdoba, España) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron (método Sanger) en ambas cadenas utilizando los cebadores directos 616F y el cebador inverso 907R, en los servicios de secuenciación de Stab Vida (Caparica, Portugal). Las secuencias se identificaron utilizando la herramienta Blastn del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

La cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 se cultivó aeróbicamente en medio líquido NB (composición por litro: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona) a 60° C (temperatura óptima de crecimiento) hasta alcanzar la fase exponencial. El ADN total se obtuvo con el kit de extracción ZymoBIOMICS DNA/

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

RNA Minipred siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación del genoma de la cepa 23.6 se realizó utilizando la plataforma Illumina Hiseq en BGI Genomics (Hong Kong, China). La secuenciación fue en los dos sentidos, con secuencias por pares y se generaron un total de 9.240.570 lecturas con un tamaño de 350 pares de bases (pb) cada una. El filtrado de calidad y un primer ensamblaje del genoma lo realizó la empresa BGI Genomics, utilizando el genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93 como referencia, generando 48 scaffolds de un tamaño máximo de 711.050 pb y mínimo de 512 pb. La circularización del genoma a partir de estos últimos 48 fragmentos se llevó a cabo manualmente utilizando scripts desarrollados en nuestro laboratorio y el editor de secuencias Bioedit (Hall, 1999). Estos scripts buscan y alinean, mediante Clustal W, todas las lecturas que tengan un oligonucleótido diana concreto correspondiente al fragmento más extremo de un scaffold ensamblado. De esta forma se seleccionaban aquellos oligonucleótidos localizados en los extremos de los scaffolds lo que permitía obtener la secuencia contigua correspondiente progresando en la ampliación de dicho scaffold. Los extremos de los scaffolds se van ampliando hasta encontrar solapamiento con el extremo de otro scaffold, lo que permite unir los dos fragmentos. Como referencia para el ensamblado y progresión en el acabado del genoma se han utilizado las secuencias genómicas completas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* disponibles en el NCBI.

La anotación se realizó siguiendo las indicaciones del canal de anotación de genomas de procariontes del NCBI (<https://github.com/ncbi/pgap/>)

Las herramientas bioinformáticas utilizadas en este trabajo son: ISfinder (Siguier et al., 2006) para la búsqueda de secuencias de inserción; ICEfinder (Liu et al., 2019); CRISPR-Casfinder (Couvin et al., 2018) y Phaster (Arndt et al., 2016) para

Capítulo 3

la búsqueda de bacteriófagos integrados en los genomas de *Geobacillus* y *Parageobacillus*.

3.3.3 Pan-genoma

Los 13 genomas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* utilizados para los análisis pangenómicos se descargaron de la base de datos del NCBI (Tabla 3.3)

Tabla 3.3. Genomas anotados en el NCBI de Cepas de *Parageobacillus thermoglucosidasius*.

Cepa	Nº Acceso	Nº Bases	% G+C	Plásmidos
NCIMB 11955	NZ_CP016622.1	4,00492	43,8	pNCI001; pNCI002
DSM 2542	NZ_CP012712.1	3,87312	43,9	-
C56-YS93	NC_015660.1	3,99379	43,9	pGEOTH01; pGEOTH02
TM242	NZ_CP016916.1	4,00434	43,8	pNCI001; pNCI002
TNO-09.020	NZ_CM001483.1	3,74024	43,9	-
NBRC 107763	BAWP00000000.1	3,87116	43,7	-
DSM 2543	QQOJ00000000.1	3,96168	43,8	pGeo2DSM2543; pGeo7DSM2543
DSM 6285	QQOK00000000.1	3,96773	43,6	pGeo7DSM6285
TG4	NZ_AP019364.1	3,94852	43,9	pPTG4S
DSM 21625	QQOL00000000.1	4,00604	43,8	pGeo8DSM21625
GT23	LUCT00000000.1	3,69646	43,8	-
ZCTH02-B4	LZRS00000000.1	4,38293	43,4	-
W-2	LXMA00000000.1	3,89456	43,2	-

Para analizar el pangenoma de un taxón bacteriano hay que llevar a cabo agrupaciones de genes ortólogos para lo que en nuestro caso se utilizó el programa GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013). Las búsquedas de similitud y agrupamiento de las secuencias codificantes (CDS) de los 14 genomas se realizaron usando BLASTp por pares (Altschul et al. al., 1990) y algoritmos OrthoMCL (Li et al., 2003). Los parámetros establecidos para la identificación y agrupación de genes fueron: valor de $E < 10^{-05}$ y una cobertura de alineación mínima superior al 70%. El valor E es el número de aciertos que uno puede "esperar" por azar cuando se busca en una base de datos de un tamaño

particular. Cuanto menor sea el valor de E, o más cerca esté de 0, más significativa es la coincidencia (Altschul et al., 1990). Los grupos determinados a partir de los análisis se definieron como: **Genoma central**: genes presentes en todos los genomas; **Genoma prescindible**: genes presentes en más de 1 genoma y menos de 12 y **Genes únicos**: genes presentes en menos de 2 genomas.

3.3.4 Clasificación funcional de genes ortólogos (COGs)

Los ortólogos son genes que se encuentran en diferentes especies y provienen de un gen ancestral común, generalmente presentan la misma función o familias funcionales. Cada COG se define como el grupo de tres o más proteínas que son ortólogas y se generan mediante la comparación, todos contra todos, de secuencias de proteínas codificadas en genomas completos secuenciados (Tatusov et al., 2000). En la actualidad se han clasificado 25 grupos COG (Tabla 3.4)

Para asignar categorías COG a los genes de los 14 genomas se utilizó el script Bac-genomics (Leimbach, 2016). El script utiliza RPS-BLAST+ (BLAST específico de posición inversa) con un valor de E $<10^{-02}$ contra la base de datos de dominios conservados (CDD) del NCBI.

Capítulo 3

Tabla 3.4. Clasificación de los grupos COGs.

Símbolo	Definición
A	Procesamiento y modificación de ARN
B	Estructura y dinámica de la cromatina
C	Producción y conversión de energía
D	Control del ciclo celular, división celular y partición cromosómica
E	Transporte y metabolismo de aminoácidos
F	Transporte y metabolismo de nucleótidos
G	Transporte y metabolismo de carbohidratos
H	Transporte y metabolismo de coenzimas
I	Transporte y metabolismo de lípidos
J	Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
K	Transcripción
L	Replicación, recombinación y reparación
M	Biogénesis de la membrana y pared celular
N	Movilidad celular
O	Modificación postraducciona
P	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos
Q	Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios
R	Predicción de función general
S	Función desconocida
T	Mecanismos generales de transducción de señales
U	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
V	Mecanismos de defensa
W	Estructuras extracelulares
Y	Estructura nuclear
Z	Citoesqueleto

3.3.5. Análisis GhostKOALA del pangenoma.

El pangenoma de la cepa *P. thermoglucosidasius* 23.6 se anotó por separado (core, shell y cloud) utilizando GhostKOALA (KEGG Orthology And Links Annotation), una herramienta interna de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que asigna números KO (KEGG Orthology) a cada una de los CDS mediante búsqueda GhostX contra la bases de datos "genus_prokaryotes + family_eukaryotes + viruses" con los algoritmos de reconstrucción Brite, Pathway y Module (Kanehisa et al., 2016). La búsqueda y reconstrucción de la rutas metabólicas se realizó utilizando el conjuntos de números KO contra el módulo de

referencia de KEGG. Se contaron para el core, shell y cloud el número de genes identificados para cada ruta KEGG.

3.3.6 Uso de codones

Un codón está formado por tres nucleótidos que codifica para un aminoácido específico. Existe un total de 64 codones distintos (61 codifican para aminoácidos y 3 son codones de parada), pero solo hay 20 aminoácidos por lo que un aminoácido puede ser codificado por varios codones. Existe una redundancia de codones y por eso se dice que el código genético es degenerado. Los codones que se traducen al mismo aminoácido se denominan sinónimos.

En los códigos genéticos de diferentes especies de microorganismos existe una preferencia por ciertos codones sobre otros, generando una diferencia de frecuencia en los codones sinónimos. A este fenómeno se le conoce como sesgo en el uso de codones.

Conocer la frecuencia de aparición de codones dentro de un genoma es esencial en técnicas biológicas comunes y en varios campos de estudio. Además, los patrones de uso de codones sinónimos pueden ser una herramienta que nos permita deducir posibles relaciones evolutivas entre especies, así como coevolución huésped-patógeno o bacteria-fago específicos (Athey et al., 2017).

Para calcular el sesgo del uso de codones de cada gen se ha utilizado el Script de R, coRdon (Elek et al., 2020). El estadístico utilizado en el script es la medida independiente de longitud y composición (MILC, Measure Independent of Length and Composition) (Supek y Vlahovicek, 2005) y normaliza los resultados de acuerdo a la longitud de cada secuencia. Aunque el estadístico MILC es independiente de la longitud hemos eliminado aquellas secuencias menores a 240

Capítulo 3

nucleótidos ya que las secuencias cortas no tienen buena representación de algunos aminoácidos.

3.4. Resultados

3.4.1. Características generales del genoma

La cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 aislada de suelos de Doñana está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT9776.

Los datos de secuenciación muestran que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 alberga en su interior 4 moléculas de ADN de doble cadena circular, a las que se les ha denominado Tmp1, Tmp2, Tmp3 y Tmp4 (Figura 3.4)

Durante el ensamblaje del genoma se calculó el número de lecturas de secuenciación para diferentes genes de Tmp1, Tmp2, Tmp3 y Tmp4, con la intención de saber si las cuatro moléculas de ADN estaban presentes en la misma proporción. Se utilizaron como controles los genes de ARN ribosomal 23s y 16s, ya que se conocía el número exacto de copias existentes en el genoma (10 copias de cada uno), y genes que solo estuviesen representados una vez en cada una de las cuatro moléculas de ADN (figura 3.5).

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

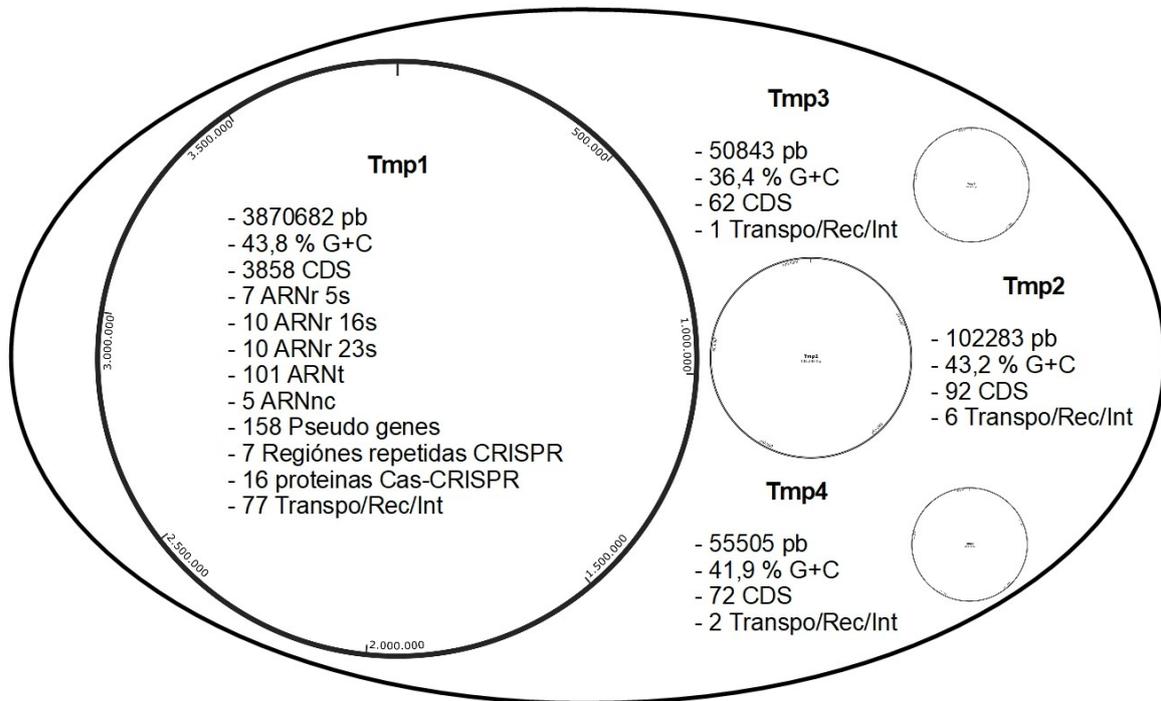


Figura 3.4. Esquema y características de las moléculas de ADN presentes en la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6*.

En la figura 3.5 se muestra que Tmp2 presenta un valor medio ligeramente superior de lecturas que Tmp1 y Tmp3, pero las diferencias no son significativas y sus intervalos de confianza se solapan. Los valores de Tmp1 y Tmp3 son muy parecidos entre si y a los genes control (16s y 23s). Por el contrario Tmp4 tiene el valor mas bajo de lecturas y su intervalo de confianza no solapa con las del resto de moléculas de ADN y los genes control. Este resultado nos indica que Tmp4 está en menor proporción que el resto de moléculas.

Capítulo 3

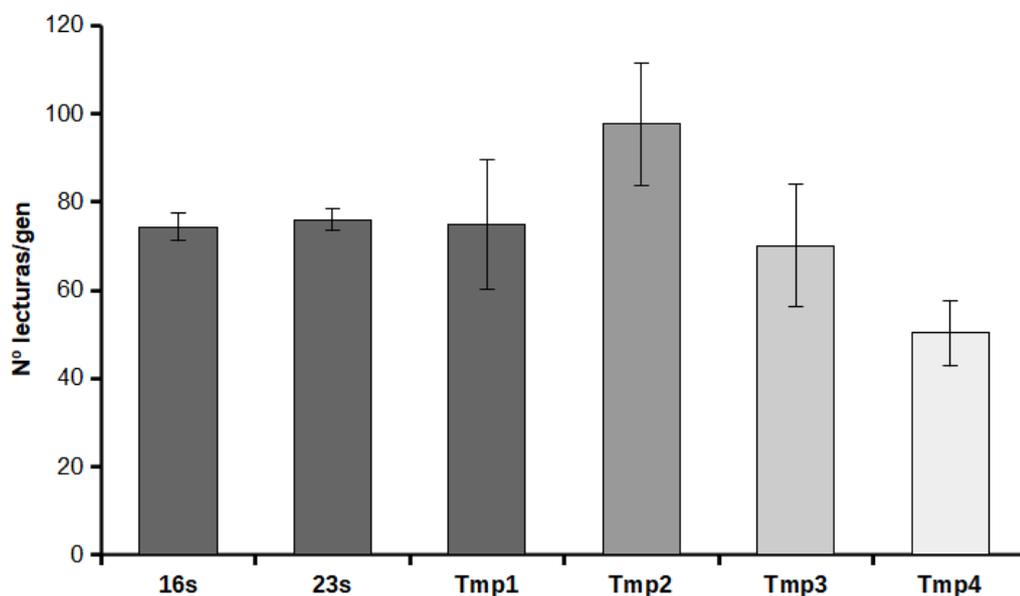


Figura 3.5. Número de lecturas de secuenciación por gen de las cuatro moléculas de ADN presentes en *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 y de los genes de ARN ribosómicos 16s y 23s.

3.4.1.1. Tmp1

Tmp1 representa el elemento genómico principal y es la molécula de ADN de mayor tamaño, 3.870.682 pares de bases (pb) (número de acceso en GenBank: CP063414). Contiene 3914 genes de los cuales 3782 son secuencias que codifican proteínas (CDS), entre estas hay 149 clasificadas como pseudogenes por distintas razones como estar incompletas, tener un codón stop interno, etc. El resto, esta constituido por 132 genes que no codifican proteínas: 10 ARN ribosómicos (ARNr) 23s, 10 ARNr 16s, 7 ARNr 5s, 100 ARN transferente (ARNt) y 5 ARN no codificante (ARNnc). El contenido de guanina mas citosina (G+C) es de un 43,8 % un valor muy similar al resto de cepas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* (Tabla 3.3).

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

Para comparar la distribución funcional de los genes, se analizaron categorías de COG (Figura 3.6). El 80% de los genes fueron anotados en COGs y los grupos funcionales más abundantes fueron predicción de función general (R) y función desconocida (S), grupos que representan un 23.5% del total de genes de *Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6*. Aparte de esos dos grupos no deterministas, el grupo COG más numeroso fue el transporte y metabolismo de aminoácidos (E), seguido de Transcripción (K), producción y conversión de energía (C), transporte y metabolismo de carbohidratos (G) y metabolismo y transporte de iones inorgánicos (P); el número de genes es 305, 237, 222, 214 y 203, respectivamente. La principal diferencia de la cepa de estudio 23.6 con el resto de cepas *Parageobacillus thermoglucosidasius*, es que presenta un mayor número de genes en el COG P, de media 27 genes P más. En 2016, González y colaboradores (González et al., 2016) patentaron la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico a temperaturas altas de la cepa 23.6, una evidencia que podría explicar el mayor número de genes en el grupo P.

El programa CRISPRfinder encontró 7 regiones repetitivas en el genoma de la cepa 23.6 y 15 proteínas CAS asociadas a CRISPR repartidas en dos operones, uno con 7 proteínas y otro con 8, CRISPR 1 y 4 están próximos a los operones CAS. (Tabla 3.5). El tamaño de las regiones CRISPR (incluyendo el total de sus espaciadores y secuencias repetitivas) es bastante variable, pudiéndose encontrar regiones CRISPR pequeñas, 364 pb (CRISPR 5) y otra bastante mas grandes, 3966 pb, (CRISPR 6).

Capítulo 3

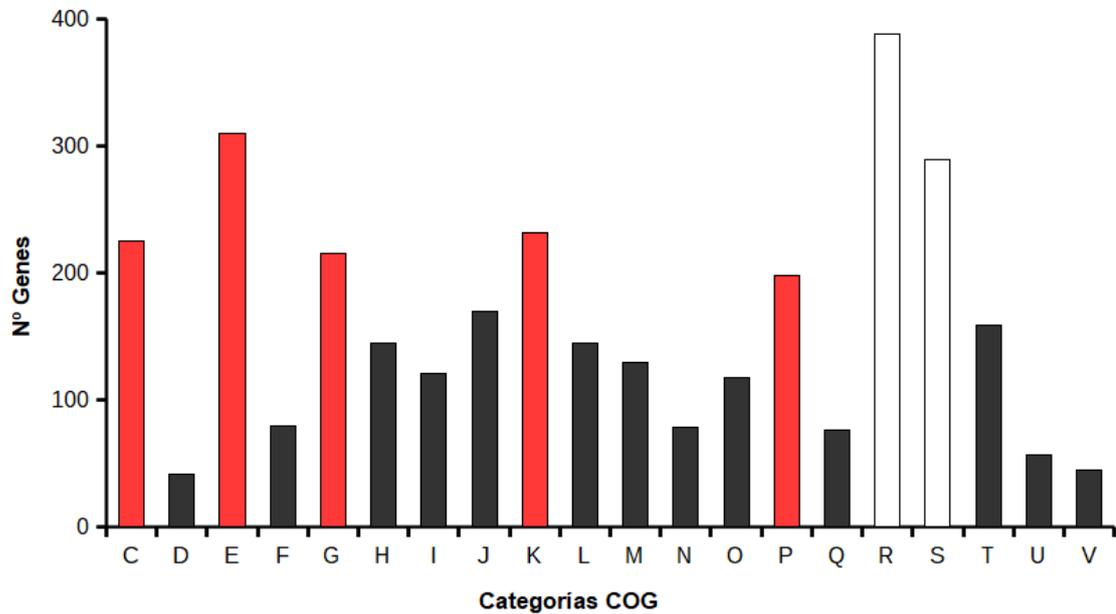


Figura 3.6. Número de genes de Tmp1 distribuidos por categorías COG. En rojo las categorías COG más representativas y en blanco grupos COG no deterministas.

Tabla 3.5. CRISPR de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6. Secuencias repetitivas, número de espaciadores y proteínas CAS.

Elemento	Inicio	Fin	Gen/ Espaciador	Genes Cas/ Región repetitiva
Operón Cas	416998	426146	8	Cas8, Cas7, Cas5, Cas3, Cas4, Cas1, Cas2, Cas6
CRISPR 1	426329	427894	23	GTTTGTATCTTACCTATGAGGAATTGAAAC
CRISPR 2	1950331	1951749	21	GTTTTATCTTACCTATAAGGAATTGAAAC
CRISPR 3	1961174	1963338	32	GTTTTTATCTTACCTATAAGGAATTGAAAC
CRISPR 4	2433340	2434469	17	CTTTATATCCCA CTACGTTTCAGATAAAAC
Operón Cas	2434680	2442759	7	Cas2, Cas1, Cas4I, Cas3, Cas5, Cas7, Cas6
CRISPR 5	3261418	3261782	5	GTTTGTATCTTACCTATGAGGAATTGAAAC
CRISPR 6	3269283	3273249	59	GTTTGTATCTTACCTATAAGGAATTGAAAC
CRISPR 7	3613750	3615850	31	ATTTCAATTCCTCATAGGTAAGATACAAAC

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

Las regiones CRISPR juega un papel importante en la inmunidad contra bacteriófagos, en concreto los espaciadores son los elementos a los que se le atribuye esta función (Barrangou et al., 2007). *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 tiene un total de 188 espaciadores distribuidos en los 7 CRISPR. En la tabla suplementaria 2.1 se recogen las homologías correspondientes a los 41 espaciadores con un valor de E en Blastn superior a 0.01. La segunda columna hace referencia al microorganismo con el que presenta mayor similitud, donde encontramos diferentes fagos y cepas de *Geobacillus*, *Parageobacillus*, *Bacillus*, etc, todos Firmicutes.

Con el programa PHASTER identificamos que las cepas resultantes tienen fagos integrados en sus genomas y el algoritmo Blast las identifica como secuencias de estos fagos. En la última columna se anota el fago mas parecido que tienen integrado estas cepas y principalmente se corresponde con el fago de *Geobacillus* E2 (GVE2) (Wang y Zhang, 2008).

La mayoría de los espaciadores de la cepa 23.6 tienen similitud con GVE2 y GVE3 (Van Zyl et al., 2015) indicando una posible resistencia a estos fagos.

Solo el 20 % de los espaciadores presentan una similitud alta con fagos, en concreto con GVE2 y GVE3, lo que es consecuencia del escaso número de fagos termófilos estudiados y anotados que tenemos hoy en día en las bases de datos.

Otra característica a destacar de Tmp1 es el alto número de elementos genéticos móviles (MGE) presentes en su secuencia. Se considera MGE a todos los genes anotados como transposasas, integrasas y recombinasas. En Tmp1 hay un total de 77 MGEs de los cuales 36 están anotados como pseudogenes. La gran mayoría de estos MGEs se corresponden con transposasas (60) asociadas a secuencias de inserción (IS): IS630, IS1182, Tn3, ISKra4, IS3, ISNCY, IS91, IS66, IS200/605, IS982, IS701, IS256, IS110, IS21, IS4. La gran variabilidad de transposasas y el hecho de que aproximadamente el 50 % estén truncadas o

Capítulo 3

incompletas parece indicar que los eventos de transposición son frecuentes en el genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6.

3.4.1.2. Tmp2

Tmp2 es la segunda secuencia de ADN en tamaño, 102283 pb, pudiéndose considerar un megaplásmido (número de acceso en GenBank: CP063415). Contiene 101 genes de los cuales hay 8 pseudogenes y un ARN transferente. El contenido en G+C es de 43,2%, muy similar a Tmp1.

De los 92 CDS que codifican proteínas en Tmp2, el 77% han sido anotados en sus correspondientes COGs. Los COGs más representados son Transcripción (K; 8 genes), transducción de señales (T; 8 genes), metabolismo de aminoácidos (E; 7 genes), transporte de iones inorgánicos (P; 6 genes), metabolitos secundarios (Q; 6 genes) y conversión de energía (C; 5 genes).

Las proporciones de uso de codones en Tmp2 es muy similar al del genoma principal (Tmp1; figura 3.7). Los valores de codones utilizados en cada gen se concentran en torno al eje 1:1 al representarlos para cada uno de los elementos genómicos (Tmp1 y Tmp2), lo que sugiere que ambos elementos genómicos perduran en la especie desde sus inicios evolutivos.

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

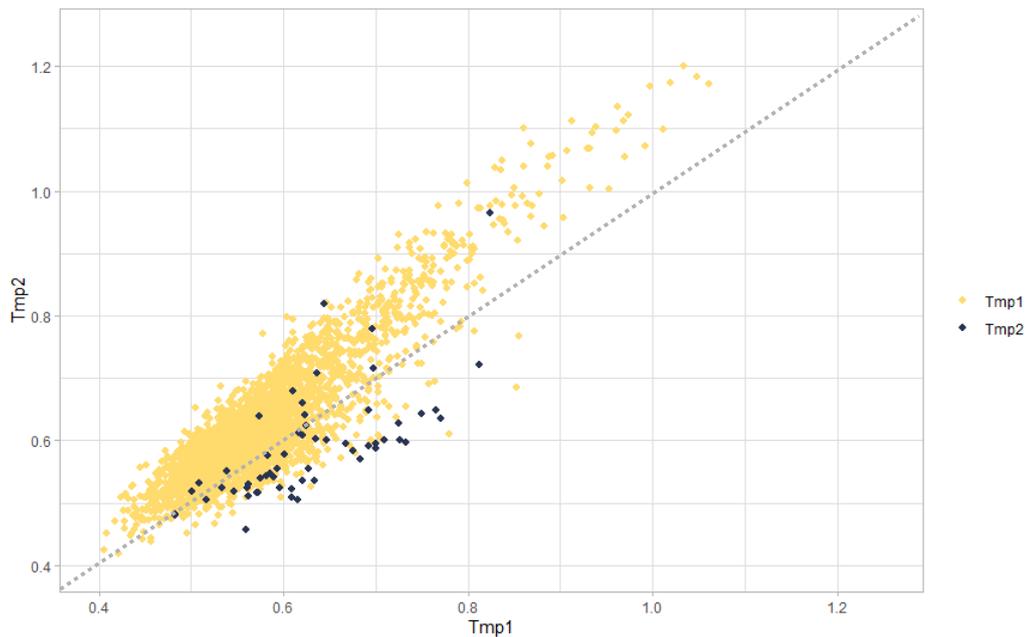


Figura 3.7. Representación del sesgo del uso de codones entre los elementos genómicos Tmp1 y Tmp2.

En el plásmido hay una zona de 32668 pb que se extiende desde la posición 49248 a la 81916 que presenta un contenido en G+C bastante inferior, 34.47 % (figura 3.8). Esta zona está flanqueada por dos recombinasas/integrasas tipo tirosina, contiene 7 de los 8 pseudogenes anotados y 5 de los 6 MGE detectados en Tmp2, además, la mayoría de los genes en este fragmento no han podido ser clasificados en COGs. Todo esto parece indicar que en esta zona del plásmido han ocurrido eventos de transposición.

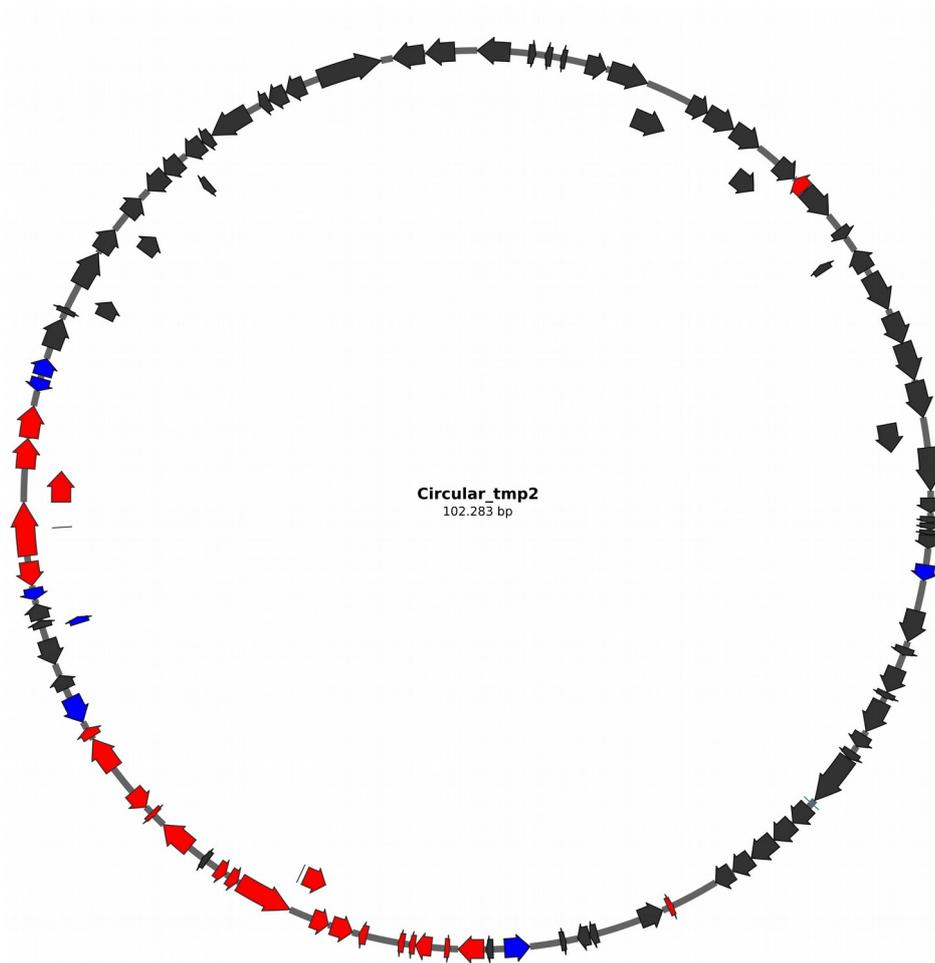


Figura 3.8 Representación de los CDS de Tmp2. En rojo los genes únicos con un contenido en G+C inferior (34,47 %). En azul los elementos móviles genéticos (recombinasas, transposasas e integrasas).

2.4.1.3. Tmp3

Tmp 3 tiene un tamaño de 50843 pb y un contenido en G+C del 36,4%, un valor muy diferente a Tmp1 y Tmp2 (número de acceso en GenBank: CP063416). Dos

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

tercios de los 62 genes que tiene Tmp3 no están dentro de ningún grupo COG y la gran mayoría de estos genes están anotados como proteínas hipotéticas. Los grupos COGs dominantes en Tmp3 son replicación, recombinación y reparación (L) y tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (U) con 5 genes cada uno.

Para esta molécula de ADN, el uso de codones en sus genes es muy diferente al de los genes de Tmp1 (figura 3.9). Los valores se alejan del eje 1:1 indicando que Tmp3 ha sido incorporado en la historia evolutiva reciente de la especie y probablemente tenga un origen lejano al “core” de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6.

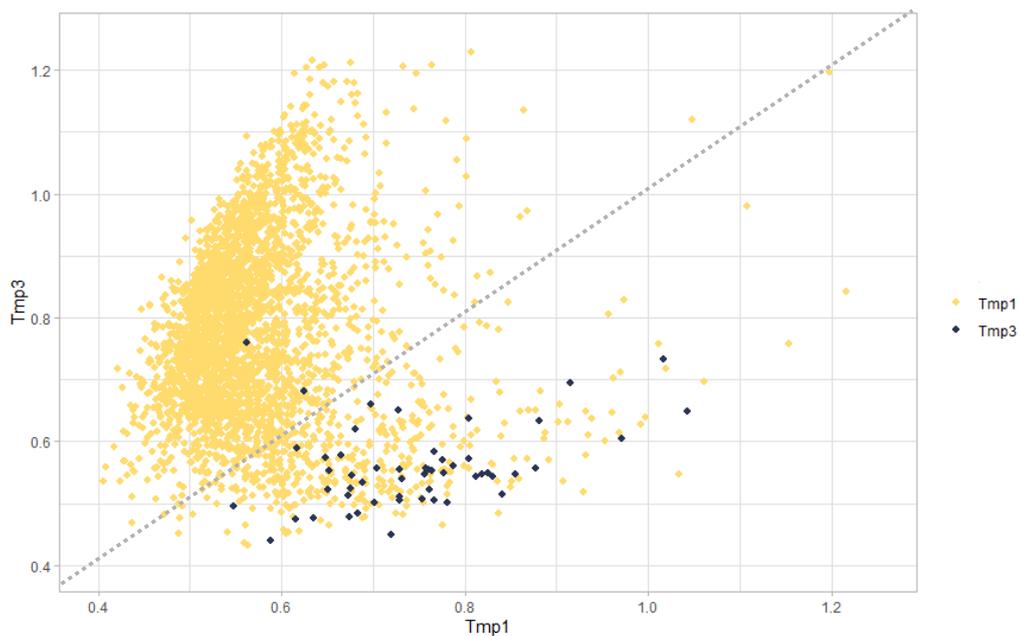


Figura 3.9. Representación del sesgo del uso de codones entre los elementos genómicos Tmp1 y Tmp3.

Capítulo 3

El resultado del ICEfinder ha detectado en Tmp3 un elemento integrativo y conjugativo de 29906 pb de tamaño, localizado entre las posiciones 15520-45425. El elemento integrativo consta de 35 proteínas (Tabla 3.6). La gran mayoría son de función desconocida y están relacionadas con especies del género *Geobacillus* y otras especies del Phylum Firmicutes. ORF 6, ORF 16, ORF 25, ORF 34 y ORF 35 son proteínas que están involucradas en sistemas de secreción tipo II y tipo IV y tienen homología con especies mesófilas como *Bacillus cereus* y *Clostridium argentinense*.

El elemento integrativo descrito junto con la diferencia significativa en el uso de codones con respecto al genoma principal nos indica que Tmp3 es un plásmido constituido por ADN de microorganismos relativamente alejados al género *Parageobacillus* pero del mismo phylum *Firmicutes* y que han podido ser adquiridos mediante conjugación durante la historia evolutiva relativamente reciente de la cepa.

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

Tabla 3.6. ORF del elemento integrativo de Tmp3. Función, posición, tamaño y homología.

ORF	Referencia GenBank	Nombre	Posición pb	Tamaño pb	Especie homóloga
1	p.004040	Tirosina recombinasa	15520-16461	942	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
2	p.004041	Proteína hipotética	16498-16960	462	-
3	p.004042	<i>fic</i>	16961-17804	843	<i>Geobacillus subterraneus</i>
4	p.004043	antitoxin VbhA	17596-17804	208	<i>Lihuaxuella thermophila</i>
5	p.004044	Proteína hipotética	17805-18248	443	-
6	-	<i>traK</i>	18280-18444	165	-
7	p.004045	Proteína hipotética	18461-18838	377	<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i>
8	p.004046	Proteína hipotética	19019-19240	221	<i>Geobacillus subterraneus</i>
9	p.004047	Proteína hipotética	19307-19486	179	-
10	p.004048	ASCH	19820-20056	236	<i>Parageobacillus genomosp. 1</i>
11	p.004049	Proteína hipotética	20224-20454	230	<i>Bacillales</i>
12	p.004050	Proteína hipotética	21150-21932	782	-
13	p.004051	Regulador transcripcional	21952-22431	479	<i>Bacillus thuringiensis</i>
14	p.004052	Proteína hipotética	22500-23006	506	<i>Bacillales</i>
15	p.004053	Lisozima	23026-24609	1583	<i>Bacillales</i>
16	p.004054	Familia proteínas AAA	24734-27079	2346	<i>Bacillales</i>
17	p.004055	Proteína hipotética	27063-27476	413	<i>Clostridium sp.</i>
18	p.004056	Proteína hipotética	27488-28378	890	<i>Bacillales</i>
19	p.004057	Proteína hipotética	28389-28637	248	<i>Bacillales</i>
20	p.004058	Proteína hipotética	29010-29390	380	<i>Bacillales</i>
21	p.004059	Proteína hipotética	29733-30254	521	<i>Bacillus thuringiensis</i>
22	p.004060	Dominio DUF4320	30271-30666	395	<i>Bacillus thuringiensis</i>
23	p.004061	Proteína hipotética	30742-30987	245	<i>Bacillus cereus</i>
24	p.004062	Proteína hipotética	31019-31873	854	<i>Bacillus sp. AFS098217</i>
25	p.004063	T2SSE	31878-34215	2337	<i>Bacillus cereus</i>
26	p.004064	<i>cpaF</i>	32812-34215	1403	<i>Bacillus sp. dmp10</i>
27	p.004065	<i>parA</i>	34231-35058	827	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
28	p.004066	<i>cpaB</i>	35071-36419	1348	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
29	p.004067	Proteína hipotética	35913-36419	506	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
30	p.004068	Proteína conjugativa	36457-38892	2435	<i>Bacillus cereus</i>
31	p.004069	S-Layer homology	38898-40043	1145	<i>Bacillus cihuensis</i>
32	p.004070	Proteína hipotética	40289-41491	1202	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
33	p.004071	Proteína hipotética	41492-41864	372	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
34	p.004072	T4SS transferencia ADN	41865-43778	1914	<i>Clostridium argentinense</i>
35	p.004073	<i>mobA/mobL</i>	43797-45425	1629	<i>Aeribacillus pallidus</i>

2.4.1.4. Tmp4

Tmp4 es una molécula de ADN circular que tiene un tamaño de 55505 pb, un contenido en G+C parecido a Tmp1 y Tmp2, 41.9% y consta de 72 genes (número de acceso en GenBank: CP063417).

El sesgo en el uso de codones entre Tmp4 y Tmp1 muestra algunas diferencias (Figura 3.10) pero no tantas como con Tmp3. Los genes de Tmp4 se localizan próximos al eje 1:1 pero hay cierta dispersión de los valores de Tmp1.

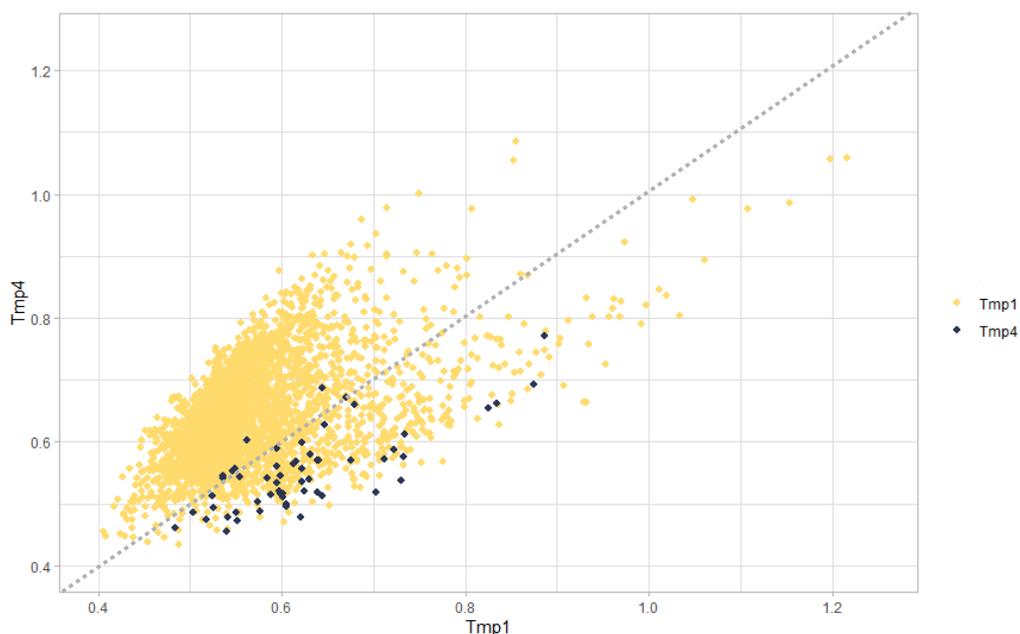


Figura 3.10. Representación del sesgo del uso de codones entre los elementos genómicos Tmp1 y Tmp4.

El programa PHASTER identificó en Tmp4 un fago en posición 11748-55491, con un tamaño de 43,7 Kb y un contenido en G+C del 42,34 %.

Imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasisus* 23.6 demostró la presencia de un fago en

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

el interior celular (Figura 3.11). Tiene una morfología típica del orden *Caudovirales* (fagos con cola), en concreto de la familia *Syphoviridae* (Ackermann, 2007), cola no contráctil de 185 nm de longitud y cabeza hexagonal de 110 nm de diámetro.

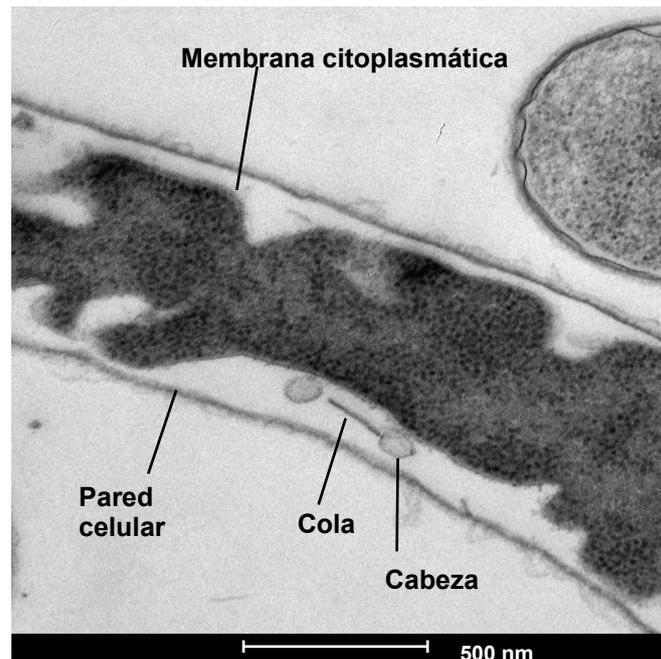


Figura 3.11. En la imagen se muestra una célula en plasmólisis (pérdida de turgencia celular) junto con un fago localizado entre la pared celular y la membrana citoplasmática contraída (periplasma).

El análisis Blastn de los 72 genes de Tmp4 muestra homología con genomas bacterianos y víricos (Tabla 3.7). 21 genes tienen homología con una secuencia que está anotada en el NCBI como un plásmido de *Anoxybacillus sp. B7M1*. Al introducir esta secuencia en el programa PHASTER identificamos la presencia de un fago. Al realizar el mismo procedimiento con el resto de genomas bacterianos también descubrimos la presencia de fagos integrados.

Capítulo 3

El sesgo en el uso de codones de Tmp4 y el plásmido de *Anoxybacillus sp. B7M1* muestra gran similitud (Figura 3.12), todos los genes se localizan junto al eje 1:1. Por lo tanto Tmp4 está estrechamente relacionado con un posible fago, aún no descrito, presente en la cepa de *Anoxybacillus sp. B7M1*.

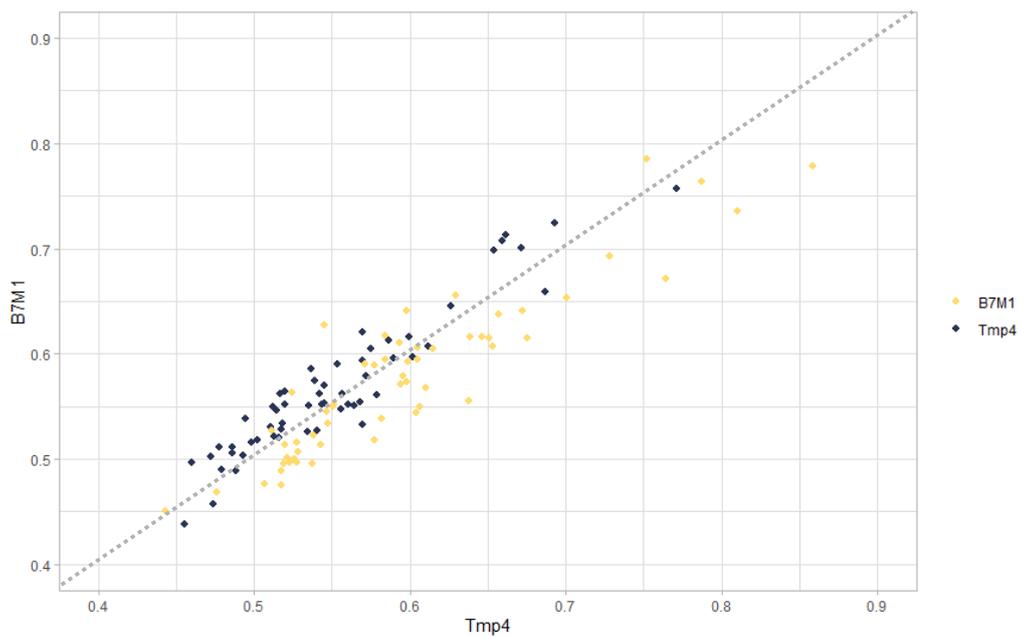


Figura 3.12. Representación del sesgo del uso de codones del elemento genómico Tmp4 y un plásmido de *Anoxybacillus sp. B7M1*.

Basándonos en la búsqueda de homología mediante psi-Blastp, podríamos asignar una función hipotética a 34 ORF (Tabla 3.7), que a su vez se pueden englobar en cinco grupos funcionales. Dos de esos grupos han sido detectados por las categorías COG: replicación, recombinación y reparación (L) con 8 genes: ORF1, ORF44, ORF48, ORF61, ORF64, ORF70, ORF71 y ORF72 y transcripción (K) con 6 genes: ORF5, ORF6, ORF8, ORF9, ORF50 y ORF63. Los otros tres grupos son: proteínas estructurales y empaquetamiento del fago, con 13 genes: ORF25, ORF26, ORF27, ORF28, ORF31, ORF32, ORF37, ORF38, ORF40,

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

ORF41, ORF42, ORF43, ORF45; proteínas de lisis: ORF19 y ORF20 y proteínas metabólicas ORF21, ORF34 y ORF56

Tabla 3.7. ORFs de Tmp4. Posición, homología y función.

ORF	Referencia Gen Bank	Posición pb	Homología Blast	Función
1	p.004080	1-948	<i>Phage Altai3</i>	Recombinasa YqaJ
2	p.004081	945-1142	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína hipotética
3	p.004082	1241-1381	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína hipotética
4	p.004083	1378-1563	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína hipotética
5	p.004084	1563-1796	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína represora
6	p.004085	2066-2458	<i>Phage Altai3</i>	Regulador transcripcional xre
7	p.004086	2455-2727	-	Proteína hipotética
8	p.004087	3308-4243	<i>Phage Altai3</i>	Helix-turn-helix proteína
9	p.004088	4231-5022	<i>Phage Altai3</i>	Proteína ParA
10	p.004089	5006-5338	<i>Phage Altai3</i>	Proteína hipotética
11	p.004090	5862-5999	-	Proteína hipotética
12	p.004091	7203-7340	-	Proteína hipotética
13	p.004092	7640-9019	<i>G. subterraneus E55-1 plasmid</i>	Proteína hipotética
14	p.004093	9079-9642	<i>Clostridium phage phiMMP01</i>	Proteína hipotética
15	p.004094	9758-10123	<i>Thermoanaeroseptum fracticalcis</i>	Proteína hipotética
16	p.004095	10233-10700	<i>P. thermoglucosidasius C56-YS93</i>	Proteína hipotética
17	p.004096	10775-11347	-	Proteína hipotética
18	p.004097	11364-11723	<i>Streptococcus phage 5093</i>	Proteína hipotética
19	p.004098	11938-12729	<i>Bacillus licheniformis strain H2</i>	Glucosido hidrolasa
20	p.004099	12729-13145	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína de lisis
21	p.004100	13200-14684	<i>Clostridium botulinum F str. 230613</i>	Pectato liasa
22	p.004101	14725-15288	<i>Clostridium phage phiCTC2A</i>	Proteína hipotética
23	p.004102	15301-16353	<i>Brevibacillus phage Jenst</i>	Proteína de adhesión
24	p.004103	16365-18452	-	Proteína hipotética
25	p.004104	18537-20294	<i>Brevibacillus phage Jenst</i>	Proteína estructural vírica
26	p.004105	20269-21651	<i>Brevibacillus phage Jenst</i>	Proteína estructural vírica
27	p.004106	21662-22048	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína estructural vírica
28	p.004107	22048-22470	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína estructural vírica
29	p.004108	22482-24080	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína hipotética
30	p.004109	24077-24769	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína hipotética
31	p.004110	24783-29120	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína de cola vírica
32	p.004111	29113-29472	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína unión cola vírica
33	p.004112	29514-29924	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína hipotética

Capítulo 3

34	p.004113	29996-30829	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	chitobiase/beta-hexosaminidase
35	p.004114	30843-31238	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína hipotética
36	p.004115	31238-31750	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína hipotética
37	p.004116	31755-32165	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína unión cabeza-cola
38	p.004117	32162-32719	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Conector cabeza gp6
39	p.004118	32767-33006	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína hipotética
40	p.004119	33023-34264	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína principal cápsida HK97
41	p.004120	34370-35110	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteasa cabeza HK97
42	p.004121	35184-37196	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína portal
43	p.004122	37218-38633	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Subunidad grande terminasa
44	p.004123	38827-39651	-	Recombinasa XerD
45	p.004124	39659-40588	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Subunidad pequeña terminasa
46	p.004125	40714-40902	-	Proteína hipotética
47	p.004126	41049-41324	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Proteína hipotética
48	p.004127	41480-42712	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Metilasa de ADN
49	p.004128	43265-43552	-	Proteína hipotética
50	p.004129	43631-44110	<i>Phage Altai3</i>	ARN polimerasa
51	p.004130	44372-44566	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína hipotética
52	p.004131	44805-45008	<i>Bacillus phage Wes44</i>	Proteína hipotética
53	p.004132	45022-45522	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína recombinación U
54	p.004133	45617-45778	-	Proteína hipotética
55	p.004134	45768-46022	-	Proteína hipotética
56	p.004135	46362-46931	<i>Anoxybacillus phage A403</i>	DUTPasa
57	p.004136	47036-47386	<i>Deep-sea thermophilic phage D6E</i>	Proteína hipotética
58	p.004137	47419-47763	<i>P. thermoglucosidasius C56-YS93</i>	Proteína hipotética
59	p.004138	47760-47993	<i>Deep-sea thermophilic phage D6E</i>	Proteína hipotética
60	p.004139	47990-48178	<i>Geobacillus sp. Y4.1MC1</i>	Proteína hipotética
61	p.004140	48202-49014	<i>Anoxybacillus sp. B7M1 plasmid</i>	Adenina metilasa N6
62	p.004141	49029-49547	<i>P. thermoglucosidasius C56-YS93</i>	Proteína hipotética
63	p.004142	49563-49745	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína hipotética
64	p.004143	49807-50793	<i>Streptococcus thermophilus phage</i>	Citosina metiltransferasa
65	p.004144	50943-51509	<i>P. thermoglucosidasius C56-YS93</i>	Proteína hipotética
66	p.004145	51509-51703	<i>A. caldiproteolyticus strain U458</i>	Proteína hipotética
67	p.004146	51706-52233	<i>A. flavithermus WK1</i>	Proteína hipotética
68	p.004147	52289-52465	<i>A. caldiproteolyticus strain U458</i>	Proteína DUF5320
69	p.004148	52467-52784	---	Proteína hipotética
70	p.004149	52800-53753	<i>A. caldiproteolyticus strain U458</i>	Proteína replicación
71	p.004150	53638-54387	<i>Geobacillus phage GBSV1</i>	Proteína replicación
72	p.004152	54589-55491	<i>Phage Altai3</i>	Recombinasa RecT

Se encontraron 14 regiones con una identidad de secuencia de nucleótidos del 100% con espaciadores CRISPR, dos en *Parageobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93 (ORF15 y ORF 65), uno en *Geobacillus sp. Y4.1MC1* (ORF60) y once en Tmp1 (ORF 5, ORF 6, ORF 13, ORF 14, ORF 50, ORF 51, ORF 52, ORF 54,

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

ORF 57 y ORF 58). Hay que destacar que ORF 5 y ORF 6 son reguladores transcripcionales XRE que codifican proteínas involucradas en la regulación de entrada en ciclo lítico o lisogénico. Es posible que estos espaciadores cuando son transcritos a ARN lleven a cabo una regulación post-transcripcional de los genes represores degradando sus ARN y por lo tanto impidiendo que el fago entre en ciclo lisogénico.

El alto número de espaciadores de Tmp1 que tienen homología con genes de Tmp4 y la diferencia significativa en el número de lecturas de secuenciación (Figura 3.5) indica que el fago presente en Tmp4 no se integra en el genoma principal de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6.

La homología de genes de Tmp4 con espaciadores CRISPR de otras cepas sugiere que Tmp4 o un fago muy similar también infectó a estas cepas en el pasado.

Tmp4 es un fago termófilo que interactúa con 23.6, como nos indican los espaciadores CRISPR en Tmp1 y se parece mucho a un posible fago presente en *Anoxybacillus* sp. B7M1 como indica la homología de secuencias (Tabla 3.7) y el sesgo en el uso de codones (Figura 3.12).

3.4.2 Pangenoma

Para obtener una vista general del contenido genómico, se calcularon y visualizaron tanto el genoma central como los pangenomas de las 13 cepas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* registradas en el NCBI (Tabla 3.3) mas la cepa 23.6 en estudio.

El número de genes del genoma central disminuyó rápidamente con la adición de genomas y se estabilizó lentamente después de añadir el décimo genoma,

Capítulo 3

indicando que los genomas disponibles definen el genoma central de esta especie y podemos considerarlo aproximadamente como cerrado (Figura 3.13.A).

El pangenoma mostró un total de 5050 genes, aumentando a una media de 103 genes por genoma añadido. El valor de crecimiento exponencial cuando se agregó el último genoma es de 0.325; por tanto, el pangenoma podría considerarse abierto (Figura 3.13.B).

La comparación genómica de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 con el resto de cepas se puede dividir en tres grupos (Figura 3.14):

- Genes que 23.6 comparte con 13 o 12 cepas (Core o genoma central), constituido por 3111 genes localizados principalmente en Tmp1 (85.7 %), solo 7 genes se encuentran en Tmp2 (7 %).
- Genes prescindibles, son aquellos que 23.6 tiene en común con un rango de 2 a 11 cepas (Shell), formado por 349 genes de los cuales 294 se localizan en Tmp1 (8.1 %), 51 en Tmp2 (55.4 %) y 4 en Tmp3 (6.45 %).
- Genes únicos (Cloud), solo están presentes en 23.6 o una cepa mas, constituido por 318 genes distribuidos entre Tmp1 (226, 6.2 %), Tmp2 (34, 37 %) y Tmp3 (58, 93.5 %).

Tmp4, al identificarse como un fago, no se ha incluido en esta agrupación pero sus 72 genes se clasifican como únicos porque no se han encontrado en otras cepas de la especie.

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

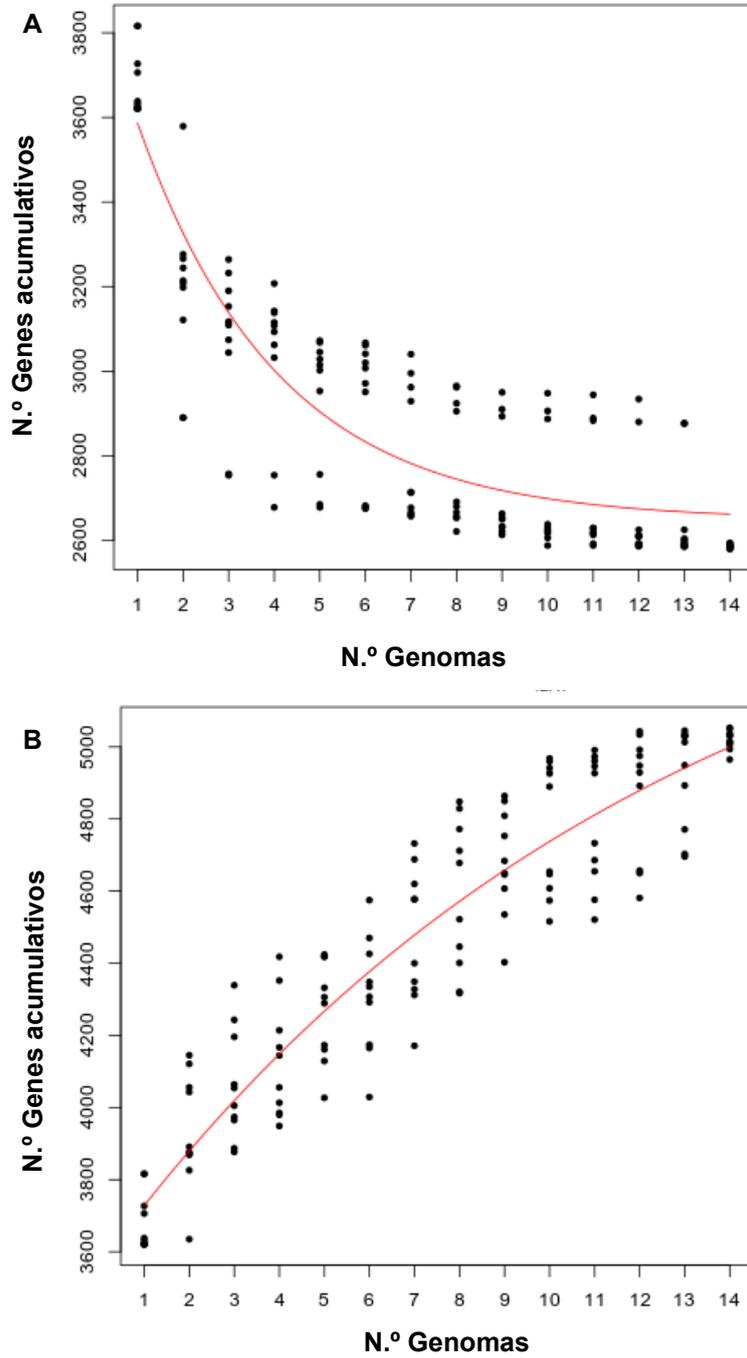


Figura 3.13. Genoma central (A) y pangenoma (B) de la especie *Parageobacillus thermoglucosidasius* a fecha Julio 2021.

Capítulo 3

Al tratarse de cepas de la misma especie era de esperar que la gran mayoría de los genes (85,7 %) se encuentren en todas las cepas estudiadas. Sin embargo, serán los genes únicos de 23.6, o aquellos que comparte sólo con alguna cepa, los que proporcionen la información mas relevante.

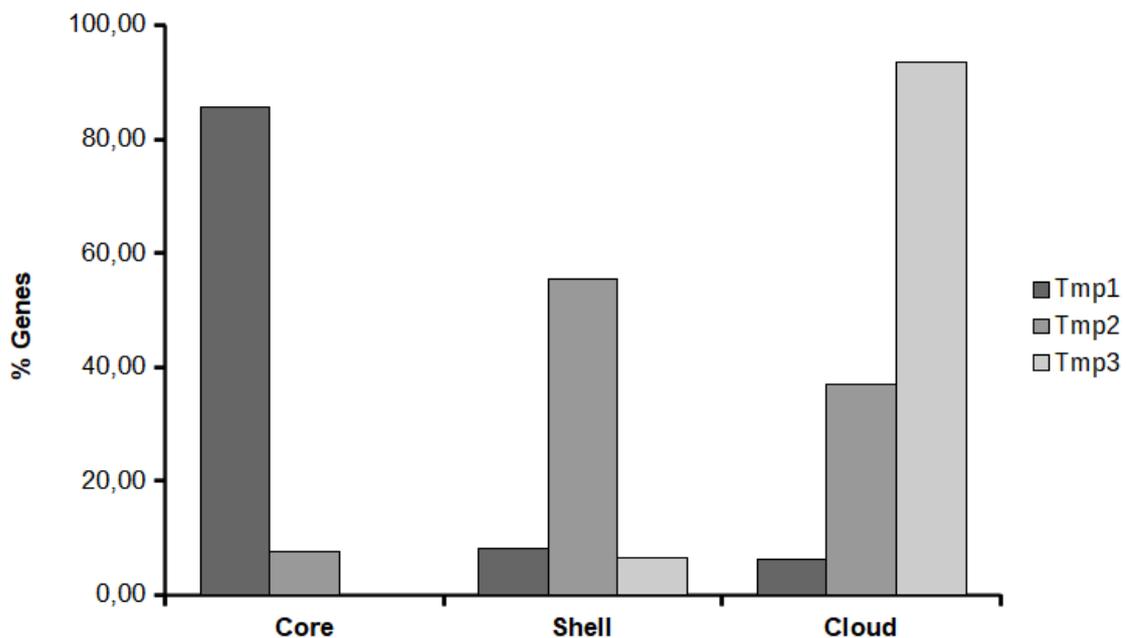


Figura 3.14. Distribución del genoma central, genes prescindibles y genes únicos en tres moléculas de ADN de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6.

El 55,4 % de los genes de Tmp2 están presentes solo en algunas de las cepas estudiadas, indicando que esta molécula de ADN se adquirió en un momento evolutivo temprano de la especie y se ha mantenido a lo largo del tiempo. Además, Tmp2 presenta un 37 % de genes únicos que están localizados principalmente entre dos tirosinas recombinasas descritas anteriormente y se corresponden con los genes de menor contenido en G+C (Figura 3.8).

Por el contrario, el 93,5 % de los genes de Tmp3 son únicos para la cepa 23.6. Si sumamos este hecho junto con el bajo contenido en G+C (36.4 %), el sesgo en el uso de codones y la presencia de elementos conjugativos en su secuencia,

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

podríamos decir que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 ha adquirido recientemente esta molécula.

El pangenoma de 23.6 ha revelado que el 6.2 % de los genes de Tmp1 son únicos (cloud) y en concreto un 4 % son exclusivos de esta cepa. El análisis COG no ha conseguido asignar un grupo al 48.6 % de los genes únicos. Aquellos que si han sido categorizados se agrupan principalmente en transporte y metabolismo de lípidos (I); metabolismo y transporte de iones inorgánicos (P); replicación, recombinación y reparación (L); transporte y metabolismo de aminoácidos (E); transporte y metabolismo de carbohidratos (G); con 12, 9, 8, 7 y genes respectivamente.

La capacidad metabólica de los genes englobados en el core, shell y cloud de la cepa 23.6 se evaluó por separado mediante la herramienta de reconstrucción de rutas GhostKOALA (Tabla 3.8). Los resultados indicaron que las rutas completas están localizadas en el genoma centran (core), con un total de 64 rutas (destacar que a 1364 genes no se le han asignado un número KO). La categoría KEGG con mayor número de genes es el metabolismo. En el core, el metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y metabolismo de cofactores y vitaminas son las categorías que más genes representan. A un gran número de genes prescindibles (58 %) y genes únicos (64 %) no se le han asignado un número KO. Los genes que han sido clasificados se concentran en el metabolismo de carbohidratos (shell y cloud), metabolismo de lípidos (cloud), biodegradación y metabolismo de xenobióticos (shell), procesamineto de información ambiental y procesos celulares (Tabla 3.8). El procesamiento de la información genética se encuentra exclusivamente en el genoma principal.

Por lo tanto, los resultados muestran que el genoma prescindible y los genes únicos han enriquecido principalmente las rutas metabólicas (biosíntesis de

Capítulo 3

metabolitos secundarios, biosíntesis de cofactores, degradación de compuestos aromáticos y metabolismo de ácidos grasos), transportadores ABC, sistema de fosfotransferasas y quorum. Esto puede deberse a la existencia de isoenzimas específicas de estas rutas que la cepa 23.6 ha adquirido por transferencia horizontal de genes.

Tabla 3.8. Número de genes del Core, Shell y Cloud en las diferentes categorías KEGG

Categorías KEGG representadas	Número de genes		
	Core	Shell	Cloud
Metabolismo	1569	72	43
Metabolismo del carbono	106	3	1
Metabolismo de carbohidratos	388	28	10
Metabolismo energético	144	5	2
Metabolismo de lípidos	79	3	10
Metabolismo de nucleótidos	89	1	4
Metabolismo de aminoácidos	309	8	6
Metabolismo de otros aminoácidos	63	0	2
Biosíntesis y metabolismo de glicanos	41	2	0
Metabolismo de cofactores y vitaminas.	185	2	2
Metabolismo de terpenoides y policétidos	25	2	1
Biosíntesis de otros metabolitos secundarios	35	0	3
Biodegradación y metabolismo de xenobióticos	105	18	2
Procesamiento de información genética	203	3	3
Transcripción	5	0	0
Traducción	82	0	0
Plegado, clasificación y degradación	48	0	0
Replicación y reparación	68	3	3
Procesamiento de información ambiental	248	30	10
Transporte de membranas	145	27	8
Transducción de señales	103	3	2
Procesos celulares	165	12	18
Transporte y catabolismo	9	0	1
Motilidad celular	60	3	1
Ciclo celular	15	0	1
Comunidad celular	81	9	15
Inclasificados	933	233	155
Total	3118	350	229

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

Al representar los genes únicos junto a los MGE en Tmp1 observamos que se localizan de forma agrupada en zonas concretas del genoma (Figura 3.15). A grandes rasgos se pueden diferenciar tres zonas donde se localizan estos genes. Una zona grande localizada en la zona terminal de la replicación y dos zonas mas pequeñas situadas a ambos lados del origen de replicación. La asociación entre genes únicos y MGE indica la existencia de zonas más permisivas o puntos calientes de transferencia horizontal de genes.

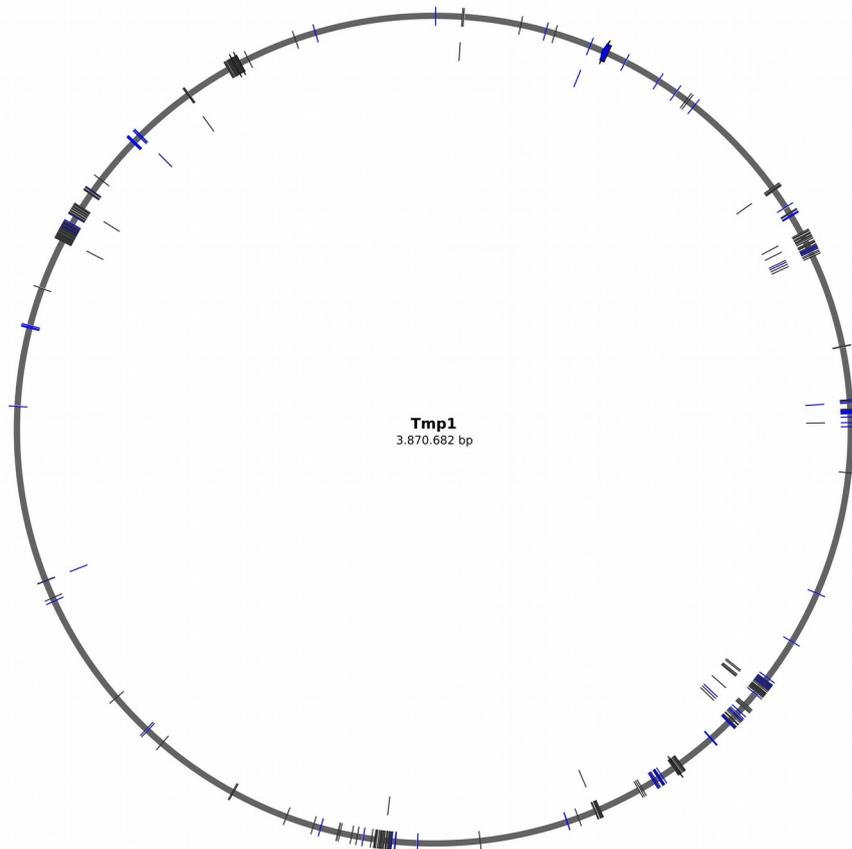


Figura 3.15. Localización de los genes únicos (barras grises) y elementos móviles genéticos (barras azules) de Tmp1.

Capítulo 3

Los genes únicos de Tmp1 y Tmp2 tienen un sesgo en el uso de codones bastante notable con respecto a la molécula de ADN donde se localizan (Figura 3.16 A,B). En la representación del sesgo de usos de codones de Tmp1 y Tmp2 están eliminados los genes únicos correspondientes a cada molécula.

Si observamos la figura 3.16 (A) vemos como algunos genes únicos están próximos a la línea 1:1 o desplazados a su izquierda donde se localizan la gran mayoría de los genes de Tmp1. Esto nos puede indicar que el origen de esos genes podría estar en especies o géneros cercanos a *Parageobacillus thermoglucosidasius* o que son eventos conservados en la historia evolutiva de la cepa 23.6.

Por el contrario, otro grupo de genes únicos están desplazados a la derecha de la línea 1:1, al igual que algunos genes de Tmp1. Esta similitud en el sesgo del uso de codones entre genes únicos y otros genes de Tmp1 podría reflejar la posibilidad de que un número mayor de genes pudieran haberse adquirido por HGT en Tmp1.

En el sesgo del uso de codones de Tmp4 (fago) con respecto a Tmp1 (Figura 3.10) ocurre algo similar que con los genes únicos. Hay genes dentro de Tmp1 que están desplazados a la derecha de la línea 1:1 y tienen más similitud con los genes de Tmp4, sugiriendo la presencia de secuencias víricas en Tmp1.

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

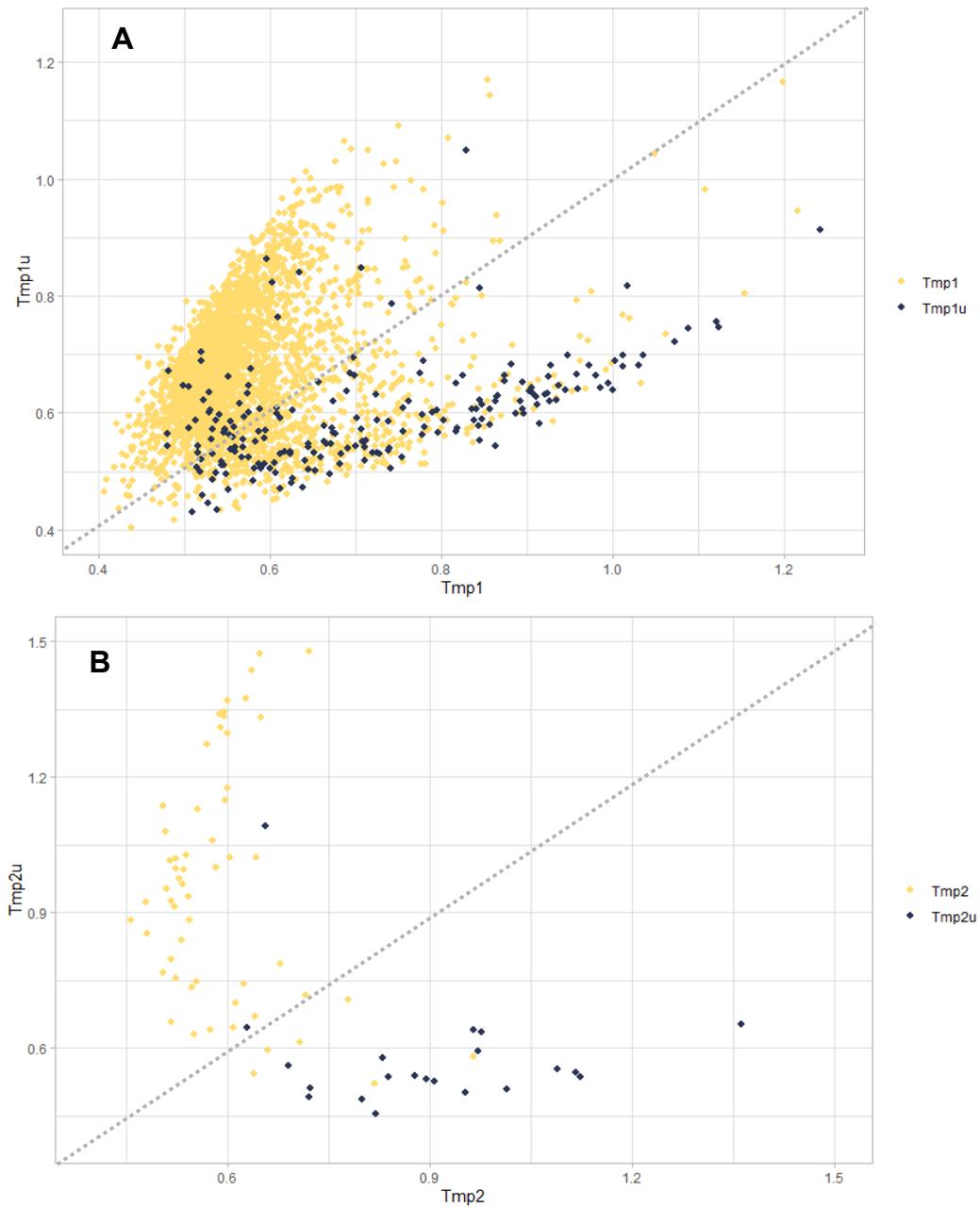


Figura 3.16. Representación del sesgo del uso de codones de los elementos genómicos y genes: (A) Tmp1 y genes únicos de Tmp1 (Tmp1u) y (B) Tmp2 y genes únicos de Tmp2 (Tmp2u).

Capítulo 3

Si comparamos estos genes únicos con Tmp3, que es un plásmido que presenta genes relacionados con la conjugación bacteriana y que claramente la cepa 23.6 ha adquirido recientemente, observamos que el sesgo en el uso de codones es prácticamente idéntico (Figura 3.17). Que los genes únicos de Tmp1 y Tmp2 coincidan con el sesgo de uso de codones de Tmp3 indicaría que el origen de esos genes es foráneo y que se han transmitido por transferencia horizontal y posiblemente compartiendo un origen común.

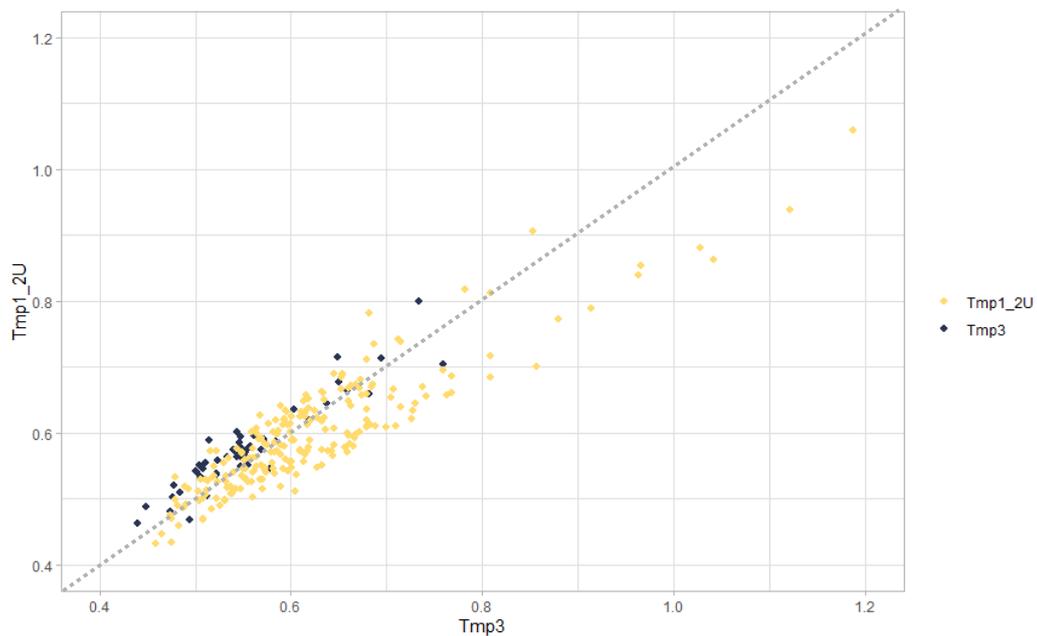


Figura 3.17. Representación del sesgo del uso de codones entre los elementos genómicos Tmp3 y genes únicos de Tmp1 y Tmp2 (Tmp1_2u).

Se observa que la transferencia horizontal de genes en la cepa 23.6 ocurre entre las moléculas Tm1, Tmp2 y Tmp3 aunque desconocemos cual es el flujo prioritario y también entre Tmp4 (o fagos relacionados) y Tmp1. Posiblemente la incorporación de ADN exógeno sea un evento de HGT importante en la historia evolutiva de la cepa 23.6 pero no es fácil de determinar inequívocamente.

3.5. Discusión.

Los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus* están constituidos por microorganismos termófilos que se pueden aislar prácticamente de cualquier ambiente. Este carácter ubicuo hace que nos planteemos cuales son los mecanismos por el cual estos microorganismos son capaces de vivir en condiciones que no son óptimas para su crecimiento.

El genoma principal (Tmp1), tiene características muy similares a los genomas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* publicados en la base de datos del NCBI (Tabla 3.3). Una característica de esta especie es que tiene los genomas más grandes dentro del género *Geobacillus*, esto podría reflejar los requisitos de codificación adicionales asociados con el crecimiento anaeróbico, las regiones CRISPR, así como los genes de función desconocida que se encuentran entre los elementos transponibles de *Parageobacillus thermoglucosidasius* (Hussein, 2015).

Las otras tres moléculas de ADN están formadas por dos plásmidos (Tmp2 y Tmp3) y un fago (Tmp4). La presencia de plásmidos en las cepas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* es bastante común (Tabla 3.3), siendo la especie que mayor número de plásmidos presenta en este género. Por el contrario los fagos descritos para esta especie y para todo el género son muy reducidos, en concreto solo hay 6 fagos descritos que infectan a especies del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* anotados en el NCBI (Tabla 3.2).

A grandes rasgos la cepa 23.6 y por extensión el resto de cepas de la especie tienen todas las herramientas necesarias para el intercambio de material genético. La transferencia horizontal de genes se puede llevar a cabo por cuatro mecanismos diferentes (Figura 3.3): transformación, traducción, conjugación y GTAs (Furuya y Lowy, 2006). Las características genómicas de la cepa 23.6 y el

Capítulo 3

sesgo en el uso de codones de las diferentes moléculas de ADN y genes únicos indican que lleva a cabo los tres mecanismos.

El pangenoma de las cepas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* es abierto, por tanto, los genomas podrían ganar o perder genes con una alta frecuencia. En el análisis de las rutas KEGG los genes relacionados con el procesamiento de la información genética y las rutas metabólicas centrales (glucólisis, ciclo de Krebs, pentosas fosfatos etc.) se localizan exclusivamente en el genoma central. Por el contrario, los genes de shell y cloud está relacionados con el metabolismo y señalización y procesos celulares. El hecho de que los genes prescindibles y genes únicos estén enriquecidos en rutas de metabolismo de ácidos grasos, degradación de compuestos aromáticos, biosíntesis de cofactores, transportadores y sistemas de defensa es indicativo de la interacción de estos microorganismos con el medio ambiente.

Los genes únicos y genes prescindibles están involucrados en funciones específicas de la especie que no parecen ser esenciales para su desarrollo, pero podrían conferir ventajas selectivas para la adaptación a diferentes nichos (Zeigler, 2014). Diferentes estudios han llegado a la conclusión de que la transferencia horizontal de genes es el motor evolutivo del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* (Bezuidt et al., 2016; Esin et al., 2018 y Wang et al., 2020) haciendo posible que estos microorganismos se adapten rápidamente a cambios en su medio ambiente y al aprovechamiento de nuevos nichos disponibles.

El pangenoma de la especie *Parageobacillus thermoglucosidasius* ha identificado tres puntos calientes de transferencia horizontal de genes, que están localizados próximos al origen de replicación y en la zona terminal de la replicación en el genoma. Un estudio más completo llevado a cabo con un total de 5073 genomas de *Geobacillus*, *Parageobacillus* y *Anoxybacillus* (Esin et al., 2018) no habla de

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

puntos calientes si no de zonas permisivas de HGT mas amplias y sugiere que el crecimiento rápido de estos microorganismos y la capacidad de formar esporas, limitan conjuntamente las zonas del genoma donde los eventos de HGT suelen ocurrir, concentrándolos en estas tres zonas descritas.

La integración de un gen por HGT en la célula huésped es un evento difícil porque pueden existir incompatibilidades como: códigos genéticos diferentes, patrones de usos de codones desviados, dependencias con otros componentes moleculares etc. (Sorek et., al 2007). Algunos autores consideran que la transferencia horizontal de genes del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* ocurre principalmente entre géneros cercanos, como por ejemplo *Anoxybacillus* (Goh et al., 2014 y Urbietta et al., 2015). En el caso de la cepa 23.6 muchos de los genes únicos tienen una mayor homología (por Blast) con genes de otras especies de *Parageobacillus*, *Geobacillus* y *Anoxybacillus*, incluso Tmp4 (fago) muestra una gran homología con un posible fago presente en un plásmido de *Anoxybacillus* sp. *B7M1*. Por lo tanto, los resultados del Blast nos indica la estrecha relación existente entre estos géneros, aunque debemos tener en cuenta que la cercanía evolutiva de los géneros puede estar enmascarando eventos de HGT de origen lejano filogenéticamente.

Todos los autores coinciden en que el género *Parageobacillus* tiene una gran diversidad genómica (Bezuidt et al., 2016; Mohr et al., 2018; Esin et al., 2018 y Wang et al., 2020), destacando su potencial biotecnológico al tratarse de microorganismos termófilos (Najar y Thakur, 2020). Estas características son contradictorias a que los eventos de HGT solo ocurran entre estos géneros, ya que si esto fuese así los pangenomas observados seria de esperar que fuesen más cerrados.

Tmp3 y su relación en el sesgo de uso de codones con los genes únicos de Tmp2 y Tmp1 es una evidencia importante de que la cepa *Parageobacillus*

Capítulo 3

thermoglucoasius 23.6 ha intercambiado material genético con microorganismos mesófilos más alejados (*Clostridium* sp, *Bacillus thurigiensis*, etc.) pero mayoritariamente dentro del Phylum Firmicutes.

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes en la tierra (Breitbart y Rohwer, 2005) y las estimaciones de partículas virales (VLPs, virus-like particles) en suelo varía de $1,5 \times 10^8$ a $4,1 \times 10^9$ por gramo de suelo y depende de la localización geográfica y la composición del suelo (Adriaenssens et al., 2015). También son de gran importancia para comprender la transferencia genética, la diversidad y la evolución de los microorganismos (Campbell, 2003). Los fagos termófilos están muy poco estudiados y si nos referimos a fagos que infecten a especies del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* solo existen 6 fagos descritos (Tabla 3.2) aunque todo parece indicar que la relación de estos microorganismos con los fagos es bastante frecuente, como nos indica el alto número de CRISPR presente en sus genomas y la homología de los espaciadores con secuencias víricas (Tabla suplementaria 3.1).

Una búsqueda en el programa Phaster introduciendo los genomas anotados de *Geobacillus* y *Parageobacillus* ha identificado un total de 64 posibles fagos (Tabla suplementaria 3.2), integrados en el genoma o anotados como un plásmido. Con frecuencia se han identificado dos fagos en una misma cepa, incluso algunas cepas como *Geobacillus* sp. MMMUD3 muestran cuatro posibles fagos. El fago de *Geobacillus* E2 y el de *Thermus* OH2 son los que mayor homología presentan, pero posiblemente esto se deba a la falta de fagos termófilos anotados en las bases de datos.

Aunque los fagos descritos para los géneros *Parageobacillus* y *Geobacillus* presentan una alta especificidad por su huésped (Liu et al., 2006; van Zyl et al., 2015), análisis de desviación del uso de tetranucleótidos sugieren que sus huéspedes no tienen porque ser el anfitrión dominante en la naturaleza (van Zyl et

al., 2015). Este hecho junto con la gran cantidad de espaciadores que presentan homología con diferentes fagos indica que los genomas de estos géneros están fuertemente influenciados por fagos, siendo un elemento importante en la transferencia horizontal de genes y en su diversidad genómica.

2.5. Conclusiones

La importancia de estudiar el genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 viene infundada por el carácter ubicuo de estos microorganismos termófilos. Descifrar los genes que gobiernan a estos microorganismos nos ayudaría a entender porque viven en condiciones que no son óptimas para su crecimiento. La secuenciación del genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 identificó cuatro moléculas de ADN circular de doble cadena: El genoma principal o Tmp1 (3.870.682pb), Tmp2, un megaplasmido (102283pb) con unas características muy similares a Tmp1, Tmp3 (50843pb) tiene unas características muy diferentes al genoma principal y un bacteriófago, Tmp4 (55505pb).

La información encerrada en su secuencia nos indica que la cepa 23.6 tiene un gran número de genes involucrados en el metabolismo energético pudiendo obtener energía de diferentes fuentes.

P. thermoglucosidasius 23.6 tiene todas las herramientas genómicas necesarias para el intercambio genético (transformación, conjugación y traducción) y lo puede llevar a cabo entre géneros próximos (*Anoxybacillus*) y otros mas alejados (*Clostridium*). Esta gran predisposición al intercambio de material genético genera pangenomas abiertos y aumenta el número de genes únicos que confiere una ventaja selectiva ante posibles cambios ambientales. Estos genes se concentran principalmente en puntos calientes de HGT, localizados a ambos lados del origen de replicación y en la zona terminal de la replicación. El fago secuenciado (Tmp4) pertenece a la familia *Syphoviridae*, tiene homología con un posible fago presente

Capítulo 3

en un plásmido de *Anoxybacillus sp. B7M1* y no se integra en el genoma principal (Tmp1). El alto número de espaciadores presentes en las regiones repetitivas CRISPR con o sin homología con fagos anotados en la base de datos, refleja la estrecha relación que tiene la cepa 23.6 con distintos fagos y su influencia en la diversidad genómica.

3.7. Bibliografía

- Ackermann H. W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*, 152(2): 227-243.
- Adriaenssens, E. M., Van Zyl, L., De Maayer, P., Rubagotti, E., Rybicki, E., Tuffin, M., Cowan, D. A. (2015) Metagenomic analysis of the viral community in Namib Desert hypoliths. *Environmental microbiology*, 17(2): 480-495.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3): 403-410.
- Angly, F. E., Felts, B., Breitbart, M., Salamon, P., Edwards, R. A., Carlson, C., Chan, A. M., Haynes, M., Kelley, S., Liu, H., Mahaffy, J. M., Mueller, J. E., Nulton, J., Olson, R., Parsons, R., Rayhawk, S., Suttle, C. A., Rohwer, F. (2006) The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS biology*, 4(11): e368.
- Aravind, L., Galperin, M. Y., Koonin, E. V. (1998) The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends in biochemical sciences*, 23(4): 127-129.
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic acids research*, 44(W1): W16-W21.
- Athey, J., Alexaki, A., Osipova, E., Rostovtsev, A., Santana-Quintero, L. V., Katneni, U., Simonyan, V., Kimchi-Sarfaty, C. (2017) A new and updated resource for codon usage tables. *BMC bioinformatics*, 18(1): 391.

Capítulo 3

- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819): 1709-1712.
- Becq, J., Churlaud, C., Deschavanne, P. (2010) A benchmark of parametric methods for horizontal transfers detection. *PloS one*, 5(4): e9989.
- Bezuidt, O. K., Pierneef, R., Gomri, A. M., Adesioye, F., Makhalanyaane, T. P., Kharroub, K., Cowan, D. A. (2016) The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus. *Frontiers in microbiology*, 7, 723.
- Breitbart, M., Wegley, L., Leeds, S., Schoenfeld, T., Rohwer, F. (2004) Phage community dynamics in hot springs. *Applied and environmental microbiology*, 70(3): 1633-1640.
- Breitbart, M., Rohwer, F. (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?. *Trends in microbiology*, 13(6): 278-284.
- Campbell A. (2003) The future of bacteriophage biology. *Nature reviews. Genetics*, 4(6): 471-477.
- Casas, V., Rohwer, F. (2007) Phage metagenomics. *Methods in enzymology*, 421: 259-268.
- Contreras-Moreira, B., Vinuesa, P. (2013) GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and environmental microbiology*, 79(24): 7696-7701.

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E., Vergnaud, G., Gautheret, D., Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1): W246-W251.
- Cuecas, A., Kanoksilapatham, W., González, J. M. (2017) Evidence of horizontal gene transfer by transposase gene analyses in *Fervidobacterium* species. *PloS one*, 12(4): e0173961.
- Darmon, E., Leach, D. R. (2014) Bacterial genome instability. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 78(1): 1-39.
- Doolittle, W. F. (2000) Uprooting the tree of life. *Sci. Am.* 282: 90-95.
- Dufraigne, C., Fertil, B., Lespinats, S., Giron, A., Deschavanne, P. (2005) Detection and characterization of horizontal transfers in prokaryotes using genomic signature. *Nucleic acids research*, 33(1): e6.
- Elek, A., Kuzman, M., Vlahovicek, K. (2020) coRdon: Codon Usage Analysis and Prediction of Gene Expressivity. *R package version 1.8.0*, <https://github.com/BioinfoHR/coRdon>.
- Esin, A., Ellis, T., Warnecke, T. (2018) Horizontal gene flow into *Geobacillus* is constrained by the chromosomal organization of growth and sporulation. *BioRxiv*.

Capítulo 3

- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., Tang, Y., Liu, X., Han, W., Peng, X., Liu, R., Wang, L. (2007) Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13): 5602-5607.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5223): 496-512.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9): 722-732.
- Furuya, E. Y., Lowy, F. D. (2006) Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature reviews. Microbiology*, 4(1): 36-45.
- Goh, K. M., Gan, H. M., Chan, K. G., Chan, G. F., Shahar, S., Chong, C. S., Kahar, U. M., Chai, K. P. (2014) Analysis of *Anoxybacillus* genomes from the aspects of lifestyle adaptations, prophage diversity, and carbohydrate metabolism. *PloS one*, 9(6): e90549.
- González, J. M., Ortiz-Martinez, A., Gonzalez-delValle, M. A., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C. (2003) An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *Journal of microbiological methods*, 55(2): 459-463.

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

- González, J. M., Zimmermann, J., Saiz-Jimenez, C. (2005) Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(3): 333-337.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010a) Procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo. P201031177. España. Patente del CSIC. 29 Julio 2010.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010b) Microorganismo heterótrofo termófilo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* y su uso para la producción de sulfatos. PCTES2010070851. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010c) Microorganismo heterótrofo termófilo CECT7628 del género *Ureibacillus* y su uso para la producción de sulfatos PCTES2010070852. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.
- González, J.M., Ortiz-Martinez, A., González-del Valle, M. A., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C. (2003) An efficient strategy for screening large cloned libraries of amplified 16S rDNA sequences from complex environmental communities. *Journal of Microbial Methods*, 55:459-463.
- González, J.M., Portillo, M.C., Belda-Ferre, P., Mira, A. (2012) Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *Plos One*, 7 (1):e29973
- González, J. M., Portillo, M. C., Piñero-Vidal, M. (2014) Latitude-dependent underestimation of microbial extracellular enzyme activity in soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2427-2434.

Capítulo 3

- González, J. M., Delado, J. A. Gomez, E. J. Santana, M., Cruz, C. M. (2016) Microorganismos termófilos para solubilización de fosfatos a temperaturas elevadas. P201630900. España. Patente del CSIC 1 Julio 2016.
- González, J. M., Puerta-Fernández, E., Santana, M. M., Rekadwad, B. (2020) On a Non-Discrete Concept of Prokaryotic Species. *Microorganisms*, 8(11): 1723.
- Griffith F. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of hygiene*, 27(2): 113-159.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd: c1979-c2000.
- Hall N. (2007) Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *The Journal of experimental biology*, 210(Pt 9): 1518-1525.
- Hilario, E., Gogarten, J. P. (1993) Horizontal transfer of ATPase genes--the tree of life becomes a net of life. *Bio Systems*, 31(2-3): 111-119.
- Hussein, A. H., Lisowska, B. K., Leak, D. J. (2015) The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. *Advances in applied microbiology*, 92: 1-48.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W., Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6): 1565-1575.

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

- Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of molecular biology*, 428(4): 726-731.
- Koonin, E. V., Mushegian, A. R., Galperin, M. Y., Walker, D. R. (1997) Comparison of archaeal and bacterial genomes: computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the archaea. *Molecular microbiology*, 25(4): 619-637.
- Lang, A. S., Westbye, A. B., Beatty, J. T. (2017) The Distribution, Evolution, and Roles of Gene Transfer Agents in Prokaryotic Genetic Exchange. *Annual review of virology*, 4(1): 87-104.
- Lawrence, J. G., Ochman, H. (2002) Reconciling the many faces of lateral gene transfer. *Trends in microbiology*, 10(1): 1-4.
- Leimbach A. (2016) Bac-genomics-scripts: Bovine *E. coli* mastitis comparative genomics edition. *Zenodo*.
- Liu, B., Wu, S., Song, Q., Zhang, X., Xie, L. (2006) Two novel bacteriophages of thermophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal fields. *Current microbiology*, 53(2): 163-166.
- Liu, B., Zhang, X. (2008) Deep-sea thermophilic *Geobacillus* bacteriophage GVE2 transcriptional profile and proteomic characterization of virions. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(4): 697-707.

Capítulo 3

Liu, B., Zhou, F., Wu, S., Xu, Y., Zhang, X. (2009) Genomic and proteomic characterization of a thermophilic *Geobacillus* bacteriophage GBSV1. *Research in microbiology*, 160(2): 166-171.

Liu, M., Li, X., Xie, Y., Bi, D., Sun, J., Li, J., Tai, C., Deng, Z., Ou, H. Y. (2019) ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic acids research*, 47(D1): D660-D665.

Marks, T. J., Hamilton, P. T. (2014). Characterization of a thermophilic bacteriophage of *Geobacillus kaustophilus*. *Archives of virology*, 159(10): 2771-2775.

Mohr, T., Aliyu, H., Küchlin, R., Zwick, M., Cowan, D., Neumann, A., de Maayer, P. (2018) Comparative genomic analysis of *Parageobacillus thermoglucosidasius* strains with distinct hydrogenogenic capacities. *BMC genomics*, 19(1): 880.

Najar, I. N., Thakur, N. (2020) A systematic review of the genera *Geobacillus* and *Parageobacillus*: their evolution, current taxonomic status and major applications. *Microbiology (Reading, England)*, 166(9): 800-816.

Pedros-Alió, C. (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14:257-263.

Portillo, M. C., Santana, M., Gonzalez, J. M. (2012) Presence and potencial role of thermophilic bacteria in temperate terrestrial environments. *Die Naturwissenschaften*, 99:43-53.

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

- Ravenhall, M., Škunca, N., Lassalle, F., Dessimoz, C. (2015) Inferring horizontal gene transfer. *PLoS computational biology*, 11(5): e1004095.
- Rice, G., Stedman, K., Snyder, J., Wiedenheft, B., Willits, D., Brumfield, S., McDermott, T., Young, M. J. (2001) Viruses from extreme thermal environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23): 13341-13345.
- Santana, M. M., González, J. M. (2015) High temperature microbial activity in upper soil layers. *FEMS microbiology letters*, 362(22): fnv182.
- Santana, M., Portillo, M. C., González, J. M., Clara, I. E. (2013) Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176:47-56.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M. (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic acids research*, 34(Database issue): D32-D36.
- Siguier, P., Goubeyre, E., Chandler, M. (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS microbiology reviews*, 38(5): 865-891.
- Syvanen M. (1985) Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution. *Journal of theoretical biology*, 112(2): 333-343.

Capítulo 3

- Skowron, P. M., Kropinski, A. M., Zebrowska, J., Janus, L., Szemiako, K., Czajkowska, E., Maciejewska, N., Skowron, M., Łoś, J., Łoś, M., Zylicz-Stachula, A. (2018) Sequence, genome organization, annotation and proteomics of the thermophilic, 47.7-kb *Geobacillus stearothermophilus* bacteriophage TP-84 and its classification in the new Tp84 virus genus. *PloS one*, 13(4): e0195449.
- Sorek, R., Zhu, Y., Creevey, C. J., Francino, M. P., Bork, P., Rubin, E. M. (2007). Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5855): 1449-1452.
- Supek, F., Vlahovicek, K. (2005) Comparison of codon usage measures and their applicability in prediction of microbial gene expressivity. *BMC bioinformatics*, 6, 182.
- Suttle C. A. (2005) Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057): 356-361.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G. J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S., Uchiyama, I. (2004) Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic acids research*, 32(21): 6292-6303.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., Koonin, E. V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research*, 28(1): 33-36.

Análisis genómico de la cepa Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6

- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Angiuoli, S. V., Crabtree, J., Jones, A. L., Durkin, A. S., Deboy, R. T., Davidsen, T. M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit y Ros, I., Peterson, J. D., Hauser, C. R., Sundaram, J. P., Nelson, W. C., Madupu, R., ... Fraser, C. M. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39): 13950-13955.
- Urbieta, M. S., Donati, E. R., Chan, K. G., Shahar, S., Sin, L. L., Goh, K. M. (2015) Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology advances*, 33(6 Pt 1): 633-647.
- van Wolferen, M., Ajon, M., Driessen, A. J., Albers, S. V. (2013) Molecular analysis of the UV-inducible pili operon from *Sulfolobus acidocaldarius*. *MicrobiologyOpen*, 2(6): 928-937.
- van Zyl, L. J., Sunda, F., Taylor, M. P., Cowan, D. A., Trindade, M. I. (2015) Identification and characterization of a novel *Geobacillus thermoglucosidasius* bacteriophage, GVE3. *Archives of virology*, 160(9): 2269-2282.
- Vernikos, G., Medini, D., Riley, D. R., Tettelin, H. (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Current opinion in microbiology*, 23: 148-154.
- Wang, Y., Zhang, X. (2008) Identification and characterization of a novel thymidylate synthase from deep-sea thermophilic bacteriophage *Geobacillus* virus E2. *Virus genes*, 37(2): 218-224.

Capítulo 3

- Wang, Y., Zhang, X. (2010) Genome analysis of deep-sea thermophilic phage D6E. *Applied and environmental microbiology*, 76(23), 7861-7866.
- Wang, M., Zhu, H., Kong, Z., Li, T., Ma, L., Liu, D., Shen, Q. (2020) Pan- Genome Analyses of *Geobacillus* spp. Reveal Genetic Characteristics and Composting Potential. *International journal of molecular sciences*, 21(9): 3393.
- Yadav S. P. (2007). The wholeness in suffix -omics, -omes, and the word om. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 18(5): 277.
- Zeigler, D. R. (2014) The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology (Reading, England)*, 160:1-11
- Zhaxybayeva, O., Swithers, K. S., Lapierre, P., Fournier, G. P., Bickhart, D. M., DeBoy, R. T., Nelson, K. E., Nesbø, C. L., Doolittle, W. F., Gogarten, J. P., Noll, K. M. (2009) On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the *Thermotogales*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14): 5865-5870.
- Zhang, L., Xu, D., Huang, Y., Zhu, X., Rui, M., Wan, T., Zheng, X., Shen, Y., Chen, X., Ma, K., Gong, Y. (2017) Structural and functional characterization of deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 HNH endonuclease. *Scientific reports*, 7, 42542.
- Ziegelin, G., Pansegrau, W., Lurz, R., Lanka, E. (1992) TraK protein of conjugative plasmid RP4 forms a specialized nucleoprotein complex with the transfer origin. *The Journal of biological chemistry*, 267(24): 17279-17286.

3.8. Anexos

Tabla suplementaria 3.1. Espaciadores CRISPR presentes en *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 con homología a otras secuencias víricas.

Espaciador	Cepa	Valor E	Referencia	Fago
GCGAATATAGATGATTTAGACAAAATCATCGAAAAG	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	0.014	CP038158	GVE2
ACGTAGCATTGCAGCAGTAGCAAATAACCGCATTGTGC	<i>Bacillus sonorensis</i>	1.1e-04	CP021920	-
CTAACTTTTTCAAAAATTGGTCATAATGCCGTA TAGA	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52	4e-09	CP002442	GVE2
CCAGCATTTACGGCAGATATAACGGGCGATTTTTT	<i>Geobacillus</i> virus E3	7.7e-06	KP144388	GVE3
CTTTATTTAATATTTCTTTAGTAACATCTAACTCCATG	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771	0.019	CP003752	7 Fagos
CGAAGTAATCTTGAAAACAGCAGCACAGGCTGCCTGGGAGT	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	1.3e-09	CP002835	GVE2
TATTTCCGGCGTGGAGATGGGATGATATGGGATTCGGT	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	1.3e-09	CP002835	GVE2
GCGCGACAAAGACGGACATTTTAATCCCTTCAAC	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	9.2e-08	CP002835	GVE2
TACGAATTTCAATTGTTGATGAAGTATATACAAA	<i>Bacteroides</i> fago Barc2635	0.021	MN078104	Barc2635
TCCGCGCCTTGTTTCGATCTCTCCTGAATCCCGTAAGT	<i>Marinitoga camini</i> virus 2	0.002	KP836356	virus 2
ACGTATATCACCAACGTTTCAACGTGGCGGCAAAGC	<i>Geobacillus</i> sp. 46C-IIa	2.3e-05	CP061474	GVE2
GTCCTGAATCGACCTTCAAAAATATCATGATATTGTC	<i>Geobacillus</i> virus E2	1.9e-07	NC_009552	GVE2
TGTGTCTACCATTTCATCAAAGGCTTCACTGTACTAC	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	8.5e-05	CP002835	GVE2
ATCCACAATCCTTGACGTGGGCATCAGGTGAGGCTAA	<i>Mycobacterium</i> fago Bromden	0.005	MH576973	Bromden
CAGGGTGAAGGGGGTCTGGTAACGCTCAACCTTCT	Phage phi OH2	1e-04	AB823818	phi OH2
GTATCCGATAGTTCACGAACAAAATCGTGGAAGCCT	<i>Aeribacillus pallidus</i> PI8	0.005	AP022323	Strept 315.5
CTACTTCATACATGCTTAATTCATTATCTTTTAAAC	<i>Staphylococcus</i> fago IME-SA4	0.005	KP735928	IME-SA4
TCCAAGCTGTTGTCGATGCGGTACACGATACGGAT	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	3.2e-08	CP002835	GVE2
TAActCAATCCTTTTCCTGTTTGTTTCATATGTCTC	<i>Geobacillus</i> virus E3	3.3e-09	KP144388	GVE3
TAACCAACCATGAAAATACTTTCTCCGAATTGATCGC	<i>Geobacillus</i> virus E3	3e-10	KP144388	GVE3
AAATGAATATACCTTACGGTGTGTTGTGCTTGCTTGT	<i>Geobacillus</i> virus E3	2.8e-05	KP144388	GVE3
AAACAGTACGGATATATGAGGCGTGAACGTCGTCAAAA	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> KCTC39	2.4e-06	CP017694	GVE2

Capítulo 3

Espaciador	Cepa	Valor E	Referencia	Fago
CACGAATTTGAGCAAGTGACAATTCGTAAATAAATCA	Plásmido pGspE55-2 de <i>Geobacillus</i> sp. E55-1	5.2e-08	AP022559	GVE2
AAAAATACAAACAAGGAACAGAACAGCGTGAGTAT	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> G10	0.001	CP025535	phi OH2
TCTGCTATATGGACCCATTCGCGTCCGCCTGTGTTT	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	1.1e-08	CP002835	GVE2
GCTTCAAATCAATGTCTTTCCACTTCAAAGCTAATA	<i>Lactobacillus</i> fago phi EF-1.1	0.001	MF041990	phi EF-1.1
TTTAGCTCGGCGGTTGCGTAGTTAAGCCGCCTTGCTA	Plásmido pGspE55-2 de <i>Geobacillus</i> sp. E55-1	3.5e-04	AP022559	GVE2
CGCAACCAATGTGAGAGTCACTGCTGCAAAGACGCG	<i>Geobacillus</i> sp. Y4.1MC1	3.5e-09	CP002293	-
GTTGCAGCTCAAAGAGTTTTTGAAGATTCATTGTTA	<i>Caldibacillus</i> fago CBP1	1.6e-07	MF595878	CBP1
CACTGTATTAGAAGGGCGAGAAAGACGTTATACGATCAA	<i>Vibrio</i> fago vB_VpaS_KF4	0.021	MF754114	vB_VpaS_KF4
TATACACGATATTGTACATCCATGCTTTCCTTGTCATA	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> KCTC39	8.8e-06	CP017694	GVE2
GCGGATATTCTTTTAAAGTCAATTCTGCTTCTGCTGTGAT	<i>Anoxybacillus</i> (plásmido pBstUI51)	7e-04	CP064061	Bacter_Lily
AGGACATCGGCGACAGTGTGTCATCGGGCGGTCGATCGAT	<i>Gordonia</i> fago NosilaM	0.014	MK376962	NosilaM
CTGAATATTTTCTAACATGTGCTTTGGCAACGCTA	<i>Geobacillus</i> virus E2	1e-05	NC_009552	GVE2
AAAAACGAAGCATTCTCAAAGCCGTAGGAGAAGC	<i>Geobacillus</i> virus E2	4e-05	NC_009552	GVE2
CTGAATGTTTTCTGTCGCCAGAGCAGTCAGAGGTGTATA	<i>Geobacillus</i> virus E2	1e-06	NC_009552	GVE2
TTCCACAACCTCAATCGTTTTTGTCTTGTATCGTATCC	<i>Geobacillus</i> virus E2	0.006	NC_009552	GVE2
TTTGTTTTGCGCGCTTCAATACCATCAATAACCTCACTG	<i>Anoxybacillus</i> sp. B7M1	8e-08	CP015436.1	phi OH2
TCACGCTCGAAGAATATAAAGAAATTACAGGTGAAG	<i>Lactobacillus</i> fago vB_Lga_AB1	0.006	MW476489.1	vB_Lga_AB1
CATCATTTGATTCTCTCTGAATCAACTTTCGTTCA	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	2e-08	CP002835	GVE2
ATCTTTTAGTTTTTGCATCACAAGCACATGGCGTAA	<i>Geobacillus</i> sp. Y4.1MC1	1e-04	CP002293	-

Análisis genómico de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

Tabla suplementaria 3.2. Características de los fagos identificados con el programa Phaster en cepas de *Parageobacillus* y *Geobacillus*

Cepa	Tamaño Kb	% G+C	Fago más parecido
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	44.4	42.51	Geobac_E2
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> TNO-09.020	28.4	38.32	Clostr_phiCT9441A
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> DSM 21625	45.4	39.5	Paenib_Shelly
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> DSM 21625	41.9	40.64	Bacill_IEBH
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> W-2	46.8	41.72	Geobac_E2
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> W-2	36	37.11	Clostr_phiCT9441A
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> TG4	60.7	39.92	Thermu_OH2
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> GT23	47.2	38.65	Geobac_GBSV1
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> ZCTH02-B4	44.3	40.52	Geobac_E2
<i>Parageobacillus toebi</i> B4110	50.6	42.11	Bacter_Lily
<i>Parageobacillus caldoxylosilyticus</i> CIC9	43.5	41.29	Geobac_E2
<i>Parageobacillus caldoxylosilyticus</i> B4119	30	41.19	Geobac_E2
<i>Parageobacillus genomosp.</i> 1 NUB3621	52.1	40.92	Bacill_IEBH
<i>Parageobacillus genomosp.</i> 1 NUB3621	58.3	41.35	Thermu_OH2
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52	54.4	46.52	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61	52.7	46.25	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. JS12	33.1	46.06	Geobac_GBSV1
<i>Geobacillus</i> sp. JS12	49.4	46.63	Thermu_OH2
<i>Geobacillus</i> sp. AYS3	42.4	43.89	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. FJAT-46040	62.3	45.04	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. FJAT-46040	24.7	42.46	Paenib_PG1
<i>Geobacillus</i> sp. LEMMY01	37.9	46.69	Thermu_OH2
<i>Geobacillus</i> sp. LYN3	27.5	44.05	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. MAS1	54.3	47.14	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. MMMUD3	54.2	46.23	Deep_s_D6E
<i>Geobacillus</i> sp. MMMUD3	28.2	45.54	Bacill_WBeta
<i>Geobacillus</i> sp. MMMUD3	26.8	47.25	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. MMMUD3	29.3	49.05	Vibrio_X29
<i>Geobacillus</i> sp. MR	45.6	46.95	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. NFOSA3	52.1	40.54	Geobac_GBSV1
<i>Geobacillus</i> sp. PA-3	37.5	47.29	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. PA-3	42.6	42.25	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. Sah69	34.1	45.86	Thermu_OH2
<i>Geobacillus</i> sp. Sah69	26.5	45.07	Thermu_OH2
<i>Geobacillus</i> sp. 47C-IIb	44.1	45.19	Thermu_OH2
<i>Geobacillus</i> sp. 46C-IIa	56.2	46.45	Geobac_E2
<i>Geobacillus</i> sp. 46C-IIa	43.8	46.33	Thermu_OH2
<i>Geobacillus</i> sp. 44C	46.6	41.94	Bacter_Lily
<i>Geobacillus</i> sp. 12AMOR1	56.1	48.20	Geobac_E2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 458	44.1	46.59	Geobac_E2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DG1	61.1	49.13	Geobac_E2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> FHS-PCGT134	34.9	44.86	Thermu_OH2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> FHS-PPGT130	33.8	44.80	Thermu_OH2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> FHS-PPGT111	33.8	44.80	Thermu_OH2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> GS27	18.3	42.75	Geobac_GBSV1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> P3	40.9	46.39	Geobac_GBSV1

Capítulo 3

Cepa	Tamaño Kb	% G+C	Fago más parecido
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> A1	40.9	46.39	Geobac_GBSV1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> B4109	30.5	46.21	Geobac_E2
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> B4109	22.2	43.90	Aeriba_AP45
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	52.6	44.60	Thermu_OH2
<i>Geobacillus kaustophilus</i> NBRC 102445	50.2	47.13	Thermu_OH2
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> KCTC3902	39.9	43.10	Geobac_E2
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> KCTC3902	39.5	43.02	Bacill_1
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	61	44.86	Geobac_E2
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> ARTRW1	45.7	45.89	Thermu_OH2
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> SURF-48B	41	46.27	Geobac_E2
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> SURF-48B	38.1	48.69	Bacter_Lily
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5	45.7	45.89	Thermu_OH2
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> SGAir0734	54.3	47.04	Thermu_OH2
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> SGAir0734	40.8	45.10	Thermu_OH2
<i>Geobacillus subterraneus</i> E55-1	50.6	46.22	Deep_s_D6E
<i>Geobacillus subterraneus</i> E55-1	42.6	44.00	Geobac_E2
<i>Geobacillus subterraneus</i> CPW16	39.4	47.07	Thermu_OH2
<i>Geobacillus proteiniphilus</i> 1017	37.9	45.26	Thermu_OH2

**Análisis transcripcional de la cepa
Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a
tasas de crecimiento cercanas a cero**

4.1 Resumen

La reducida disponibilidad de nutrientes es uno de los factores limitantes que regulan el crecimiento de los microorganismos en la naturaleza. Por lo tanto, estudiar la respuesta transcripcional de los microorganismos a tasas de crecimiento cercanas a cero es de gran relevancia. Para ello se cultivó *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en un retentostato durante 21 días de modo que al final del cultivo la tasa de crecimiento específica disminuyó a 0.00047h^{-1} . Comparando crecimiento exponencial con crecimiento muy reducido, cercano a cero, se observaron un elevado número de genes que se expresan bajo condiciones de crecimiento reducido, dominando aquellos relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternativas, transportadores ABC, quimiotaxis y ensamblaje flagelar. Ello sugiere un cambio en la estrategia de crecimiento a nivel transcriptómico entre condiciones óptimas y condiciones limitantes. En general, los mecanismos de respuesta al estrés no se indujeron y se mantuvo una alta viabilidad. Las regiones repetitivas CRISPR, proteínas CAS, sistemas de dos componentes y las transposasas se sobreexpresaron a tasas de crecimiento cercanas a cero, sin embargo, el fago coexistente con la cepa 23.6 se reprime a medida que disminuye la tasa de crecimiento. Esta regulación transcripcional permite la adaptación de *P. thermoglucosidasius* 23.6 a nuevos ambientes bajo condiciones de limitación nutricional y manteniendo su viabilidad.

4.2 Introducción

Las bacterias, desde un punto de vista básico, crecen, aumentando su biomasa, y se dividen en dos células hijas. Cuando las condiciones son favorables una sola célula puede crecer exponencialmente llenando el ecosistema de forma clonal. Esta elevada capacidad de crecimiento les permite colonizar prácticamente cualquier nicho en la Tierra. Además, debido a su pequeño tamaño (en la escala de un micrómetro de diámetro) se ha considerado que carecen de limitaciones para su distribución por el planeta (Pedrós-Alió, 2012). Esta reflexión está de acuerdo con la teoría de Bass Becking “todo está en todas partes pero el ambiente selecciona” (Baas-Becking, 1934)). Aunque la consideración sobre la influencia del ambiente ha de analizarse en detalle para determinar su influencia sobre la distribución de los microorganismos.

La abundancia de los microorganismos se ve afectada por las condiciones del ecosistema siendo el resultado del equilibrio entre la tasa de crecimiento, los aportes desde otros ecosistemas y la pérdida de células o muerte celular (predación, lisis viral, factores físico-químicos, etc.) (Pedrós-Alió, 2006). Aquellos microorganismos, como las especies de los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus*, que están presentes en diversos ambientes (algunos muy alejados de sus condiciones óptimas de crecimiento) y tienen una distribución mundial (Zeigler, 2014), podrían tener posibilidades de desarrollarse bajo determinadas circunstancias lo que les permitiría persistir en ecosistemas considerados distantes de sus condiciones óptimas de crecimiento. De lo contrario, sin crecimiento (al menos, ocasional) tenderían progresivamente a desaparecer.

Capítulo 4

Uno de los factores más importantes que limita el crecimiento de los microorganismos en los ambientes naturales es la baja disponibilidad de nutrientes (substratos utilizados para el crecimiento, como fuente de energía y/o biomasa). También los factores físicos pueden limitar el crecimiento de determinadas bacterias. Un ejemplo sería la temperatura de ambiente, precipitación o contenido en agua, etc. Dependiendo de las condiciones ambientales, será posible el desarrollo, en mayor o menor medida, de unos u otros microorganismos, con consideraciones de espacio y tiempo, lo que generará la existencia y mantenimiento de una gran diversidad como consecuencia de la heterogeneidad natural existente.

La necesidad de que exista un control que regule la abundancia de las comunidades microbianas, indica que las altas tasas de crecimiento microbiano que se alcanzan en cultivos de laboratorio son poco habituales en la naturaleza. Por lo tanto, para comprender los mecanismos de respuesta bacterianos y su comportamiento en ambientes naturales (donde existen factores limitantes que regulan su crecimiento) sería de gran relevancia estudiar las respuestas fisiológicas de los microorganismos a tasas de crecimiento reducidas que representa un aspecto complejo aún por explorar en la Microbiología moderna.

Tradicionalmente, las respuestas fisiológicas y moleculares de los microorganismos en condiciones que originan tasas de crecimiento bajas (como consecuencia de la limitación por nutrientes o de otros factores adversos) se han estudiado en cultivos discontinuos, concretamente durante la rápida transición entre la fase logarítmica de crecimiento y la fase estacionaria. La inanición inducida durante esta fase del cultivo (fase estacionaria de crecimiento) va acompañada de cambios en las condiciones del cultivo, debido a concentraciones

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

crecientes de productos finales, cambios en el pH, acumulación de células muertas, etc. (Finkel, 2006). En consecuencia, es complicado discernir los efectos generados por el agotamiento de nutrientes de los generados por los cambios en la condiciones del cultivo y resulta difícil evaluar la tasa de crecimiento real en esas situaciones de cambio (paso de fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria).

El crecimiento cero se considera un estado en el que los microorganismos utilizan todos los nutrientes obtenidos para mantener su status, y por tanto, no se produce aumento de su biomasa (i.e., no hay crecimiento ni en biomasa ni en número de células). Así, una bacteria viable, activa metabólicamente, puede carecer de nutrientes para la formación de biomasa propia, pero puede obtener suficientes para su mantenimiento o para garantizar su presencia y/o actividad en el ecosistema. Este fenómeno es fundamentalmente diferente de la inanición o inhibición por productos metabólicos que acontece durante la fase estacionaria de crecimiento (van Verseveld et al., 1984).

El cultivo de retentostato proporciona una forma alternativa de estudiar el crecimiento de los microorganismos a tasas de crecimiento muy reducidas, gracias a la limitación progresiva del crecimiento por escasez de nutrientes. El retentostato representa una adaptación del cultivo en quimiostato (cultivo continuo) donde se retiene la biomasa en el bioreactor y se elimina el medio ya utilizado a través de un sistema de filtración tangencial (van Verseveld et al., 1986). En un retentostato, al permanecer constante el flujo de nutrientes, con el tiempo, la disponibilidad de nutrientes por célula decrece progresivamente, conduciendo a tasas de crecimiento muy reducidas que pueden aproximarse a cero o un estado de actividad de mantenimiento celular (Boender et al., 2009;

Capítulo 4

Goffin et al., 2010; Ercan et al., 2013; Overkamp et al., 2015; van Mastrigt et al., 2018)

En este estudio proponemos el análisis de la expresión génica de termófilos aislados de suelos, en concreto, utilizaremos como cepa modelo a *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6.

Todas las especies de *Geobacillus* y *Parageobacillus* han sido catalogadas como quimiorganotrófos termófilos obligados. El rango de temperatura y pH óptimo de crecimiento en cultivos se encuentra entre 50 y 60° C y de 6.2 a 7.5 respectivamente. Son aerobios o anaerobios facultativos y el oxígeno es el aceptor final de electrones aunque en algunas especies puede ser sustituido por el nitrato. Las cepas crecen en medios ricos con sustratos complejos (por ejemplo, extracto de levadura y peptona) y en general no requieren factores de crecimiento adicionales (Nazina et al., 2001).

Al ser bacterias Gram-positivas tienen la capacidad de formar una endospora terminal, aunque distintas cepas aisladas del suelo (Marchant et al., 2002) han sido sometidas a una gran variedad de condiciones (alta temperatura, escasez de nutrientes, etc.) y no se ha observado el desarrollo de esporas.

En condiciones óptimas y controladas de laboratorio *Geobacillus* y *Parageobacillus* alcanzan tasas de crecimiento muy altas a través de la rápida absorción del sustrato (Pavlostathis et al., 2006). Por ejemplo la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6, empleada en este estudio, presenta una tasa de duplicación de 18 minutos (crecimiento óptimo) durante la fase exponencial de crecimiento en el laboratorio. Y en esas condiciones óptimas, al agotarse los nutrientes y alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, se observa en los cultivos un descenso brusco de la abundancia celular cuya causa sería

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

interesante determinar. Este hecho ha sido mencionado por varios autores. Por ejemplo, Pavlostathis et al. (2006) observaron una lisis celular rápida, extensa e irreversible en *Geobacillus thermoleovorans* cuando se empiezan a agotar los nutrientes y establecen una relación directa entre el alcance de la lisis y las tasas de crecimiento (a mayor velocidad de crecimiento mayor mortalidad). Por comparación con otras especies bacterianas, el agotamiento de nutrientes parece no ser la causa principal de ese descenso drástico en el número de células. Como apuntaremos más adelante, este descenso brusco de la abundancia celular pudiera ser consecuencia de la acción lítica de bacteriófagos (capítulo 3).

Otras característica de estos géneros microbianos termófilos es su excelente adaptación ambiental ya que se han aislado de una gran diversidad de nichos (Suzuki, 2018) y generalmente presentan características relacionadas con los hábitats donde han sido aislados: *Geobacillus* sp. ASR4 aislado de suelos enriquecidos en arsénico muestra resistencia a este elemento (Das et al., 2014); *Parageobacillus thermoglucosidaius* 23.6 aislado en suelos arenosos (baja disponibilidad de agua) secreta enzimas extracelulares que tienen su máxima actividad enzimática a baja disponibilidad de agua (Gómez et al., 2021) y presentan una elevada persistencia en suelos (Gómez et al., 2020); *Geobacillus* aislados en la industria lechera a menudo utilizan lactosa como fuente de carbono (Burgess et al., 2017); *Geobacillus thermodenitrificans* OS27 degrada polisacáridos específicos de la superficie del alga marina de la que se aisló (Fujii et al., 2018).

Se ha sugerido que el motor principal que promueve la adaptación ambiental de los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus* podría ser la diversificación genómica resultante de fenómenos de transferencia horizontal de genes (Esin et al., 2018),

Capítulo 4

actividad de elementos transponibles y mutagénesis inducida por estrés ambiental (Suzuki et al., 2018).

La comunidad científica siempre ha mostrado un gran interés en el estudio de estos géneros debido a su gran potencial biotecnológico, principalmente basado en la búsqueda de enzimas termoestables y la generación de variantes enzimáticas mediante mutagénesis inducida por estrés de estas enzimas termoestables (Suzuki, 2018).

El transcriptoma es el análisis global a nivel celular basado en la secuenciación de las moléculas de ácido ribonucleico (ARN) expresadas en unas condiciones determinadas (Wang et al., 2009).

La transcriptómica ha tenido su auge como consecuencia de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS). Otros métodos para el estudio de la transcriptómica incluyen el uso de microarrays, por ejemplo. Hoy en día, las técnicas NGS de secuenciación de ARN (i.e., ARN-seq de la plataforma Illumina) constituyen un gran avance para el estudio transcriptómico de células bacterianas. En estos estudios un problema importante es la gran abundancia de ARN ribosómico existente en el transcriptoma de toda célula bacteriana (alrededor del 90% del ARN total, Giannoukos et al., 2012). Este ARN ribosómico conviene eliminarlo o reducirlo para facilitar la secuenciación de los ARN mensajeros (mRNA) correspondientes a los genes que codifican proteínas. La información obtenida por el secuenciador ha de ser filtrada para eliminar la posible detección de nucleótidos con una baja fiabilidad o calidad. Posteriormente, las lecturas obtenidas han de ser mapeadas al genoma de referencia para un estudio pormenorizado de los genes que son expresados. Es imprescindible llevar a cabo un análisis comparativo entre distintos tratamientos o situaciones

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

experimentales para poder determinar la activación o inhibición de los genes del organismo en estudio bajo las condiciones estudiadas.

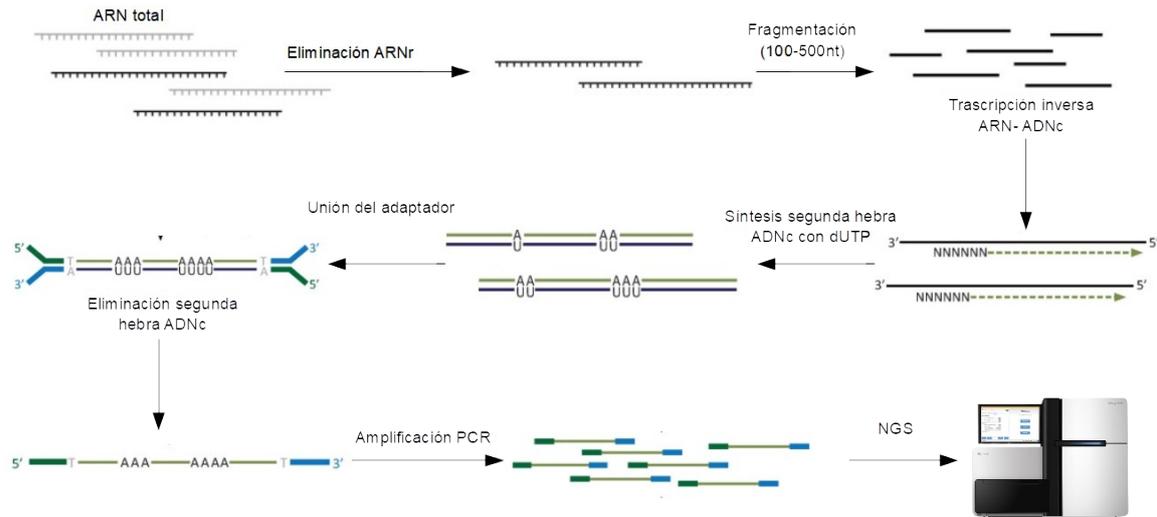


Figura 4.1. Esquema de la secuenciación del ARN utilizando tecnologías de NGS.

RNA-seq ofrece varias ventajas con respecto a las técnicas de hibridación (Wang et al., 2009), entre las más importantes cabe destacar que es un método muy sensible (resolución de una sola base), no requiere concentraciones altas de ARN, no tiene problemas de saturación y no es imprescindible conocer la secuencia genómica, aunque la disponibilidad del genoma facilita el análisis de datos transcriptómicos.

La referencia taxonómica más próxima al género *Geobacillus* y *Parageobacillus* en la que se ha estudiado la respuesta transcriptómica durante un cultivo en retentostato es *Bacillus subtilis* (Overkamp et al., 2015). Aunque se trata de un microorganismo mesófilo, estos géneros pertenecen a la misma familia y comparten muchos genes, en concreto gran parte de aquellos relacionados con el

Capítulo 4

metabolismo central (Bezuidt et al., 2016) y regulación de la esporulación, por lo que puede ser una buena aproximación para comparaciones con la cepa 23.6.

Este estudio (Overkamp et al., 2015) con *Bacillus subtilis* revela que el cultivo con retentostato tiene similitudes de expresión con cultivos en fase estacionaria. Las principales diferencias se observan en una disminución en la expresión de sistemas involucrados en la reparación de ADN y proteínas indicando que no hay deterioro de las funciones celulares. Debido a esto disminuye la mutagénesis causada por estrés ambiental, típica de la fase estacionaria (Overkamp et al., 2015).

En general durante el cultivo en retentostato de *Bacillus subtilis* hay un mayor número de genes que se reprimen en comparación a los que se activan. Esto puede deberse a que utilizan como referencia el estado de quimiostato que en este caso está configurado a una tasa de crecimiento baja (Overkamp et al., 2015) en lugar de llevar a cabo las comparaciones con fase exponencial en condiciones óptimas de crecimiento.

Previamente, hemos implementado el cultivo de retentostato para el crecimiento de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 y hemos demostrado que se podía alcanzar una tasa de crecimiento específica de $0,00056 \text{ h}^{-1}$ y $0,00093 \text{ h}^{-1}$ mientras las células permanecían viables (Capítulo 2). El objetivo de este estudio es investigar la respuesta transcripcional de la cepa 23.6 a tasas de crecimiento específicas muy reducidas, condiciones que se han dado en llamar de crecimiento cercano a cero (Overkamp et al., 2015). Hemos analizado el transcriptoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en un retentostato a tasas de crecimiento específico mínimo y lo comparamos con células de esta cepa en fase exponencial de crecimiento (en condiciones óptimas) y en quimiostato.

4.3. Materiales y métodos.

4.3.1 Quimiostato y retentostato

Antes de comenzar con el cultivo en el bioreactor, se prepararon precultivos de la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 inoculando una única colonia de una placa de agar nutritivo NB (composición por litro: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 15 g de agar) en 20 ml de medio de cultivo NB líquido y se incubó a 60° C durante toda la noche. A la mañana siguiente se traspasaron 0,5 ml del cultivo ya crecido a un matraz con 50 ml de NB y se incubó a 60° C hasta alcanzar la fase exponencial. Este es el cultivo que se utilizó como inóculo para un biorreactor. Durante el cultivo en los biorreactores el pH se mantuvo a 7.0 mediante la adición automática de ácido clorhídrico 0,1 M. La formación de espuma se evitó añadiendo 1 ml del agente antiespumante (Xiameter ACP-1500, The Dow Chemical Company, Michigan, EEUU) cada 12 horas.

En los experimentos anteriores (capítulo 2) de quimiostato y retentostato utilizamos medio NB diluido 5 veces. Sin embargo, para obtener una mayor cantidad de biomasa y así poder extraer ARN de calidad y en cantidad, se repitió el experimento utilizando como medio de cultivo NB sin diluir (composición por litro: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona)

Se repitió un cultivo de quimiostato a una tasa de dilución de 0,025 h⁻¹. El bioreactor se hizo funcionar a 60° C en condiciones aeróbicas con un caudal de aire de 3 l.min⁻¹ y una velocidad de agitación de 500 r.p.m.

Capítulo 4

El estado de las células en modo quimiostato se consideraba que alcanzaban su equilibrio al cumplir la condición en la que los parámetros de cultivo (densidad óptica a 600 nm, DO600) eran constantes durante al menos 2 cambios del volumen de trabajo.

Después de alcanzar el estado estable en el quimiostato, el bioreactor se cambió al modo retentostato, haciendo pasar el cultivo a través del sistema de filtración tangencial para retener la biomasa y eliminar el sobrenadante. El cultivo de retentostato se hizo funcionar en las mismas condiciones (temperatura, pH, caudal medio, oxigenación, velocidad de agitación, adición antiespumante) que el quimiostato.

Todas las medidas y cálculos llevadas a cabo para la monitorización del experimento y el análisis de las muestras (biomasa, viabilidad, UFC, número de células, biovolumen, tasa de crecimiento específica, etc.) se han realizado de la misma manera que en los procedimientos descritos en el capítulo 2.2.3.

Cabe destacar que el aumento de biomasa generado en el bioreactor por la utilización del medio NB mas concentrado provocó que el biofilm que se desarrolló en la pared del bioreactor durante la fase de retentostato fuese de mayor tamaño. Al cabo de los 21 días de experimento parte del biofilm se desprendió de la pared superior del reactor al cultivo generando grumos que ocasionaron una obstrucción del sistema de filtración los que obligó a concluir el experimento.

Por lo tanto, se tomaron un total de 7 muestras a lo largo del tiempo: Exponencial (Exp), T0 = quimiostato, T1= 2 días, T2= 4 días, T3 = 7 días, T4= 14 días y T5= 21 días. También se cogieron muestras (1ml) durante el periodo de estabilización del quimiostato (T0.1, T0.2, T0.3).

4.3.2. Análisis transcriptómicos

Para el aislamiento de ARN, 2 ml de las muestras exponencial, T0, T3 y T5 se centrifugaron durante 5 min a 6000 rpm y 4° C, se eliminaron los sobrenadantes y se congelaron las células a -80° C. Cada muestra se hizo por triplicado.

Para favorecer la lisis celular y aumentar la cantidad de ARN extraído de las muestras, las células se trataron previamente con una solución de lisozima (1 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el ARN de las muestra se obtuvo con el kit de extracción ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep (Zymo research, Irvine, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación del ARN de cada muestra se realizó utilizando la plataforma Illumina Hiseq en BGI Genomic (Hong Kong, China). Se generaron secuencias bidireccionales de 150 bases con una media de 95 millones de lecturas por muestra.

El análisis de ARN-seq se llevó a cabo siguiendo el protocolo de análisis bioinformático descrito por Pertea et al. (2016). El genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 (número de acceso en GenBank: CP063414), que nosotros hemos secuenciado (capítulo 3), se utilizó como referencia para el análisis de las lecturas obtenidas por secuenciación a partir de las muestras Exp, T0, T3 y T5 con sus respectivas réplicas. El esquema de análisis se muestra en la figura 4.2. Se utilizaron dos muestras como referencia para ver las diferencias de expresión entre altas y bajas tasas de crecimiento, exponencial y T0 (quimiostato), para comparar la diferencia de expresión entre velocidades de crecimiento baja y tasas de crecimiento cercana a cero (T5).

Capítulo 4

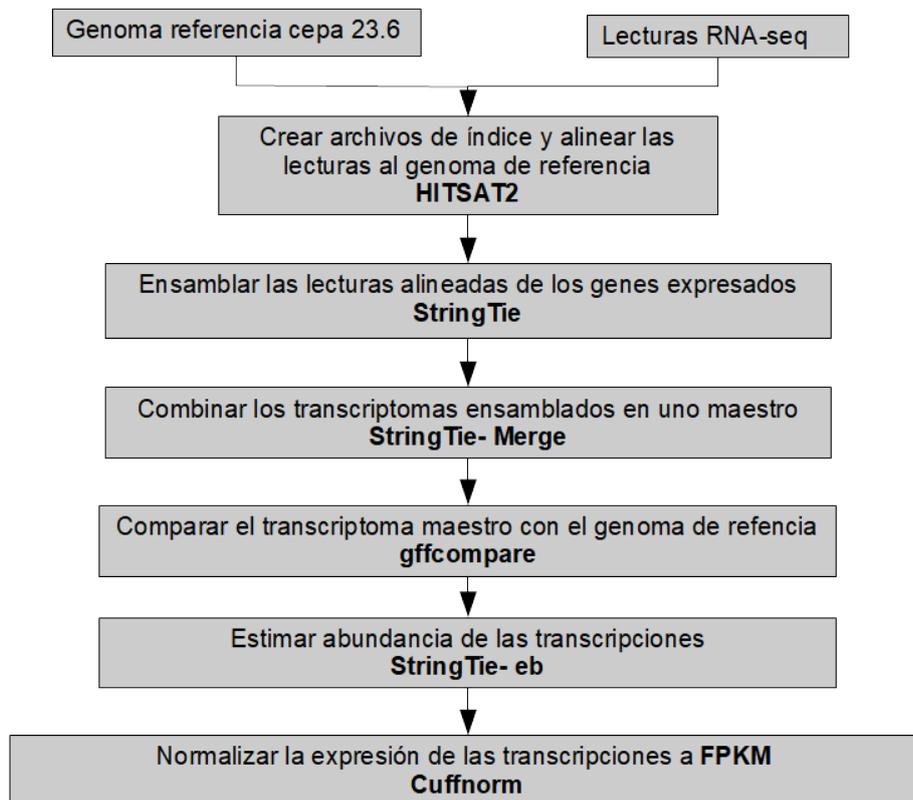


Figura 4.2. Esquema modificado del análisis de ARN-seq (Pertea et al., 2016)

Al final del análisis se obtiene un tabla con los valores de expresión de los genes anotados normalizados en fragmentos por kilobase de transcripción por millón de fragmentos mapeados (FPKM).

La significación entre las muestras se calculó mediante un test de comparación por pares basados en un cálculo de intervalo de confianza (Sokal y Rohlf, 2011), pudiendo diferenciar entre genes reprimidos (inhibidos o cuya expresión se redujo), sobreexpresados (activados o con mayor expresión en las condiciones analizadas) y constitutivos (aquellos que no muestran diferencias entre las

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

condiciones estudiadas). En este sentido, el término constitutivo se emplea, para simplificar, con un significado ligeramente diferente al habitual. En este estudio, expresaremos como constitutivos a aquellos genes que no muestran diferencias entre las distintas condiciones experimentales (independientemente de si su nivel de expresión es elevado o nulo) a diferencia de su uso habitual que representa a aquellos genes cuyo nivel de expresión se mantiene constante y significativo independientemente del tratamiento sometido a las células.

Los genes y sus valores de expresión se agruparon en función de su categoría COG (capítulo 3).

4.4. Resultados

Aumentar la concentración del medio solo influyó en la concentración de biomasa ya que los resultados de este experimento son muy similares a los descritos en el capítulo 2 (Figura 4.3).

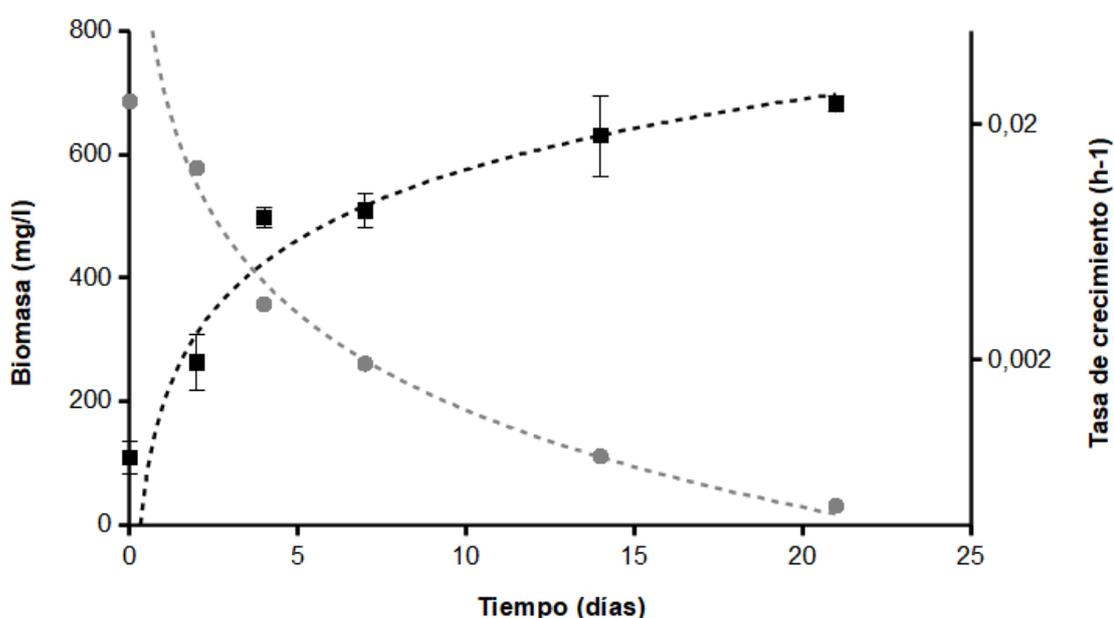


Figura 4.3. Crecimiento de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en un retentostato durante los experimentos llevados a cabo en este estudio. Evolución de la concentración de biomasa (cuadrados negros) y de la tasa de crecimiento específica (círculos grises) a lo largo del tiempo.

Durante el cultivo en retentostato la tasa de crecimiento específica disminuyó a un mínimo de 0,00047, correspondiente a un tiempo de duplicación de 60 días. La

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

viabilidad se mantuvo a un 98% y se volvió a observar la morfología filamentosa de algunas células.

Debido a que el volumen de muestreo es limitado y la concentración de ARN por célula disminuye a tiempos de duplicación mas altos (Figura 4.4), el aumento de biomasa en el bioreactor nos permitió extraer una cantidad de ARN aceptable para estudiar la respuesta transcripcional de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a tasas de crecimiento específicas cercanas a cero. La cantidad requerida de ARN para su procesamiento en RNA-Seq era alrededor de 1 µg de ARN total.

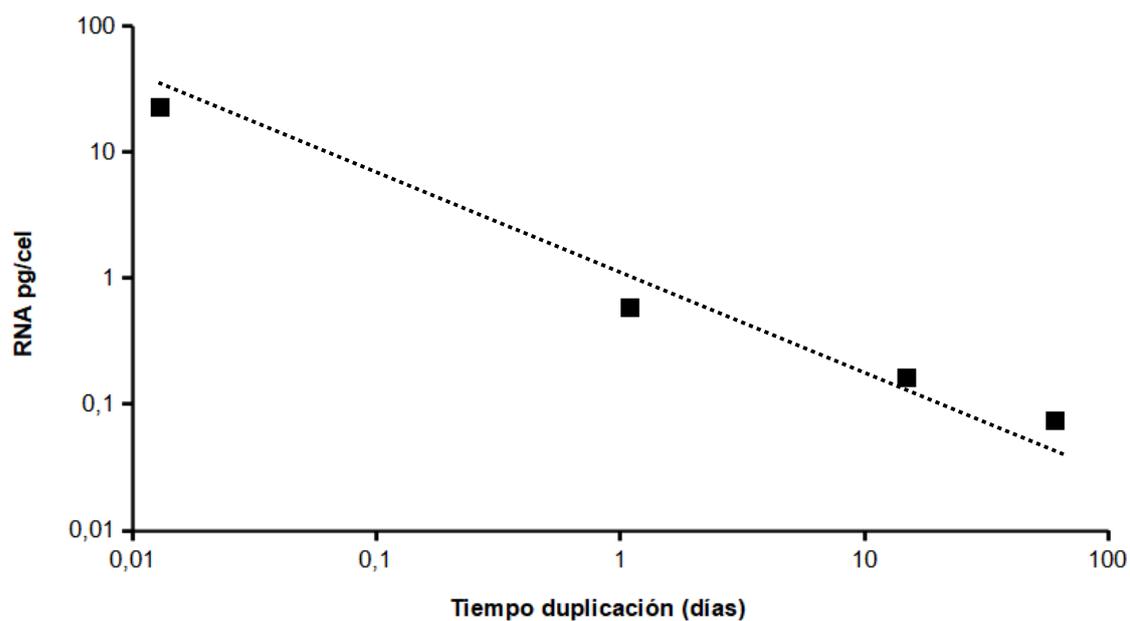


Figura 4.4. Relación de la concentración de ARN por célula a diferentes tiempos de duplicación.

4.4.1. Análisis del transcriptoma

Para el análisis del transcriptoma seleccionamos 4 tiempos del cultivo de retentostato que se corresponden con tasas de crecimiento descendentes (de mayor a menor: Exp, T0, T3 y T5), utilizando las células en fase exponencial de crecimiento (Exp) ($\mu = 2,22 \text{ h}^{-1}$) y en quimiostato (T0; $\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$) como referencias.

Si tomamos como referencia la expresión transcripcional durante el crecimiento exponencial, encontramos que aproximadamente el 76,7% de los genes se expresaban diferencialmente al final del cultivo de retentostato (la cantidad de genes regulados en los diferentes tiempos se encuentran en la Tabla 4.1). En general a tasas de crecimiento bajas existen mas genes sobreexpresados que reprimidos, siendo en quimiostato donde mayor diferencia encontramos (900 genes mas). A medida que disminuye la tasa de crecimiento el número de genes que se reprimen va aumentando a diferencia de los genes constitutivos.

Tabla 4.1. Descripción general comparativa del número de genes en los que se observan diferencias en sus niveles de expresión a distintas tasas de crecimiento

Tiempo	Tasa de crecimiento h^{-1}	Número de genes regulados significativamente			Nivel constante de expresión
		Total	Reprimidos	Sobreexpresados	
Exp	2,22	N/A Condición de referencia			
T0	0,025	2919	1002	1917	1276
T3	0,0019	3059	1394	1665	1136
T5	0,00047	3219	1556	1663	976
T0	0,025	N/A Condición de referencia			
T3	0,0019	1928	1286	642	2267
T5	0,00047	2715	1753	962	1480

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Por el contrario si tomamos como referencia la expresión transcripcional del crecimiento en quimiostato, observamos que al final del cultivo en retentostato el 64,7% de los genes muestran diferencias significativas de expresión. Un total de 1753 genes muestran una disminución relativa de ARN mientras 962 aumentan su nivel de expresión. Destacar que el 35% de los genes no tiene diferencias significativas de expresión y son considerados, en este estudio, como genes constitutivos.

Para tener una visión mas detallada de la respuesta transcripcional a las diferentes tasas de crecimiento se ha hecho un análisis de los datos sobre categorías funcionales COG.

Al comparar la expresión diferencial de las categorías COG tomando como referencia la tasa de crecimiento exponencial (Figura 4.5) observamos que en la mayoría de los COGs, entre el 40 y 60 % de los genes están sobreexpresados cuando la velocidad de crecimiento disminuye. Las barras en rojo muestran las categorías COG que se ven fuertemente reprimidas conforme disminuye la velocidad de crecimiento. En quimiostato ($\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$) son: transporte y metabolismo de nucleótidos (F); transporte y metabolismo de coenzimas (H); traducción, estructura ribosómica y biogénesis (J) y tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (U). Cuando la tasa de crecimiento es cercana a cero ($\mu = 0,00047 \text{ h}^{-1}$) se suman las categorías: control del ciclo celular, división celular y partición cromosómica (D); replicación, recombinación y reparación (L) y biogénesis de la membrana y pared celular (M).

Los grupos COGs inducidos más prominentemente por condiciones de crecimiento cercano a cero están involucrados en: producción y conversión de energía (C); transporte y metabolismo de carbohidratos (G); transporte y metabolismo de lípidos (I); Transcripción (K); movilidad celular (N); metabolismo y

Capítulo 4

transporte de iones inorgánicos (P) y biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios (Q)

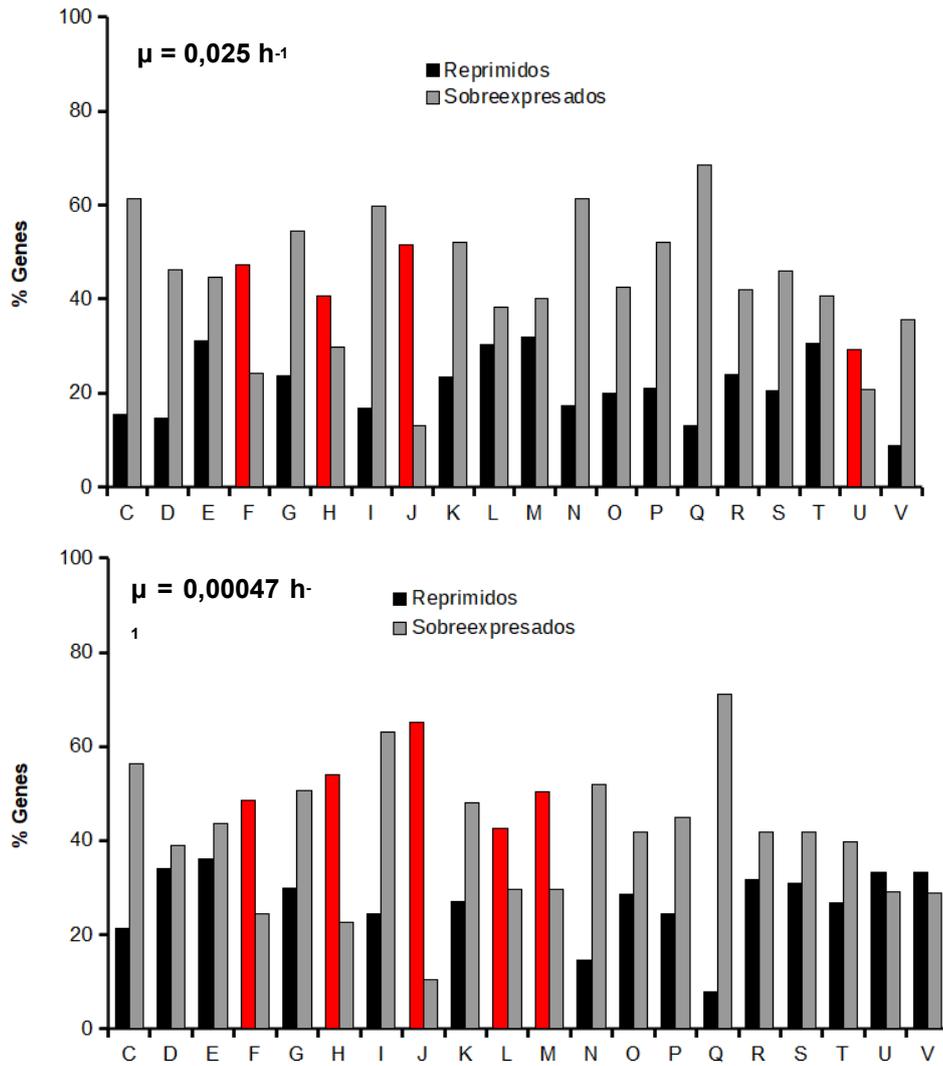


Figura 4.5. Porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados a las tasas de crecimiento $\mu = 0.025$ y $\mu = 0.00047$, en cada categoría COG tomando como referencia el crecimiento exponencial. Las barras en rojo representan las categorías COG con mas genes reprimidos que sobreexpresados.

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Por otro lado si comparamos la expresión diferencial de las categorías COG tomando como referencia el estado de quimiostato, donde la tasa de crecimiento es baja ($\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$), vemos que la respuesta transcripcional general de los genes en la mayoría de los COGs es la represión (Figura 4.6). Sólo los grupos (barras rojas): producción y conversión de energía (C); transporte y metabolismo de aminoácidos (E); transporte y metabolismo de lípidos (I) y biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios (Q), observamos mas genes sobreexpresados que reprimidos.

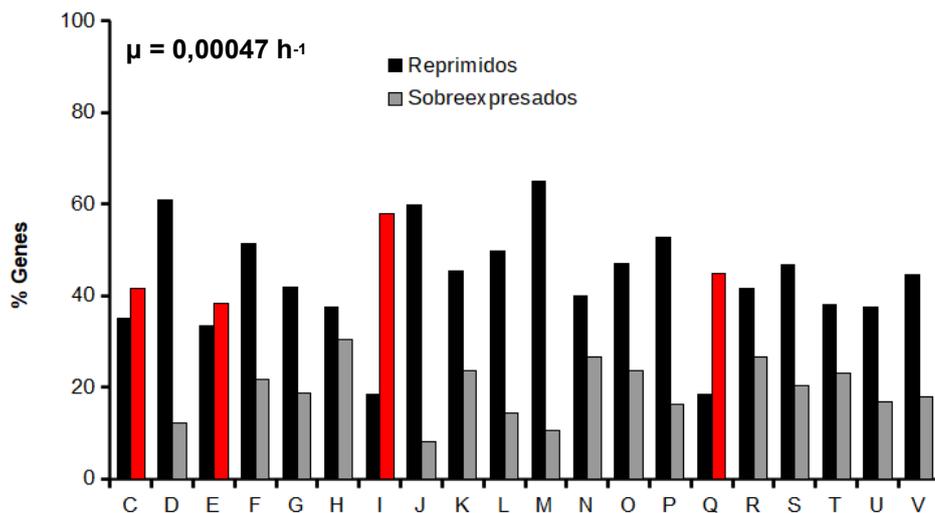


Figura 4.6. Porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados a la tasa de crecimiento $\mu = 0.00047$ en cada categoría COG tomando como referencia el crecimiento en quimiostato. Las barras en rojo representan las categorías COG con mas genes sobreexpresados que reprimidos.

Las diferencias significativas en la expresión de los genes pueden variar entre una velocidad de crecimiento u otra. Sólo hay 238 genes en los que la expresión de ARN aumenta o disminuye progresivamente a medida que la tasa de crecimiento

Capítulo 4

se acerca a cero. El 74 % de estos genes tienden a sobreexpresarse mientras que un 26 % lo hacen reprimiéndose. Los grupos COGs J, L y M albergan un gran número de genes que se reprimen progresivamente (Figura 4.7). Estos genes están relacionados con la replicación y división celular. En contra posición, el mayor número de genes sobreexpresados se localiza en los grupos C, E e I que funcionalmente están relacionados con el catabolismo y conversión de energía.

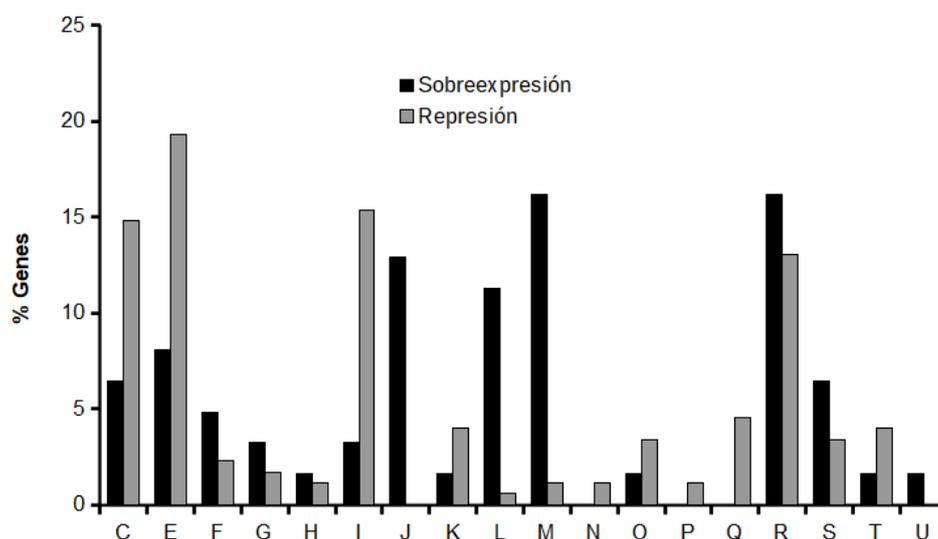


Figura 4.7. Porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados progresivamente en cada categoría COG.

4.4.2. Regulación transcripcional de las rutas metabólicas generales.

Un cultivo de retentostato está constantemente limitado por nutrientes. El análisis del transcriptoma muestra una relación entre las rutas metabólicas generadoras de energía y el acceso limitante a los nutrientes. Esto se ilustra con la represión de los genes involucrados en las rutas metabólicas de obtención de energía mas directa, glucólisis y ciclo de las pentosas fosfatos y una sobreexpresión de otras rutas de obtención de energía alternativas: degradación de ácidos grasos, degradación de compuestos aromáticos y degradación de aminoácidos ramificados (Figura 4.8). Las rutas centrales de producción de energía (ciclo de los ácidos tricarboxílicos y fosforilación oxidativa) están ligeramente sobreexpresadas con respecto a la fase exponencial exceptuando la transcripción de ATPasas que se reprime, aunque los valores de expresión son elevados.

Durante el cultivo en retentostato los transportadores ABC (transportan una amplia variedad de sustratos con gasto energético, ATP) tiene una regulación diferencial, la tendencia general es la sobreexpresión, como ocurre en los encargados de transportar azúcares, inositol fosfato, glutamato, aspartato, aminoácidos ramificados, zinc, cobalto, nickel y biotina. Por el contrario, los transportadores de glicerol 3 fosfato, nucleósidos, fosfato, cisteína, arginina, D-metionina, urea y oligopéptidos se reprimen.

Capítulo 4

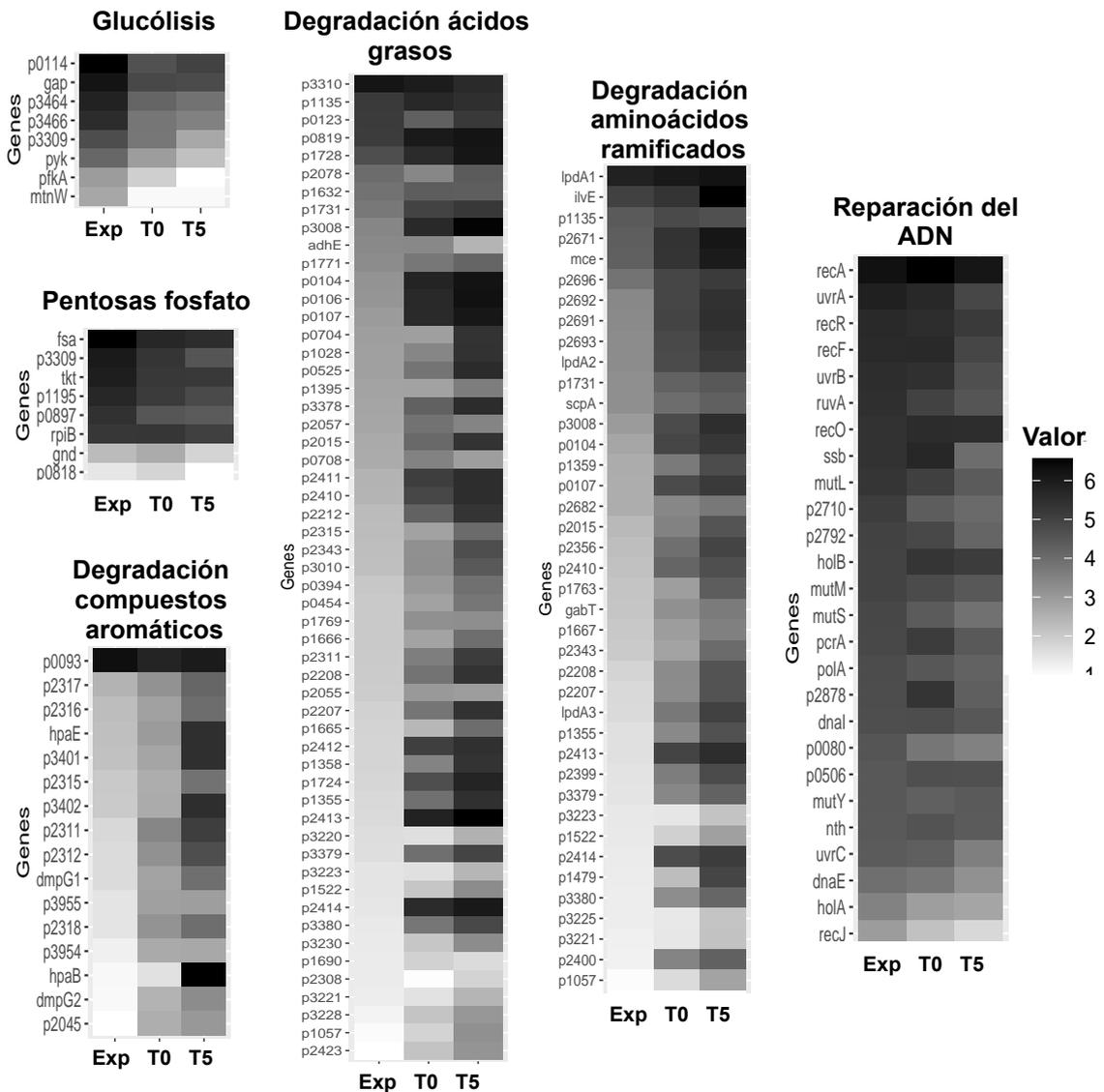


Figura 4.8. Regulación transcripcional de rutas metabólicas generales a diferentes tasas de crecimiento (exponencial, quimiostato y retentostato). Se muestran los niveles de expresión relativa de cada gen. Las indicaciones de color son negro para una mayor expresión y blanco para una expresión más reducida (menor nivel de expresión).

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Otra de las respuestas destacadas de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a la escasez de nutrientes es la activación de los genes involucrados en quimiostasis (es el movimiento de las células en respuesta a un estímulo químico) y el ensamblaje flagelar. Los principales reguladores de ambos procesos, *cheA* (p1258), *rpoD*, *rpoN* (p3470) y *fliA* (p1262) aumentan su expresión relativa a tasas de crecimiento cercanas a cero. Ambos procesos están relacionados ya que la activación de la quimiostasis induce el movimiento del flagelo, mejorando la capacidad de la bacteria para desplazarse a zonas con mayor concentración de nutrientes.

Durante el cultivo en retentostato la tasa de crecimiento se ha reducido cuatro órdenes de magnitud, este hecho se manifiesta en la represión de los genes cuyos productos están involucrados en procesos típicos de células en crecimiento: replicación del ADN, transcripción, traducción, síntesis de aminoácidos, síntesis de peptidoglicano (pared celular) y división celular.

No se ha encontrado evidencia de inducción de la respuesta al estrés general, como puede ser la respuesta SOS y las especies reactivas de oxígeno. *lexA* es un represor transcripcional de genes involucrados en la reparación del ADN y está sobreexpresado a tasas de crecimiento cercanas a cero reprimiendo los sistemas de reparación del ADN (Figura 4.9). Por otro lado, las superóxido dismutasas y la peroxidasa se reprimen con respecto al crecimiento exponencial.

4.4.3. Regulación transcripcional de las rutas secundarias

Como se describió en el capítulo 3, *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 tiene un gran número de genes anotados como transposasas, elementos genéticos móviles que tienen un papel importante en la plasticidad del genoma y la adaptación del huésped. Los datos del transcriptoma nos revelan una sobreexpresión de las transposasas a tasas de crecimiento cercanas a cero (Figura 4.9), indicando que en condiciones de estrés la célula activa la diversificación del genoma supuestamente para una mayor flexibilidad de su adaptación ambiental.

Quorum sensing (QS) es un proceso de comunicación célula-célula que permite a las bacterias compartir información sobre la densidad celular y ajustar la expresión génica en consecuencia. Los procesos controlados por QS incluyen bioluminiscencia, esporulación, competencia, producción de antibióticos, formación de biopelículas y secreción del factor de virulencia. En los datos de transcriptómica se observa una sobreexpresión de los genes de QS y a su vez una sobreexpresión de genes involucrados en la producción de biopelículas, competencia e inmunidad por lantibióticos (sistemas de dos componentes) (Figura 4.9). Además esta cepa tiene un gen sobreexpresado a tasas de crecimiento bajo que degrada lactonas de acil-homoserina, moléculas que utilizan las bacterias Gram negativas para comunicarse. En estas condiciones la cepa 23.6 inhibiría el QS de bacterias Gram-negativas.

Análisis transcripcional de *Parageobacillus thermoglucosidarius* 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

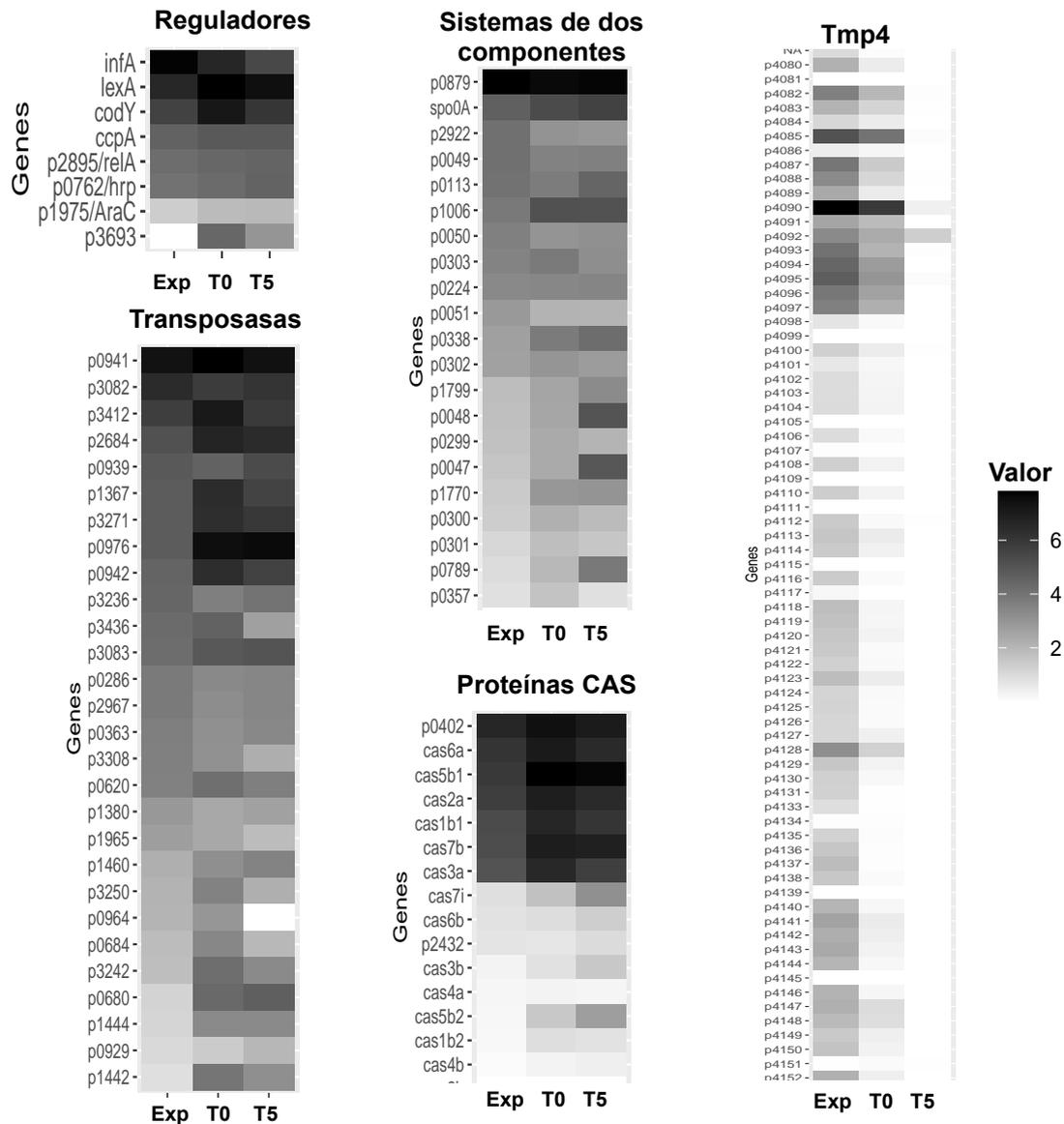


Figura 4.9. Regulación transcripcional de rutas secundarias y Tmp4 a diferentes tasas de crecimiento (exponencial, quimiostato y retentostato). Se muestran los niveles de expresión relativa de cada gen. Las indicaciones de color son negro para una mayor expresión y blanco para una expresión más reducida (menor nivel de expresión).

Capítulo 4

spo0A es el principal gen regulador de la esporulación junto con *sigF* y *sigH*, estos genes están sobreexpresados a tasas de crecimiento baja. Destacar que aunque estos genes involucrados en la esporulación están sobreexpresados, durante el experimento no detectamos formación de esporas. Esto se debe a que genes de esporulación que no son dependientes de *sigF* (*spolIE*, *spolIGA*, *sigE*) y *sigH* (*spo0H*) están reprimidos. Además, otros genes también experimentan una represión incluso muchos presentan valores muy bajos de expresión.

Las proteínas CAS, entre otras funciones, son las encargadas de procesar las regiones repetitivas CRISPR generando ARN de interferencia cortos (crRNA). La limitación nutricional en el retentostato activa la expresión de las proteínas CAS (Figura 4.9), aumentando la “inmunidad” contra los fagos que presentan homología (Tabla suplementaria 2.1)

4.4.4. Análisis transcripcional de Tmp2, Tmp3 y Tmp4.

La cepa 23.6 además del genoma principal (Tmp1) consta de tres moléculas de ADN de doble cadena (capítulo 3): Tmp2, Tmp3 y Tmp4 (identificado como el genoma de un fago), que se ven reguladas transcripcionalmente a medida que disminuye la tasa de crecimiento (Figura 4.10). En esta ocasión solo vamos a tomar como referencia el crecimiento exponencial ya que las diferencias son altamente significativas.

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

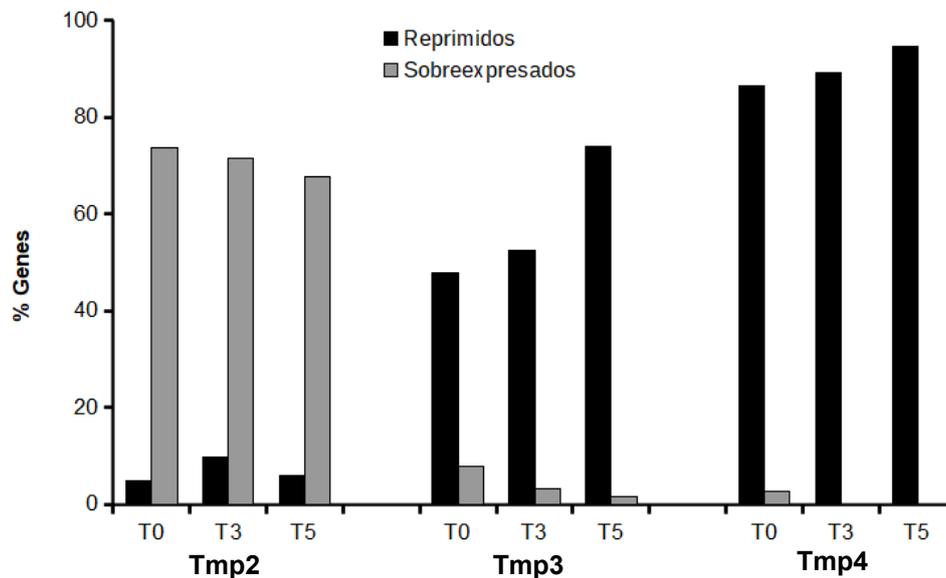


Figura 4.10. Porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados en Tmp2, Tmp3 y Tmp4 utilizando como referencia el crecimiento exponencial.

Tmp2 es un plásmido con unas características muy similares al genoma principal (capítulo 3), algo que también se observa en los resultados de transcriptómica ya que al disminuir la tasa de crecimiento más del 70% de los genes se sobreexpresan.

En el caso de Tmp3 se observa un efecto contrario a Tmp2, la represión génica es la regulación dominante cuando la tasa de crecimiento se acerca a cero (74% de los genes). Recordamos que Tmp3 es una molécula de ADN muy diferente al resto y alberga un elemento integrativo y conjugativo en su secuencia (COG L y U) (capítulo 3). Los genes de Tmp1, categorizados en los grupos COGs L y U, también se reprimen a tasas de crecimiento cercanas a cero (Figura 4.5), en

Capítulo 4

concreto el gen *secY* junto con otros que forman parte del sistema de secreción están regulados negativamente, indicando que este tipo de funciones están activas principalmente durante el crecimiento exponencial.

Tmp4 muestra una regulación muy fuerte cuando disminuye la velocidad de crecimiento. Desde quimiostato más del 85% de sus genes están reprimidos, alcanzando un valor de casi el 100 % al final del experimento (Figura 4.9).

En el capítulo 3 se describe que 11 espaciadores CRISPR localizados en Tmp1 tienen una homología significativa con la secuencia de ADN de Tmp4, algunos muestran coincidencia con genes y otros con espacios intergénicos (Figura 4.11).

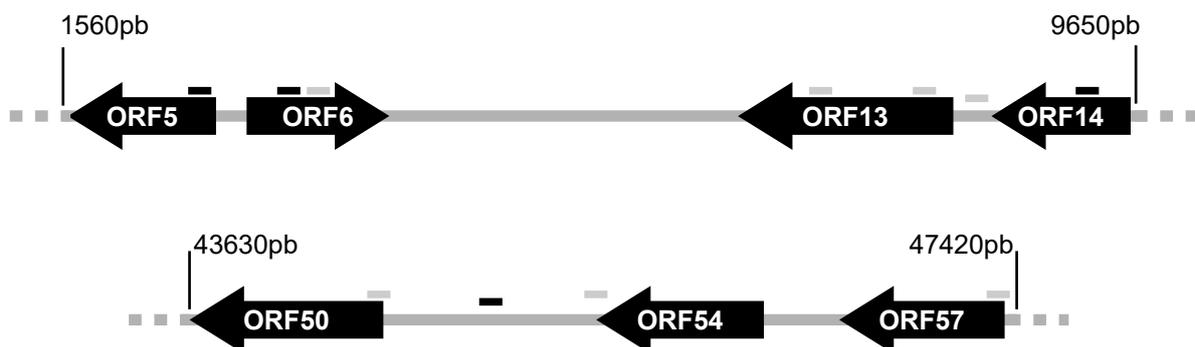


Figura 4.11. Representación de los 11 espaciadores (líneas pequeñas) de secuencias CRISPR de Tmp1 que presentan homología con Tmp4. Líneas negras homología del 100% y líneas grises difiere en alguna base.

Los datos de transcriptómica no muestra la expresión de las zonas repetitivas (CRISPR). Para saber si estas zonas se están expresando y si hay diferencias entre las diferentes tasas de crecimiento, hemos buscado en los archivos de lecturas generados de la secuenciación los espaciadores que difieren en alguna base (color gris) con la secuencia de Tmp4. Se han utilizado estos espaciadores

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

para evitar falsos positivos en el recuento de lecturas procedentes de la molécula Tmp4. Las secuencias repetitivas de los CRISPR se han utilizado como control ya que no presentan homología con Tmp4 (Figura 4.12).

En la figura 4.12 se observa claramente como el número de lecturas encontradas de los espaciadores y la región repetitiva aumenta significativamente cuando las tasas de crecimiento son bajas, T0 ($\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$) o cercanas a cero, T5 ($\mu = 0,00047 \text{ h}^{-1}$). Las diferencias en el número de lecturas de los CRISPR se deben al número de repeticiones de estas secuencias que es proporcional al tamaño de los CRISPR.

La mayor expresión transcripcional de las regiones repetitivas CRISPR junto con las proteínas asociadas CAS, podría explicar la fuerte represión génica de Tmp4 y a otros fagos con los que presenta homología (Tabla suplementaria 2.1) cuando la tasa de crecimiento disminuye.

Capítulo 4

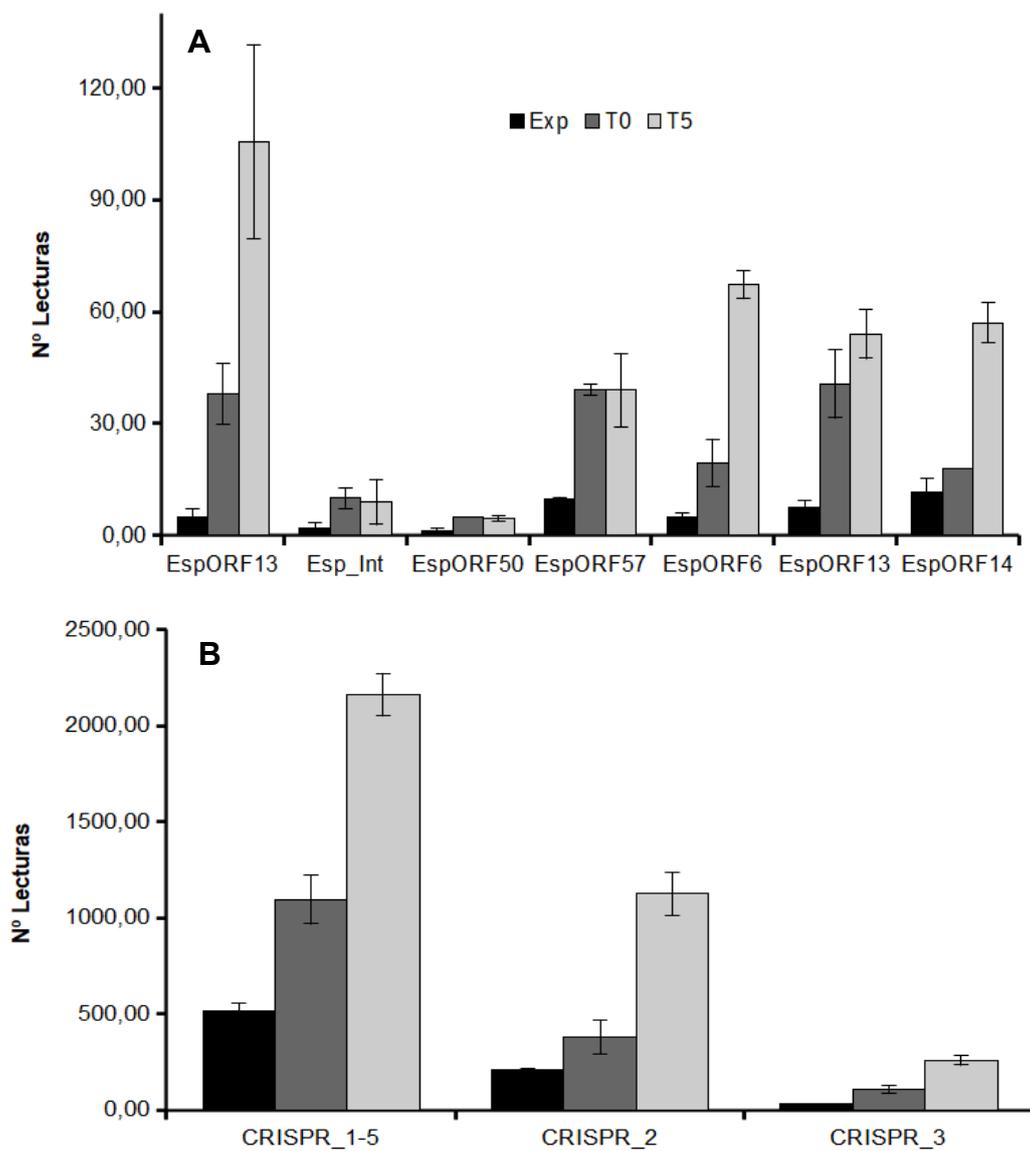


Figura 4.12. Número de lecturas encontradas de los espaciadores que difieren en alguna base (A) y las regiones repetitivas en los archivos de secuenciación del ARN a diferentes tasas de crecimiento (B) (Exponencial, T0, T5). La posición y anotación de los genes indicados se indica en el anexo X.

4.5. Discusión

Históricamente los microorganismos termófilos han sido escasamente estudiados mientras que los mesófilos han protagonizado algunos estudios (Jørgensen et al., 2010; Overkamp et al., 2015; Ercan et al., 2015; Rebnegger et al., 2016; van Mastrigt et al., 2018) a tasas de crecimiento cercanas a cero. En la actualidad no existen estudios en retentostato en el que se utilicen termófilos como modelo. Por primera vez se va a llevar a cabo una comparación transcripcional de la cepa termófila *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a diferentes tasas de crecimiento, desde velocidad de crecimiento exponencial hasta tasas de crecimiento cercanas a cero obtenidas por limitación nutricional.

El crecimiento lento conseguido en un retentostato difiere al logrado durante la fase estacionaria ampliamente estudiada. En cultivos en discontinuo las células pasan de un crecimiento exponencial a un estado de estabilidad en el número total de células (fase estacionaria) de forma relativamente rápida debido al agotamiento de los nutrientes. Sin embargo, en un retentostato las células disponen de nutrientes durante todo el proceso, aunque de una forma limitada, haciendo que la velocidad de crecimiento disminuya progresivamente a lo largo del experimento. Al final del experimento (21 días) las tasas de crecimiento específicas obtenidas habían disminuido a $0,00047 \text{ h}^{-1}$.

Los resultados de transcriptómica de la cepa termófila *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en un cultivo de retentostato muestran similitudes con los citados para *Bacillus subtilis* (Overkamp et al., 2015), pero también indican algunas diferencias fundamentales. A diferencia de Overkamp et al. (2015) además de utilizar como referencia el transcriptoma en modo quimiostato hemos

Capítulo 4

incluido el crecimiento exponencial como referencia ya que el punto de comparación ideal para determinar las consecuencias de un crecimiento muy reducido es aquel en condiciones óptimas (fase exponencial en óptimas condiciones de crecimiento). Si, como han hecho otros autores (Overkamp et al., 2015) realizásemos la comparación entre la fase inicial del crecimiento en retentostato, la tasa de crecimiento de referencia ya representaría una tasa de crecimiento reducida limitada por los nutrientes aportados a una tasa de dilución relativamente baja. Este punto es importante a la hora de diferenciar claramente estados de crecimiento óptimo y mínimo lo que repercute en los resultados comparativos y sus consecuencias. La gran mayoría de esos genes que se reprimen a lo largo del crecimiento en retentostato (a lo largo de la progresiva reducción de la tasa de crecimiento de estas células) tienen un valor mayor de expresión que en el estado de crecimiento exponencial. Es una diferencia bastante importante porque a pesar de la limitación por nutrientes la cepa 23.6 aumenta la expresión de gran número de sus genes.

Las altas tasas de crecimiento descritas para el género *Parageobacillus* (Pavlostathis et al., 2006) se corresponden con su respuesta transcripcional. Durante este estado (crecimiento óptimo) las células utilizan las rutas metabólicas principales para la obtención de energía (glucólisis y pentosas fosfatos) y se duplican rápidamente, sobreexpresando los genes involucrados en la división celular (replicación, transcripción, traducción y síntesis de peptidoglicanos). Esta es una respuesta típica de los estrategas de la R, los microorganismos aprovechan las ventanas temporales cuando las condiciones son favorables para aumentar el número de individuos en el ecosistema (Golovlev, 2001).

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Cuando las condiciones no son favorables (típico de los ecosistemas naturales) y las células no se dividen tan rápidamente, la respuesta transcripcional se dispara, llegando a involucrar a más de 3000 genes. En comparación con la fase exponencial durante el crecimiento en modo quimiostato y retentostato hay un gran número de genes sobreexpresados, aunque a medida que disminuye la tasa de crecimiento aumentan progresivamente los genes regulados a la baja, sugiriendo que muchos procesos se están interrumpiendo en respuesta a la disponibilidad limitada de nutrientes y energía (Overkamp et al., 2015). A su vez destacar que los perfiles de transcripción de los cultivos retentostato muestran similitudes con los descritos para cultivos en discontinuo de *Bacillus subtilis* durante la fase estacionaria (de Jong et al., 2012). Por ejemplo *codY*, una proteína de unión a GTP que regula más de 100 genes que son reprimidos durante el crecimiento exponencial e inducidos cuando la tasa de crecimiento disminuye (fase estacionaria). Incluyen genes que codifican enzimas degradativas extracelulares, sistemas de transporte, vías catabólicas, competencia genética, síntesis de antibióticos, flagelina, etc. (Sonenshein, 2005). Tanto en quimiostato como en retentostato la cepa 23.6 induce la expresión de *codY* y como consecuencia al resto de genes que están bajo su regulación. La función represora de *codY* es activada cuando interacciona con GTP e isoleucina (Sonenshein, 2005). En retentostato, la proteína *relA* que degrada GTP y la proteína *ilvE* que degrada isoleucina están sobreexpresadas inhibiendo la función represora de *codY*. Sin embargo, en los cultivos de retentostato de *Bacillus subtilis* se sugiere que los niveles de GTP se han mantenido lo suficientemente altos como para activar la represión mediada por *codY* (Overkamp et al., 2015). Pensamos que esto se debe a que al tomar solo como referencia el estado de quimiostato (T0), observamos que la concentración de *codY* es mayor que en retentostato pero si tenemos en cuenta los niveles de expresión durante el

Capítulo 4

crecimiento exponencial vemos que a tasas de crecimiento bajo *codY* se mantiene sobreexpresado.

El control de catabolitos de carbono es un mecanismo regulador por el cual la célula coordina el metabolismo del carbono y las fuentes de energía para maximizar su eficiencia y también regula otros procesos metabólicos (Fujita, 2009). En *Bacillus subtilis*, la represión de catabolitos de carbono (CCR) está regulada por el regulador global *ccpA* y solo ocurre cuando intermediarios glucolíticos como la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) y la glucosa 6-fosfato estimulan la fosforilación de la proteína HPr en Ser-46, que es un corregulador necesario junto con *ccpA* (Fujita, 2009). El transcriptoma de la cepa 23.6 refleja una represión progresiva de los genes glucolíticos durante la fase en quimiostato y en retentostato sugiriendo un descenso de sus intermediarios y como consecuencia aliviando la represión de catabolitos de carbono.

Al igual que ocurre con el crecimiento de *Bacillus subtilis* en retentostato (Overkamp et al., 2015) la cepa 23,6 induce la expresión de genes implicados en la utilización de sustratos alternativos, expandiendo su repertorio metabólico activo. Un ejemplo de ello es la inducción de genes implicados en la degradación de ácidos grasos así como de compuestos aromáticos y aminoácidos ramificados, pudiendo cumplir el objetivo de producir energía a partir de fuentes alternativas como los fosfolípidos. A concentraciones muy bajas de nutrientes, la capacidad de utilizar simultáneamente varias fuentes de carbono le da a las células ventajas sobre aquellas que utilizan un sola o menor número de fuentes de carbono (Egli, 2010).

A diferencia de los datos mostrados por el cultivo en retentostato de *Bacillus subtilis* (Overkamp et al., 2015), *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

aumenta la expresión de los genes involucrados en la quimiostaxis y motilidad, uno de los comportamientos bacterianos más complejos y costosos. Esto puede deberse a que el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Bacillus subtilis* en retentostato contiene una única fuente de carbono (glucosa) que tiene un rendimiento de ATP bajo. Por el contrario, para el cultivo de la cepa 23.6 utilizamos un medio complejo (NB) que junto con la degradación de sustratos alternativos, como los ácidos grasos que tienen un rendimiento mayor de ATP, podrán satisfacer los requerimientos energéticos del movimiento flagelar. Además, la alta temperatura empleada en el crecimiento de la cepa 23.6 (60° C) disminuye la viscosidad del medio facilitando la movilidad de las bacterias.

Estudios recientes han demostrado que *Escherichia coli* sobreexpresa los genes de la motilidad y quimiotaxis en condiciones de estrés nutricional incluso en ausencia de gradientes de nutrientes (cultivo homogéneo). Ello sugiere que las bacterias pueden generar gradientes locales de fuentes de carbono y metabolitos excretados y, posteriormente, utilizar la quimiotaxis para mejorar la detección y utilización de estos compuestos (Ni et al., 2020).

El suministro continuo de nutrientes en el cultivo de retentostato podría explicar la ausencia de reacciones características de la inanición en fase estacionaria, como la activación de la respuesta de estrés general (Petersohn et al., 2001) y la activación de los mecanismos de reparación del ADN característicos de la mutagénesis ocasionada por el estrés oxidativo durante la fase estacionaria de *Bacillus subtilis* (Vidales et al., 2009)

Varios estudios han observado que especies de *Geobacillus* y *Parageobacillus* han alterado proactivamente sus genomas y plásmidos a través de transferencia horizontal de genes (Stuknyte et al., 2008; De Maayer et al., 2014; Burgess et al.,

Capítulo 4

2017), siendo un mecanismo clave para su adaptación ambiental a diferentes hábitats. En el análisis genómico (capítulo 3) hemos descrito que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 tiene la posibilidad de llevar a cabo las tres vías principales de transferencia horizontal de genes (transformación, conjugación y traducción). El análisis transcriptómico nos muestra que hay una regulación diferencial de estas vías cuando la tasa de crecimiento disminuye.

La conjugación, que podría ser gobernada principalmente por los genes incluidos en Tmp3 y genes de Tmp1 englobados en el COG U, se reprime cuando la tasa de crecimiento disminuye, posiblemente porque este tipo de transferencia horizontal requiere un coste energético elevado.

La transformación, representada por el gran número de secuencias de inserción presentes en Tmp1 esta sobreexpresada durante el crecimiento en quimiostato y retentostato, favoreciendo la alteración genómica cuando las condiciones son adversas (Xu et al. 1993). Con este tipo de datos es imposible saber como se están moviendo estos elementos génicos pero el hecho de que Tmp1 y Tmp2 tengan una regulación transcripcional similar y presenten genes únicos que tienen una frecuencia de uso de codones similar (capítulo 3), nos podría indicar que hay saltos de transposición entre Tmp1 y Tmp2. En cualquier modo, la sobreexpresión de genes relacionados con la transformación en condiciones de crecimiento muy reducido sugiere una capacidad adicional de adaptación a condiciones adversas.

La traducción es el mecanismo de transferencia horizontal mediado por fagos que puede aportar una ventaja selectiva por la incorporación de nuevo ADN pero también pueden tener un costo de aptitud si los fagos son virulentos (Frost et al., 2005). Una de las formas que tienen las bacterias para resistir la infección por fagos son los sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente e interespaciadas (CRISPR). Estos sistemas equipan a las bacterias con un "sistema inmunológico adaptativo" específico de secuencia que es

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

heredable (Marraffini y Sontheimer, 2010). Los CRISPR tienen integrados entre la secuencia repetitiva, ADN correspondiente a los fagos (espaciadores) que son transcritos y procesados por las proteínas asociadas a CRISPR (Cas) en ARN pequeños no codificantes (ARNcr). El complejo proteico CAS y ARNcr interfiere de forma específica con los ácidos nucleicos del fago provocando su degradación (Richter et al., 2012).

La cepa 23.6 coexiste con un fago (Tnp4) que no tiene la capacidad de integrarse en el genoma de la bacteria y solo se expresa en condiciones de crecimiento exponencial. Una posible explicación a esta regulación podría estar mediada por el sistema CRISPR/CAS. A tasas de crecimiento cercanas a cero las regiones CRISPR y las proteínas CAS están muy sobreexpresadas, por lo tanto el complejo espaciador proteína CAS interacciona con las secuencias de Tnp4 con las que presenta homología (Figura 4.11) entre otras, la ARN polimerasa del fago y las proteínas homologas al fago lambda que regulan la entrada al ciclo lítico y lisogénico: CRO y CI (Oppenheim et al., 2019), provocando su degradación. Esto explicaría la represión de todos los genes de Tnp4 a tasas de crecimiento bajo y la imposibilidad de integrarse en el genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 cuando las condiciones son adversas ya que de lo contrario perjudicaría la capacidad de supervivencia de ambos, huésped y fago. Sin embargo cuando las condiciones son óptimas para el crecimiento y hay nutrientes en abundancia las regiones CRISPR y proteínas CAS no están tan sobreexpresadas por lo que la inhibición del fago está en un periodo reducido. En estas condiciones la proteína reguladora que más se expresa es CRO, induciendo al fago al ciclo lítico (Oppenheim et al., 2019).

Capítulo 4

A pesar de que estos microorganismos tienen la capacidad de crecer muy rápidamente cuando las condiciones son óptimas, considerándose oportunistas (Zeigler, 2104), también están expuestos a una alta mortalidad propiciada por fagos por lo que su abundancia se vería mermada rápidamente. Sin embargo cuando las condiciones son adversas (escasez de nutrientes) tienen la capacidad de crecer lentamente, presentando una mínima tasa de mortalidad, de modo que podría competir por los recursos del medio, activando un gran número de genes que favorecen su persistencia y adaptación al medio.

Golovlev, 2001 ha sugerido que las respuestas bacterianas ante los cambios ambientales pueden ser tan diversas que no debemos asignar una estrategia de vida concreta sino como una combinación de “tácticas ecológicas” ya que el número de tales combinaciones puede ser tan grande que resultará difícil clasificar las estrategias de vida bacteriana. En este sentido, *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 representa un modelo adaptativo al ecosistema suelo en el que vive en función de la periodicidad de sus condiciones ambientales y suministro de nutrientes. Esta observación está de acuerdo con los resultados transcriptómicos presentados y coincide con estudios recientes que demuestran su adaptación a condiciones de sequedad y elevada temperatura y confirman su papel potencial en suelos en cuanto a su participación en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, específicamente del C, N, S y P (Portillo et al., 2012; Santana y Gonzalez, 2015; Gómez et al. 2020a y b).

4.6. Conclusiones

El estudio transcriptómico revela que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 puede vivir a tasas de crecimiento cercanas a cero ($\mu = 0,00047 \text{ h}^{-1}$) ya que tiene la capacidad de regular la expresión génica cuando los nutrientes son limitantes, reprimiendo los genes involucrados en la replicación y división celular y sobreexpresando genes encargados de obtener energía de fuentes alternativas (lípidos) y el metabolismo secundario. Además, la alta viabilidad celular y la represión de los sistemas implicados en la reparación del ADN y las especies reactivas de oxígeno indican que el deterioro de las funciones celulares está ausente en los cultivos de retentostato. Cuando las condiciones son adversas (escasez de nutrientes) la cepa 23.6 activa un gran número de elementos móviles genéticos favoreciendo la diversificación del genoma y su adaptación al medio en el que se desarrollan. También aumenta la expresión de las regiones CRISPR y proteínas CAS que impiden las infecciones por fago (Tnp4) y su integración, favoreciendo su viabilidad y persistencia en los ambientes que colonizan.

4.7. Bibliografía

- Baas-Becking, L. G. M. (1934) *Geobiologie; of inleiding tot de milieukunde*. WP Van Stockum & Zoon NV. Amsterdam
- Bezuidt, O. K., Pierneef, R., Gomri, A. M., Adesioye, F., Makhalanyaane, T. P., Kharroub, K., Cowan, D. A. (2016) The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus. *Frontiers in microbiology*, 7: 723.
- Boender, L. G., de Hulster, E. A., van Maris, A. J., Daran-Lapujade, P. A., Pronk, J. T. (2009) Quantitative physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero specific growth rates. *Applied and environmental microbiology*, 75(17): 5607-5614.
- Burgess, S. A., Flint, S. H., Lindsay, D., Cox, M. P., Biggs, P. J. (2017) Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC microbiology*, 17(1): 140.
- Conant R. T., Ryan M. G., Agren G. I., Birge H. E., Davidson E. A., Eliasson P. E., Evans S. E., Frey S. D., Giardina C. P., Hopkins F., Hyvönen R., Kirschbaum U. F., Lavallee J. M., Leifeld J., Parton W. J., Steinweg J. M., Wallenstein M. D., Wetterstedt J. A. M., Bradford M. A. (2011) Temperature and soil organic matter decomposition rates – synthesis of current knowledge and a way forward. *Global Change biology*, 17: 3392-3404.

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

- Das, S., Jean, J. S., Kar, S., Chou, M. L., Chen, C. Y. (2014) Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of hazardous materials*, 272: 112-120.
- de Jong, I. G., Veening, J. W., Kuipers, O. P. (2012) Single cell analysis of gene expression patterns during carbon starvation in *Bacillus subtilis* reveals large phenotypic variation. *Environmental microbiology*, 14(12): 3110-3121.
- De Maayer, P., Brumm, P. J., Mead, D. A., Cowan, D. A. (2014) Comparative analysis of the *Geobacillus* hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. *BMC genomics*, 15(1): 836.
- Egli T. (2010) How to live at very low substrate concentration. *Water research*, 44(17): 4826-4837.
- Ercan, O., Smid, E. J., Kleerebezem, M. (2013) Quantitative physiology of *Lactococcus lactis* at extreme low-growth rates. *Environmental microbiology*, 15(8): 2319-2332.
- Esin, A., Ellis. T., Warnecke, T. (2018) Horizontal gene flow into *Geobacillus* is constrained by the chromosomal organization of growth and sporulation. *BioRxiv*.

Capítulo 4

- Finkel S. E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature reviews. Microbiology*, 4(2): 113-120.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9): 722-732.
- Fujii, K., Tominaga, Y., Okunaka, J., Yagi, H., Ohshiro, T., Suzuki, H. (2018) Microbial and genomic characterization of *Geobacillus thermodenitrificans* OS27, a marine thermophile that degrades diverse raw seaweeds. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(11): 4901-4913.
- Fujita Y. (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(2): 245-259.
- Golovlev, E. L. (2001) Ecological strategy of bacteria: specific nature of the problem. *Microbiology*, 70(4): 379-383.
- Giannoukos, G., Ciulla, D. M., Huang, K., Haas, B. J., Izard, J., Levin, J. Z., Livny, J., Earl, A. M., Gevers, D., Ward, D. V., Nusbaum, C., Birren, B. W., Gnirke, A. (2012) Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome biology*, 13(3): R23.
- Gómez, E. J., Delgado, J. A., González, J. M. (2020) Persistence of microbial extracellular enzymes in soils under different temperatures and water availabilities. *Ecology and evolution*, 10(18): 10167-10176.

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

- Gómez, E. J., Delgado, J. A., González, J. M. (2021) Influence of water availability and temperature on estimates of microbial extracellular enzyme activity. *PeerJ*, 9: e10994.
- Jørgensen, T. R., Nitsche, B. M., Lamers, G. E., Arentshorst, M., van den Hondel, C. A., Ram, A. F. (2010) Transcriptomic insights into the physiology of *Aspergillus niger* approaching a specific growth rate of zero. *Applied and environmental microbiology*, 76(16): 5344-5355.
- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002) The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 4:595-602.
- Marraffini, L. A., Sontheimer, E. J. (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature reviews. Genetics*, 11(3): 181-190.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., Ivanov, M. V., (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51:433– 446.

Capítulo 4

Ni, B., Colin, R., Link, H., Endres, R. G., Sourjik, V. (2020) Growth-rate dependent resource investment in bacterial motile behavior quantitatively follows potential benefit of chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(1): 595-601.

Oppenheim, A. B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D. L., Adhya, S. (2005) Switches in bacteriophage lambda development. *Annual review of genetics*, 39: 409-429.

Overkamp, W., Ercan, O., Herber, M., van Maris, A. J., Kleerebezem, M., & Kuipers, O. P. (2015) Physiological and cell morphology adaptation of *Bacillus subtilis* at near-zero specific growth rates: a transcriptome analysis. *Environmental microbiology*, 17(2): 346-363.

Pavlostathis, S. G., Marchant, R., Banat, I. M., Ternan, N. G., McMullan, G. (2006) High growth rate and substrate exhaustion results in rapid cell death and lysis in the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans*. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1): 84-95.

Pedros-Alió, C. (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14:257-263.

Pedrós-Alió C. (2012) The rare bacterial biosphere. *Annual review of marine science*, 4: 449-466.

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G. M., Leek, J. T., Salzberg, S. L. (2016) Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nature protocols*, 11(9): 1650-1667.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 183(19): 5617-5631.
- Rebnegger, C., Vos, T., Graf, A. B., Valli, M., Pronk, J. T., Daran-Lapujade, P., Mattanovich, D. (2016) *Pichia pastoris* Exhibits High Viability and a Low Maintenance Energy Requirement at Near-Zero Specific Growth Rates. *Applied and environmental microbiology*, 82(15): 4570-4583.
- Richter, C., Chang, J. T., Fineran, P. C. (2012) Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/ CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses*, 4(10): 2291-2311.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (2011) *Biometry the principles and practice of statistics in biological research*, 4th edition. W.H. Freeman & co, New York, 937 pp.
- Sonenshein A. L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Current opinion in microbiology*, 8(2): 203-207.
- Stuknyte, M., Guglielmetti, S., Mora, D., Kuisiene, N., Parini, C., Citavicius, D. (2008) Complete nucleotide sequence of pGS18, a 62.8-kb plasmid from

Capítulo 4

Geobacillus stearothermophilus strain 18. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 12(3): 415-429.

Suzuki H. (2018). Peculiarities and biotechnological potential of environmental adaptation by *Geobacillus* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24): 10425-10437.

Suzuki, H., Taketani, T., Kobayashi, J., Ohshiro, T. (2018) Antibiotic resistance mutations induced in growing cells of *Bacillus*-related thermophiles. *The Journal of antibiotics*, 71(3): 382-389.

van Mastrigt, O., Abee, T., Lillevang, S. K., Smid, E. J. (2018) Quantitative physiology and aroma formation of a dairy *Lactococcus lactis* at near-zero growth rates. *Food microbiology*, 73: 216-226.

van Verseveld, H. K., Arbige, M., Chesbro, W. R. (1984) Continuous culture of bacteria with biomass retention. *Trends in Biotechnology*, 2(1): 8-12.

van Verseveld, H. W., de Hollander, J. A., Frankena, J., Braster, M., Leeuwerik, F. J., Stouthamer, A. H. (1986) Modeling of microbial substrate conversion, growth and product formation in a recycling fermentor. *Antonie van Leeuwenhoek*, 52(4) 325-342.

Vidales, L. E., Cárdenas, L. C., Robleto, E., Yasbin, R. E., Pedraza-Reyes, M. (2009) Defects in the error prevention oxidized guanine system potentiate stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 191(2): 506-513.

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1): 57-63.

Xu, K., He, Z. Q., Mao, Y. M., Sheng, R. Q., Sheng, Z. J. (1993) On two transposable elements from *Bacillus stearothermophilus*. *Plasmid*, 29(1): 1-9

Zeigler, D. R. (2014) The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology (Reading, England)*, 160:1-11

Capítulo 4

4.8. Anexo

Tabla suplementaria 4.1. Anotación de los genes representados en la figura 4.8 y Figura 4.9.

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_000019	<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein
pgaptmp_000047	-	flagellar basal body rod protein
pgaptmp_000048	-	PspA/IM30 family protein
pgaptmp_000049	-	cell wall-active antibiotics response protein
pgaptmp_000050	-	sensor histidine kinase
pgaptmp_000051	-	response regulator transcription factor
pgaptmp_000052	<i>adhE</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase
pgaptmp_000080	-	uracil-DNA glycosylase
pgaptmp_000093	-	4-oxalocrotonate tautomerase
pgaptmp_000104	-	acetyl-CoA C-acetyltransferase
pgaptmp_000106	-	acyl-CoA dehydrogenase
pgaptmp_000107	-	acyl-CoA dehydrogenase
pgaptmp_000113	-	response regulator
pgaptmp_000114	-	fructose-bisphosphate aldolase
pgaptmp_000115	<i>fsa</i>	fructose-6-phosphate aldolase
pgaptmp_000123	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_000134	<i>rpiB</i>	ribose 5-phosphate isomerase B
pgaptmp_000224	-	response regulator transcription factor
pgaptmp_000286	-	IS1182 family transposase
pgaptmp_000299	-	NisI/Spal family lantibiotic immunity lipoprotein
pgaptmp_000300	-	lantibiotic immunity ABC transporter MutG family permease subunit
pgaptmp_000301	-	lantibiotic immunity ABC transporter MutE/EpiE family permease subunit
pgaptmp_000302	-	lantibiotic protection ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_000303	-	response regulator transcription factor
pgaptmp_000304	-	HAMP domain-containing histidine kinase
pgaptmp_000326	<i>pcrA</i>	DNA helicase PcrA
pgaptmp_000338	-	helix-turn-helix transcriptional regulator
pgaptmp_000357	-	ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_000363	-	IS1182 family transposase
pgaptmp_000394	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_000403	<i>cas7b</i>	type I-B CRISPR-associated protein Cas7/Csh2
pgaptmp_000404	<i>cas5b</i>	type I-B CRISPR-associated protein Cas5
pgaptmp_000405	<i>cas3</i>	CRISPR-associated helicase Cas3
pgaptmp_000406	<i>cas4</i>	CRISPR-associated protein Cas4
pgaptmp_000407	<i>cas1b</i>	type I-B CRISPR-associated endonuclease Cas1
pgaptmp_000408	<i>cas2</i>	CRISPR-associated endonuclease Cas2
pgaptmp_000409	<i>cas6</i>	CRISPR-associated endonuclease Cas6
pgaptmp_000454	-	aldehyde dehydrogenase family protein
pgaptmp_000506	-	DNA-3-methyladenine glycosylase 2 family protein
pgaptmp_000525	-	acyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_000550	<i>mutY</i>	A/G-specific adenine glycosylase

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_000620	-	ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_000678	<i>recJ</i>	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ
pgaptmp_000680	-	recombinase family protein
pgaptmp_000684	-	recombinase family protein
pgaptmp_000704	-	zinc-dependent alcohol dehydrogenase family protein
pgaptmp_000708	-	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)
Pgaptmp_000762	-	HTH-type transcriptional regulator Hpr
pgaptmp_000789	-	competence protein ComK
pgaptmp_000817	<i>gnd</i>	decarboxylating 6-phosphogluconate dehydrogenase
pgaptmp_000818	-	glucose-6-phosphate dehydrogenase
pgaptmp_000819	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_000879	-	peptide ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_000897	-	GTP pyrophosphokinase family protein
pgaptmp_000929	-	recombinase family protein
pgaptmp_000939	-	transposase
pgaptmp_000941	-	transposase
pgaptmp_000942	-	tyrosine-type recombinase/integrase
pgaptmp_000964	-	transposase
pgaptmp_000976	-	DDE-type integrase/transposase/recombinase
pgaptmp_001006	-	PAS domain S-box protein
pgaptmp_001015	<i>mtnW</i>	2%2C3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase
pgaptmp_001028	-	zinc-dependent alcohol dehydrogenase family protein
pgaptmp_001057	-	acyl-CoA dehydrogenase
pgaptmp_001085	<i>pdhA</i>	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha
pgaptmp_001088	<i>lpdA</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase
pgaptmp_001135	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
pgaptmp_001187	<i>priA</i>	primosomal protein N
pgaptmp_001195	-	ribulose-phosphate 3-epimerase
pgaptmp_001231	<i>codY</i>	GTP-sensing pleiotropic transcriptional regulator CodY
pgaptmp_001311	<i>recA</i>	recombinase RecA
pgaptmp_001328	<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein MutS
pgaptmp_001329	<i>mutL</i>	DNA mismatch repair endonuclease MutL
pgaptmp_001355	-	acyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_001358	-	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_001359	-	thiolase family protein
pgaptmp_001365	<i>lexA</i>	transcriptional repressor LexA
pgaptmp_001367	-	recombinase family protein
pgaptmp_001369	<i>tkt</i>	transketolase
pgaptmp_001380	-	IS1182 family transposase
pgaptmp_001395	-	acyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_001442	-	DDE-type integrase/transposase/recombinase
pgaptmp_001444	-	transposase
pgaptmp_001460	-	transposase
pgaptmp_001479	-	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
pgaptmp_001522	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein

Capítulo 4

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_001632	-	iron-containing alcohol dehydrogenase family protein
pgaptmp_001665	-	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
pgaptmp_001666	-	acyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_001667	-	thiolase family protein
pgaptmp_001690	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_001724	-	aldehyde dehydrogenase family protein
pgaptmp_001727	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase
pgaptmp_001728	-	aldehyde dehydrogenase family protein
pgaptmp_001731	-	enoyl-CoA hydratase
pgaptmp_001763	-	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
pgaptmp_001769	-	aldehyde dehydrogenase family protein
pgaptmp_001770	-	N-acyl homoserine lactonase family protein
pgaptmp_001771	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_001799	-	two-component sensor histidine kinase
pgaptmp_001965	-	IS3 family transposase
Pgaptmp_001975	-	AraC family transcriptional regulator
pgaptmp_002015	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
pgaptmp_002043	<i>dmpG</i>	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase
pgaptmp_002045	-	catechol 2%2C3-dioxygenase
pgaptmp_002055	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_002057	-	aldehyde dehydrogenase EutE
pgaptmp_002078	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_002207	-	enoyl-CoA hydratase
pgaptmp_002208	-	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
pgaptmp_002212	-	acyl-CoA dehydrogenase
pgaptmp_002308	-	long-chain fatty acid--CoA ligase
pgaptmp_002311	-	aldehyde dehydrogenase
pgaptmp_002312	-	4-oxalocrotonate tautomerase
pgaptmp_002314	<i>dmpG</i>	4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase
pgaptmp_002315	-	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)
pgaptmp_002316	-	fumarylacetoacetate hydrolase family protein
pgaptmp_002317	-	alpha/beta fold hydrolase
pgaptmp_002318	-	catechol 2%2C3-dioxygenase
pgaptmp_002343	-	acyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_002356	-	acetoacetate--CoA ligase
pgaptmp_002398	<i>lpdA</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase
pgaptmp_002399	-	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2
pgaptmp_002400	-	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta
pgaptmp_002410	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
pgaptmp_002411	-	acetyl-CoA C-acyltransferase
pgaptmp_002412	-	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
pgaptmp_002413	-	aldehyde dehydrogenase
pgaptmp_002414	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
pgaptmp_002423	-	aldehyde dehydrogenase family protein
pgaptmp_002427	<i>cas1b</i>	type I-B CRISPR-associated endonuclease Cas1
pgaptmp_002428	<i>cas4</i>	CRISPR-associated protein Cas4

Análisis transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a tasas de crecimiento cercanas a cero

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_002429	<i>cas3</i>	CRISPR-associated helicase Cas3
pgaptmp_002430	<i>cas5b</i>	type I-B CRISPR-associated protein Cas5
pgaptmp_002431	<i>cas7i</i>	type I-B CRISPR-associated protein Cas7/Cst2/DevR
pgaptmp_002432	-	type I-B CRISPR-associated protein Cas8b1/Cst1
pgaptmp_002433	<i>cas6</i>	CRISPR-associated endoribonuclease Cas6
pgaptmp_002501	<i>nth</i>	endonuclease III
pgaptmp_002671	-	acyl-CoA carboxylase subunit beta
pgaptmp_002672	<i>mce</i>	methylmalonyl-CoA epimerase
pgaptmp_002681	<i>scpA</i>	methylmalonyl-CoA mutase
pgaptmp_002682	-	acyl-CoA mutase large subunit family protein
pgaptmp_002684	-	transposase
pgaptmp_002691	-	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2
pgaptmp_002692	-	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta
pgaptmp_002693	-	thiamine pyrophosphate-dependent dehydrogenase E1 component subunit alpha
pgaptmp_002694	<i>lpdA</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase
pgaptmp_002696	-	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase
pgaptmp_002703	<i>spo0A</i>	sporulation transcription factor Spo0A
pgaptmp_002710	-	exodeoxyribonuclease VII small subunit
pgaptmp_002792	-	deoxyribonuclease IV
pgaptmp_002805	<i>recO</i>	DNA repair protein RecO
pgaptmp_002832	<i>holA</i>	DNA polymerase III subunit delta
pgaptmp_002878	-	ATP-dependent RecD-like DNA helicase
pgaptmp_002895	-	bifunctional (p)ppGpp synthetase/guanosine-3'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase
pgaptmp_002906	<i>ruvB</i>	Holliday junction branch migration DNA helicase RuvB
pgaptmp_002907	<i>ruvA</i>	Holliday junction branch migration protein RuvA
pgaptmp_002922	-	sporulation initiation phosphotransferase B
pgaptmp_002967	-	IS1182 family transposase
pgaptmp_002978	<i>ilvE</i>	branched-chain-amino-acid transaminase
pgaptmp_002992	<i>uvrC</i>	excinuclease ABC subunit UvrC
pgaptmp_003008	-	enoyl-CoA hydratase
pgaptmp_003010	-	long-chain-fatty-acid--CoA ligase
pgaptmp_003042	<i>dnal</i>	primosomal protein Dnal
pgaptmp_003049	<i>mutM</i>	DNA-formamidopyrimidine glycosylase
pgaptmp_003050	<i>polA</i>	DNA polymerase I
pgaptmp_003059	<i>pyk</i>	pyruvate kinase
pgaptmp_003060	<i>pfkA</i>	6-phosphofructokinase
pgaptmp_003064	<i>dnaE</i>	DNA polymerase III subunit alpha
pgaptmp_003082	-	IS1182 family transposase
pgaptmp_003083	-	IS3 family transposase
pgaptmp_003193	<i>ccpA</i>	catabolite control protein A
pgaptmp_003220	-	long-chain fatty acid--CoA ligase
pgaptmp_003221	-	acyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_003223	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
pgaptmp_003225	-	thiolase family protein

Capítulo 4

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_003228	-	Zn-dependent alcohol dehydrogenase
pgaptmp_003230	-	aldehyde dehydrogenase family protein
pgaptmp_003236	-	IS1182 family transposase
pgaptmp_003242	-	tyrosine-type recombinase/integrase
pgaptmp_003250	-	tyrosine-type recombinase/integrase
pgaptmp_003271	-	tyrosine-type recombinase/integrase
pgaptmp_003308	-	tyrosine-type recombinase/integrase
pgaptmp_003309	-	glucose-6-phosphate isomerase
pgaptmp_003310	-	iron-containing alcohol dehydrogenase
pgaptmp_003378	-	acyl-CoA dehydrogenase family protein
pgaptmp_003379	-	acetyl-CoA C-acetyltransferase
pgaptmp_003380	-	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
pgaptmp_003400	<i>hpaE</i>	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase
pgaptmp_003401	-	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate Delta-isomerase
pgaptmp_003402	-	fumarylacetoacetate hydrolase family protein
pgaptmp_003407	<i>hpaB</i>	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase%2C oxygenase component
pgaptmp_003412	-	IS3 family transposase
pgaptmp_003436	-	DDE-type integrase/transposase/recombinase
pgaptmp_003464	-	2%2C3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
pgaptmp_003466	-	phosphoglycerate kinase
pgaptmp_003467	<i>gap</i>	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
pgaptmp_003497	<i>uvrA</i>	excinuclease ABC subunit UvrA
pgaptmp_003498	<i>uvrB</i>	excinuclease ABC subunit UvrB
pgaptmp_003693	-	AraC family transcriptional regulator
pgaptmp_003760	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1
pgaptmp_003880	<i>holB</i>	DNA polymerase III subunit delta
pgaptmp_003891	<i>recR</i>	recombination protein RecR
pgaptmp_003914	<i>recF</i>	DNA replication/repair protein RecF
pgaptmp_003954	-	fumarylacetoacetate hydrolase family protein
pgaptmp_003955	-	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)

**Respuesta fisiológica y transcripcional de
Parageobacillus thermoglucosidasius 23.6 a
cambios de temperatura (60 – 20° C)**

5.1. Resumen

Las características fisiológicas y mecanismos moleculares que permiten que microorganismos del suelo, y especialmente aquellos termófilos como *Parageobacillus*, puedan sobrevivir y adaptarse a diversos factores de estrés ambiental son pocos conocidos. Con el fin de reproducir las condiciones ambientales de la superficie de los suelos, se cultivó *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en un quimiostato con una tasa de crecimiento reducida (0.025 h^{-1}) simulando un ciclo diario de temperaturas ($60\text{-}20^\circ \text{ C}$) típico de suelos de latitudes medias. La cepa 23.6 solo aumenta su biomasa cuando la temperatura es superior a 40° C y durante el periodo de incubación a 20° C mantiene su viabilidad y cierta inercia metabólica de modo que diversos procesos continúan, como por ejemplo la citocinesis. El análisis del transcriptoma reveló que al disminuir la temperatura el 66% de los genes anotados se expresan diferencialmente, predominando la represión y categorías funcionales como metabolismo de nucleótidos, traducción, transporte de iones inorgánicos, tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular y Tmp3 (plásmido conjugativo) presentaban un alto porcentaje de genes sobreexpresados. Al final del periodo de incubación a 20° C los niveles de expresión de la gran mayoría de los genes y la cantidad de ARN se mantuvieron constantes. Las bacterias termófilas (i.e., *P. thermoglucosidasius* 23.6) expuestas a un ambiente de bajas temperaturas preservan su ARN permitiéndole responder rápidamente cuando las condiciones vuelven a ser óptimas para el crecimiento.

5.2. Introducción

Aún hoy en día quedan muchos aspectos por comprender sobre el funcionamiento de nuestro planeta y está especialmente vinculado al papel que llevan a cabo los microorganismos. La diversidad microbiana en el planeta Tierra es tan alta (Curtis et al., 2002; González et al., 2012), que a pesar de todos los avances en los métodos de secuenciación y detección aun desconocemos una gran parte de esos microorganismos y todavía estamos muy lejos de comprender como funcionan y como utilizar ese enorme potencial biológico. Entender el funcionamiento de los microorganismos en el ecosistema es fundamental para alcanzar un uso eficiente de los recursos naturales y comprender sus consecuencias a nivel local y global.

Una de las principales características del medio ambiente es su variabilidad. El clima, a través de los cambios estacionales y los ciclos diarios, es uno de los grandes motores de esta gran heterogeneidad medioambiental y la cual afecta directamente a las comunidades biológicas. Un ejemplo típico de alguno de estos cambios los tenemos reflejados en la Península Ibérica donde podemos encontrar temperaturas muy reducidas en invierno y muy elevadas en verano, propio de climas continentales. Los suelos con escasa cubierta vegetal están muy expuestos a la radiación solar y como consecuencia la temperatura en las capas superficiales (0-5 cm) aumenta significativamente en períodos cálidos. En el sur de la Península Ibérica se han registrado temperaturas de 70° C en la superficie de suelos (Portillo et al., 2012; González et al., 2015) donde las altas temperaturas pueden mantenerse durante mas de 11 horas por encima de 40° C (Figura 5.1). Además, entre el día y la noche pueden observarse diferencias de

Capítulo 5

hasta 50° C. Algunos autores han registrado temperaturas superiores a los 90° C en la superficie de los desiertos (McCalley y Sparks 2009).

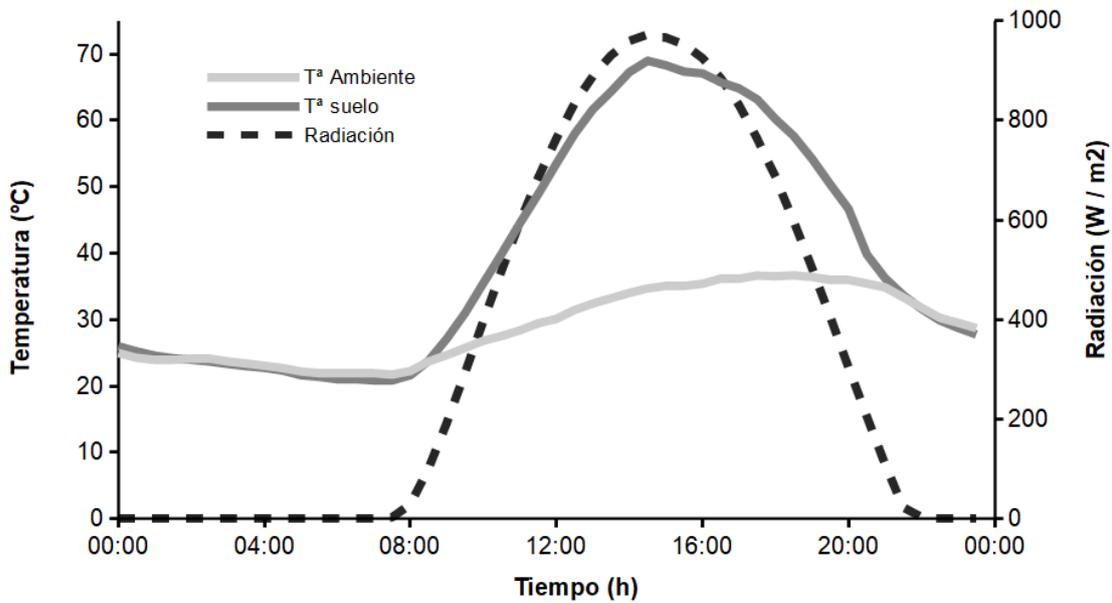


Figura 5.1. Ciclo de temperaturas (ambiente y superficie del suelo) y radiación solar (W/m^2) durante un día de verano en el sur de la Península Ibérica (Coria del Río, Sevilla)

Estas temperaturas tan elevadas están muy por encima del óptimo de crecimiento de las bacterias mesófilas del suelo que son las comúnmente estudiadas. De hecho esas altas temperaturas superan el rango de temperatura que la mayoría de bacterias mesófilas son capaces de tolerar. Como consecuencia, se ha sugerido que la actividad microbiana en las capas superiores se reduce mucho durante tales eventos extremos de temperatura (Townsend et al., 1992). Sin embargo, se ha demostrado la existencia de actividad enzimática bacteriana en suelos a temperaturas superiores a 40° C (González et al., 2015) o actividad

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

después de la exposición a estas temperaturas como resultado de la estimulación metabólica (Ho y Frenzel 2012). En general, los microorganismos mesófilos bajo eventos de altas temperaturas disminuyen su actividad e inician procesos de supervivencia, mientras que los microorganismos termófilos encontrarían las condiciones temporales adecuadas para desarrollarse.

Como hemos mencionado en los capítulos anteriores las bacterias Gram-positivas termófilas del filo Firmicutes, específicamente especies pertenecientes a los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus*, tienen una distribución ubicua y están presentes en todos los suelos estudiados (Marchant et al., 2002, 2008; Portillo et al., 2012; Santana et al., 2013; Zeigler, 2014; Suzuki, 2018) sugiriendo que pueden participar activamente en las reacciones biogeoquímicas del suelo (González y Portillo, 2010 a, b,c; Santana et al., 2013 González et al., 2015; Santana et al. 2021). Por lo tanto, el estudio de los microorganismos termófilos en el suelo y su papel en los ecosistemas es un aspecto que necesita ser investigado.

Con el fin de comprender la relevancia de los Firmicutes termófilos en el suelo, González et al. (2015) ha demostrado que temperaturas ambientales de 30° C, o incluso inferiores, son suficientes para que la superficie de los suelos y sedimentos con escasa cobertura vegetal alcancen temperaturas superiores a los 40°C. Esta temperatura (40°C) es suficiente para que estos termófilos del suelo muestren crecimiento en condiciones de laboratorio. Al analizar la frecuencia de días al año que superan los 30° C de temperatura ambiente para un amplio rango de latitudes terrestres, se observa que en latitudes altas (superiores a 40° N o S) rara vez ocurren eventos de altas temperaturas. Sin embargo, a latitudes más bajas, menores de 40° N o S, el número de eventos calurosos aumenta conforme

Capítulo 5

nos acercamos al ecuador (Figura 5.2) (González et al., 2015). Un ejemplo lo encontramos en Sevilla (37° N) donde la temperatura ambiental supera los 30° C unos 120 días al año (Figura 1.4).

Este rango de latitud (entre 40° N y S) incluye más del 50% de las tierras emergidas y las altas temperaturas se ha observado que están directamente relacionadas con un menor contenido en materia orgánica en suelos de latitudes bajas (Santana y González, 2015)

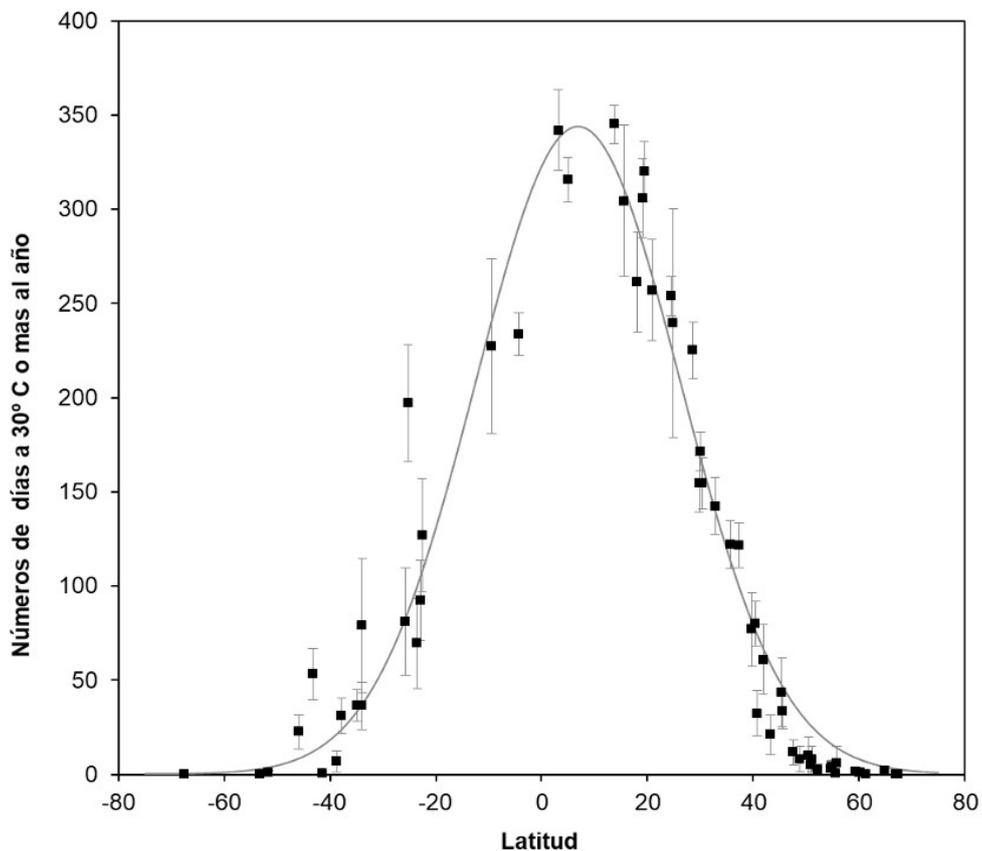


Figura 5.2. Número de días que alcanzan al menos 30° C en función de la latitud a distintas localidades. Sur, valores negativos y Norte valores positivos (González et al., 2015).

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

Se ha mencionado que dependiendo de la temperatura ambiental, los microorganismos termófilos en suelos pueden llegar a tener relevancia ecológica en función de los ciclos estacionales en ecosistemas de latitudes medias y bajas y en un esperado aumento de eventos extremos de alta temperatura como consecuencia del cambio climático (Davidson and Janssens, 2006; Connant et al., 2011; González et al., 2015; Santana y González, 2015). Sin embargo, una primera cuestión a resolver es cómo sobreviven esos microorganismos termófilos durante periodos de temperaturas mas bajas o incluso en ambientes en los que muy rara vez se lleguen a alcanzar temperaturas cálidas, como ocurren en los suelos del Norte de Europa (Marchant et al., 2002) o América (Wong et al., 2015).

Muchos microorganismos se ven obligados a desarrollarse en un entorno que no es adecuado para su crecimiento. Debido a la gran capacidad de dispersión de los microorganismos, por su pequeño tamaño, son capaces de alcanzar cualquier lugar del planeta. Para que esos microorganismos persistan en el ecosistema alcanzado, su número ha de equilibrarse bien por la nueva llegada de esos microorganismos o por su capacidad de desarrollarse en ese ambiente (Pedrós-Alió, 2012). Microorganismo termófilos (principalmente *Geobacillus* y *Parageobacillus*) también han sido identificados en muestras de aire, agua de lluvia (Marchant et al., 2008) y de la troposfera (Els et al., 2019). Como mecanismos para explicar su persistencia en ambientes fríos, se ha citado que la mortalidad de estos microorganismos termófilos a bajas temperaturas (4° C) es muy reducida a diferencia de lo que les ocurre en sus condiciones óptimas de crecimiento (Marchant et al., 2008). Esto podría justificar la capacidad de los microorganismos termófilos para persistir y mantener su presencia en ambientes relativamente fríos.

Capítulo 5

La gran capacidad de dispersión de los microorganismos justificaría la capacidad de alcanzar cualquier hábitat (Zeigler, 2014). Sin embargo, faltaría explicar y llegar a comprender si estos microorganismos mantienen algún tipo de actividad metabólica o crecimiento cuando se ven expuestos a ambientes fríos con temperaturas consideradas como demasiado bajas para su crecimiento.

Una de las principales características de las bacterias termófilas Gram-positivas es que tienen la capacidad de formar endosporas que les permiten sobrevivir en ambientes hostiles (Nazina et al., 2001). Las esporas son un estado de latencia en los que se forma una estructura de resistencia y la actividad fisiológica de los microorganismos se ve fuertemente reducida (Roszak y Colwell, 1987). Las esporas no constituyen el único estado de latencia ya que muchos microorganismos pueden reducir su metabolismo endógeno durante tiempos prolongados sin la necesidad de formar este tipo de estructuras (Raubuch et al., 2002).

Marchant et al. (2008), Portillo et al. (2012) y Santana et al. (2013) coinciden en que *Geobacillus* y otras especies termófilas se encuentran en los suelos principalmente como células vegetativas y los resultados experimentales obtenidos no son consecuencia de la presencia de esporas. Ello ha sido deducido en base a su elevada actividad y rápida capacidad de respuesta que sería imposible si esas células estuviesen formando esporas o estructuras de resistencia que presentan mínima actividad y requieren tiempos relativamente largos para su transformación a formas vegetativas.

Los microorganismos también pueden estar presentes en el medio ambiente en un estado denominado como potencialmente activo (Blagodatskaya y Kuzyakov,

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

2013). Se trata de un estado de “alerta fisiológica”, es decir, las células mantienen un metabolismo reducido, debido, por ejemplo, a un estrés nutricional, del que se reactivan muy rápidamente (pocas horas) cuando el estrés desaparece (Placella et al., 2012). Especies del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* son capaces de crecer rápidamente en períodos breves de altas temperaturas y abundancia de nutrientes (Pavlostathis et al., 2006). Además, tienen la capacidad de formar colonias muy rápidamente (8-12 horas) desde una siembra directa de suelo, sugiriendo de nuevo que se encuentran potencialmente activos (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013) en el medio del que son aislados.

La actividad de los microorganismos del suelo se podría estimar en base a sus actividades enzimáticas extracelulares (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013) ya que la degradación de polímeros a monómeros asimilables representa, generalmente, el paso limitante para el crecimiento de los microorganismos, y específicamente para la descomposición de materia orgánica del suelo (Davidson and Janssens, 2006; Conant et al., 2011; González et al., 2015; Gómez et al., 2020a). Se trata de una medida indirecta ya que la persistencia de las enzimas microbianas en el suelo puede variar de un microorganismo a otro, siendo las enzimas de los microorganismos termófilos las que presentan tiempos de persistencia más largos en suelos (Gómez et al., 2020b).

González et al. (2015) ha demostrado que la actividad enzimática extracelular (glucosidasas y proteasas) en suelos y sedimentos presentan picos máximos de actividad a temperaturas entre 50 y 75° C. Estos picos también ocurren en suelos de latitudes altas (González et al., 2015) donde eventos de altas temperaturas al año son muy esporádicos o inexistentes (Figura 5.2). La presencia de estos picos de máxima actividad nos indica que en algún momento los termófilos presentes

Capítulo 5

en los suelos templados o fríos han producido estas enzimas y, por lo tanto, han mostrado actividad metabólica y han puesto en marcha mecanismos de desarrollo y persistencia.

No solo hay evidencias indirectas de la actividad de microorganismos termófilos en ambientes fríos si no que diferentes autores han conseguido crecer cepas de *Geobacillus* a temperaturas inferiores de 40° C. Long y Willians, (1959) describen que diferentes cepas de *Bacillus stearothermophilus* (actualmente, *Geobacillus stearothermophilus*) crecen relativamente rápido a 37° C solo cuando son cultivados en un medio que contiene triptona, glucosa y Basamin (extracto de levadura hidrolizado procedente de la fábrica de cervezas Budweiser, San Luis, Misuri). Suzuki, (2017) señala que *Geobacillus kaustophilus* HTA426 crece a 35° C cuando el medio de cultivo contiene mioinositol, presumiblemente porque la cepa contenga una mioinositol deshidrogenasa que actúa a temperatura ambiente. El ejemplo mas llamativo es el de Marchant et al. (2008) que observaron crecimiento lento de *Geobacillus thermoleovorans* a 4° C en un tiempo de 9 meses y descartaron que se deba a contaminación por microorganismos mesófilos.

En este escenario, podríamos considerar que las bacterias de suelos serían capaces de desarrollarse con tasas netas de crecimiento muy reducidas en condiciones muy distantes de las que creemos óptimas para esos microorganismos. Como varían esas tasas de crecimiento y mortalidad en función de la distancia a sus condiciones óptimas de crecimiento (consideradas por experimentación clásica con cultivos en el laboratorio) sería un aspecto a confirmar.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

El objetivo de este estudio sería evaluar el comportamiento de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en base a las características fisiológicas y análisis transcriptómico, durante ciclos de temperatura simulando las fluctuaciones cíclicas (día/noche) observadas en las capas superiores de suelos (Figura 5.1). El ciclo de temperatura experimental utilizado en este estudio fluctúa de una temperatura elevada (óptima para esas bacterias termófilas, 60° C) a una baja (20° C, muy baja para permitir su crecimiento según lo que conocemos). Estas temperaturas elevadas reflejan ejemplos observados en la superficie del suelo durante el periodo estival en las horas centrales del día y las temperaturas mínimas observadas durante la noche. Estos datos permitirán comprender la estrategia de persistencia de estos microorganismos termófilos frente a cambios de temperatura observados en suelos a lo largo de ciclos diarios de temperatura.

5.3 Materiales y métodos

La superficie del suelo está expuesta a una gran variabilidad de condiciones ambientales y se trata de un sistema abierto para nutrientes y microorganismos donde la competencia por los recursos es muy intensa dando lugar a que la gran mayoría del tiempo la tasa de crecimiento específica (μ) de los microorganismos sea mucho menor a su tasa máxima observada en cultivos de laboratorio (Koch, 1997; Ferenci, 2001).

Con el fin de simular estas condiciones en el laboratorio se cultivó *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en un quimiostato a una tasa de dilución de 0,025 h⁻¹ y se simuló un ciclo de temperaturas similar a los registrados en la superficie de suelos (Figura 5.1). En este tipo de experimentos las condiciones de estabilidad propias de un cultivo de quimiostato se pierden ya que se modifican los parámetros del cultivo (temperatura) y, por lo tanto, no seremos

Capítulo 5

capaces de estimar la tasa de crecimiento específica en base a la tasa de dilución del sistema. El objetivo principal no es mantener la tasa de crecimiento si no estudiar la respuesta de la cepa 23.6 a los cambios de temperatura típicos de un ciclo diario partiendo de una tasa de crecimiento limitada y baja (como es el caso en los microorganismos que viven en suelos).

Para comenzar el cultivo en el bioreactor, se prepararon precultivos de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 en 20 ml de medio de cultivo NB líquido (composición por litro: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona) y se incubó a 60° C durante toda la noche. A la mañana siguiente, 0,5 ml del cultivo sirvieron para inocular un matraz con 50 ml de NB que se incubó a 60° C hasta alcanzar la fase exponencial. Estas células serán el inóculo para los biorreactores. Los biorreactores funcionaron en condiciones aeróbicas con un caudal de aire de 3 l.min⁻¹ y una velocidad de agitación de 500 r.p.m. El pH se mantuvo a 7.0 mediante la adición automática de ácido clorhídrico 0,1 M y la formación de espuma se evitó añadiendo 1 ml del agente antiespumante (Xiameter ACP-1500, The Dow Chemical Company, Michigan; EEUU) cada 12 horas.

Se iniciaron dos experimentos individuales de quimiostato a velocidades de dilución de 0,025 h⁻¹. Después de alcanzar la estabilidad en el quimiostato se iniciaron los ciclos de temperaturas controlados por un baño con refrigeración AP07R-20 (VWR, Atlanta, Georgia, USA). Este tipo de baños permite programar cambios de temperaturas con una precisión de 0,5° C durante tiempos determinados.

El ciclo de temperatura oscila entre 60° C (óptima de crecimiento para la cepa 23.6 y temperatura fácilmente alcanzada en la superficie de suelos del sur de España) y 20° C (temperatura típica de suelo de latitudes medias y una

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

temperatura mucho más baja del considerado límite inferior de temperatura de crecimiento para *P. thermoglucosidasius* que es 40° C). La diferencia entre los dos experimentos reside en la configuración de los ciclos de temperatura (Figura 5.3). En el experimento A la bajada y subida de temperaturas se lleva a cabo durante 4 horas a razón de medio grado cada 3 minutos y el tiempo de temperatura constante (20 y 60° C) es de 8 horas. En el experimento B los cambios entre temperaturas se acortan a 3 horas (un grado cada 4,5 minutos) y el tiempo a 20° C se aumenta a 10 horas.

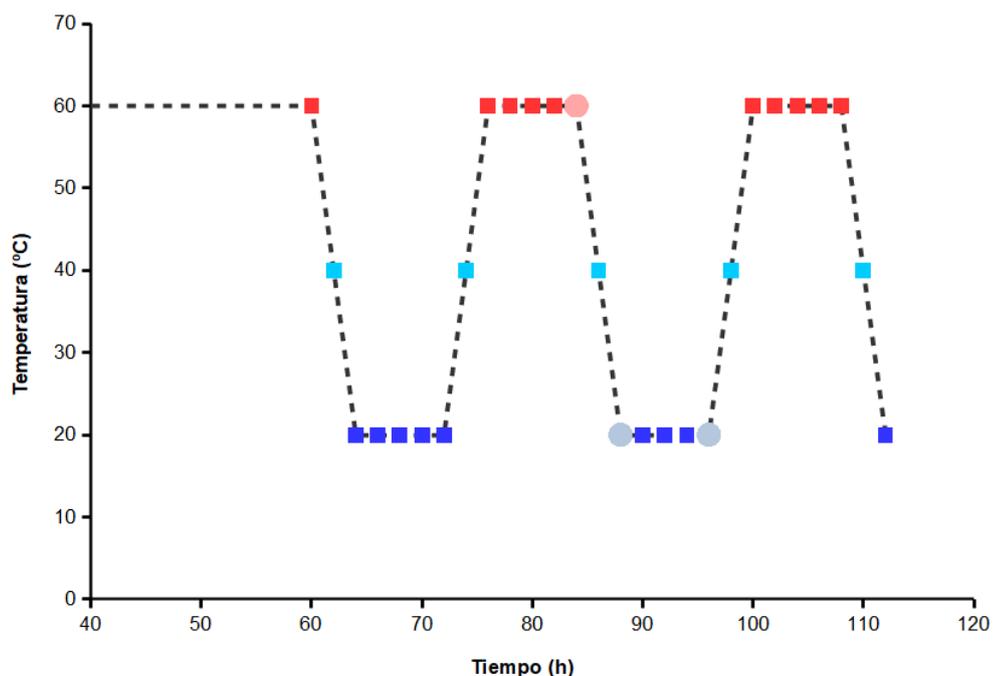


Figura 5.3. Ciclo de temperatura simulando un ciclo diario en un suelo del sur de España. Este ciclo está basado en datos de temperatura recogidos en la superficie de un suelo en Sevilla (Figura 5.1). Los puntos representados con un círculo hacen referencia a las muestras utilizadas para el análisis del transcriptoma.

Capítulo 5

Todas las medidas llevadas a cabo para la monitorización de los experimentos y el análisis de las muestras (viabilidad, UFC, número de células y biovolumen) se han realizado de la misma manera que en los procedimientos descritos en el capítulo 2.2.3. Para llevar a cabo estas medidas, se tomaron muestras de 1 ml en cada uno de los puntos del ciclo representados en la figura 5.3. exceptuando los puntos representados con un círculo en los que se tomaron 7 ml. Estos puntos fueron elegidos para el análisis transcritoómico y coincide con el momento del ciclo en el que las temperaturas son bajas. Se van a denominar T0: se corresponde con la muestra a 60° C antes de comenzar el descenso de temperatura; T1: primera muestra con una temperatura de 20° C y T3: muestra después de 8 o 10 horas a 20° C.

La cepa 23.6 no crece en el laboratorio en medio de cultivo en un matraz o tubo a una temperatura inferior de 40° C por lo que al ser un cultivo en continuo se ha tenido en cuenta la pérdida de células teórica durante el tiempo de bajas temperaturas debido a la reducción de la tasa de crecimiento en estos períodos a menor temperatura. La concentración de células/ml que se pierden es equivalente al flujo de las bombas peristálticas, 45 ml/h. En este estado el número de células en el bioreactor disminuirá progresivamente y los nutrientes se acumularán ya que se espera una disminución de la tasa metabólica de las células en el bioreactor al disminuir la temperatura. El número de células teóricas representa el número de células esperadas en el cultivo como consecuencia de que no ha habido crecimiento de la cepa 23.6 a temperaturas inferiores a 40° C y la tasa de dilución (45 ml/h) programada en el quimiostato. Cada hora que el cultivo este a 20° C se pierden 45 ml de medio con células y depende de la concentración (células/ml, que son enumeradas) que hay en el bioreactor en el momento que la temperatura disminuye a 20° C. Al conocer el número de células totales en el bioreactor y el

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

número de células que se pierden por el efluente podemos predecir el número de células teóricas que debería haber en el bioreactor durante la incubación a 20° C si no hubiese crecimiento en el número de estas células.

Para el aislamiento de ARN, 2 ml de las muestras T0, T1 y T3 se centrifugaron durante 5 min a 6000 rpm y 4° C. Los sobrenadantes se desechan y las células fueron congeladas a -80° C. Cada muestra se hizo por triplicado. Para favorecer la lisis celular y aumentar la cantidad de ARN extraído de las muestras, las células primero fueron tratadas con una solución de lisozima (1 µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el ARN en las muestras fue extraído con el kit ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep (Zymo research, Irvine, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La plataforma de secuenciación del ARN utilizada fue Illumina HiSeq que la realizó la empresa BGI Genomics (Hong Kong, China). Tras el filtrado de calidad, la secuenciación bidireccional resultó en una media de 95 millones de lecturas por muestra con un tamaño de 150 bases .

El análisis de los resultados de secuenciación por ARN-seq siguió principalmente el protocolo descrito por Perteza et al. (2016) como ya se ha mencionado anteriormente (Materiales y Métodos 4.2.2). Se utilizaron dos muestras como referencia, T0, para ver las diferencias de expresión entre altas y bajas temperaturas y T1 para comparar la diferencia a 20° C desde el inicio de exposición a esta temperatura hasta después de 10 horas de incubación a esa temperatura.

Un test de comparación por pares calculando los intervalos de confianza en cada caso (Sokal y Rohlf, 2011) sirvió para determinar el nivel de significación de las diferencias encontradas entre las distintas condiciones experimentales. Los

Capítulo 5

análisis fueron realizados diferenciando entre genes reprimidos (inhibidos o cuya expresión se redujo), sobreexpresados (activados o con mayor expresión en las condiciones analizadas) y constitutivos (aquellos que no muestran diferencias entre las condiciones estudiadas).

Los genes y sus valores de expresión se agruparon en función de su categoría COG (capítulo 3).

5.4. Resultados

Se realizaron dos experimentos de ciclo de temperatura entre 60° C (temperatura óptima de crecimiento de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6) y 20° C (temperatura común de suelos de latitudes medias). Al tratarse de un sistema de cultivo continuo (quimiostato en su fase inicial a 60° C), la entrada de medio y salida de sobrenadante y células se mantuvo a un flujo constante de 45 ml/h. Sin embargo, al reducir la temperatura, a 20° C, *P. thermoglucosidasius* 23.6 no fue capaz de crecer en número de células, por lo tanto, durante el tiempo que el cultivo se encuentre a esta temperatura la concentración de células en el bioreactor disminuye (por la dilución de salida de cultivo) y los nutrientes se acumulan (por entrada de medio fresco que no es completamente consumido durante esta fase a baja temperatura). En el experimento A la células estuvieron 8 horas a 20° C (en cada ciclo) lo que supone una renovación del medio de 360ml cada ciclo, mientras que en el experimento B estuvieron 10 horas (por ciclo) lo que corresponde a 450ml de medio nuevo por ciclo que diluyeron el cultivo. Estas diferencias son importantes ya que el experimento A se diluye menos (pérdida de células y entrada de medio nuevo) que en el B y esto se ve reflejado en el crecimiento de la cepa 23.6 porque cada célula dispone de una concentración de

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

nutrientes mayor en el momento que sube la temperatura y se alcanzan los 60° C (Figura 5.4).

En la Figura 5.4 se representa el número de células totales en el bioreactor junto con el porcentaje de células en división a lo largo de dos ciclos de temperaturas. Se ha establecido como células en división aquellas que tienen un biovolumen mayor a 3 μm^3 . Las células con un biovolumen inferior o no se están dividiendo o se acaban de separar.

En ambos experimentos durante el primer ciclo de temperaturas observamos que a 20° C el número de células totales se mantiene constante y no hay crecimiento. Esto se ve reflejado porque el número de células totales sigue la misma tendencia que el número de células teóricas (Figura 5.4), representada por la línea gris e indica el número de células esperadas en el bioreactor como consecuencia del factor de dilución (45ml/h). En el segundo ciclo de temperatura (y en ambos experimentos) el número de células totales está ligeramente por encima del número de células teóricas (línea gris) indicando que se están perdiendo menos células de lo esperado o, dicho de otro modo, hay un aumento en el número de células (crecimiento) en el bioreactor.

Capítulo 5

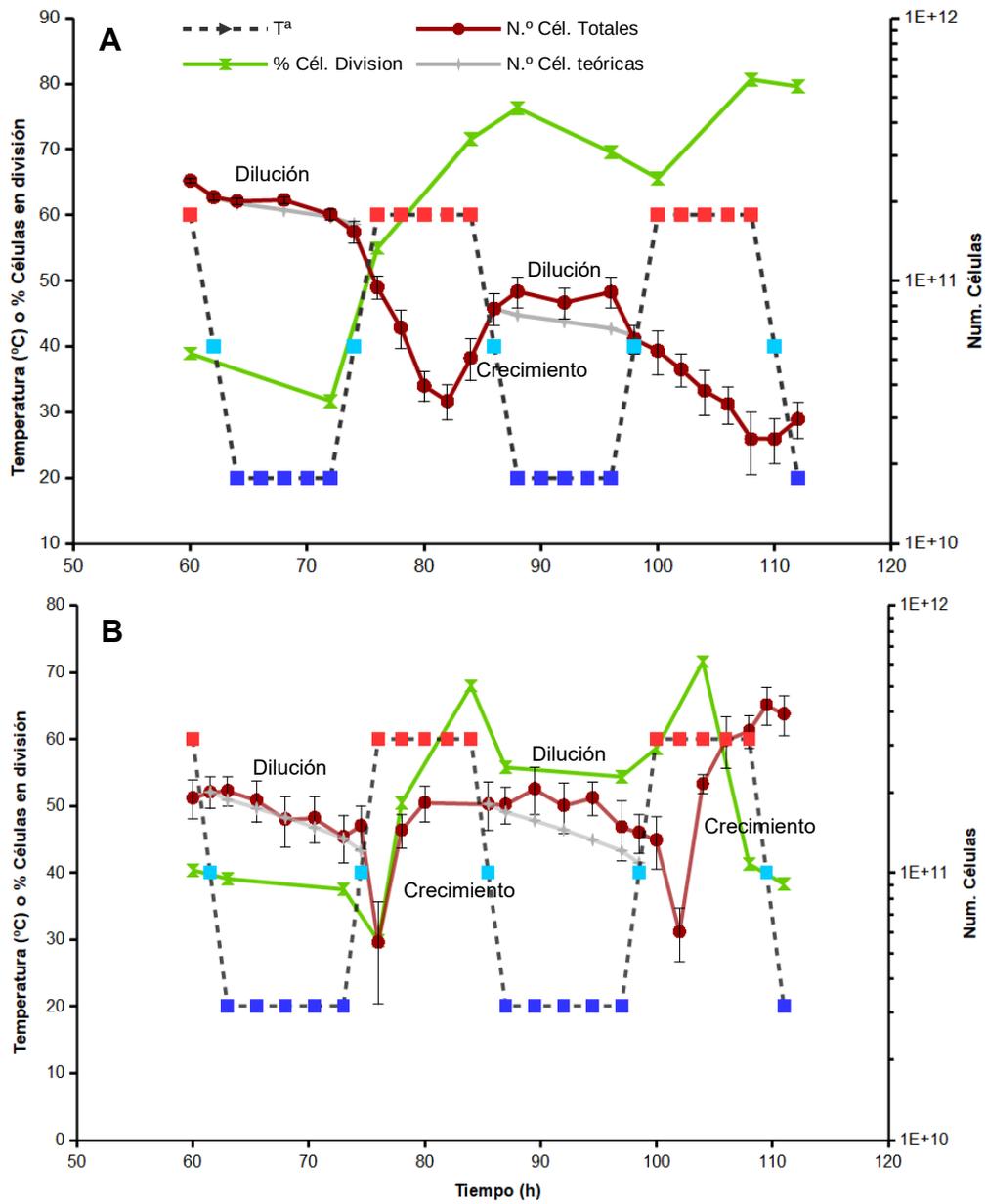


Figura 5.4. Evolución del número total de células de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 y del porcentaje de células en división a lo largo de dos ciclos de temperatura (60-20° C). Experimento A, con 8 h de exposición a 20°C y experimento B, con 10 h de exposición a 20°C.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

El estado de crecimiento se indica por el porcentaje de células en división. En el primer ciclo de temperatura de ambos experimentos el porcentaje de células en división ($>3 \mu\text{m}^3$) a 20° C es del 40% y se mantiene constante. En el segundo ciclo, cuando la temperatura desciende a 20° C el porcentaje de células en división es superior, 80% en el experimento A y 60% en el B. En el experimento A el porcentaje de células en división disminuye durante el periodo de incubación a 20° C y esto podría explicar porque el número de células totales y el número de células teóricas no coinciden. Las células que estaban en un estado avanzado de la citocinesis continuaron con la separación durante el periodo de incubación a 20° C, completando el proceso de división.

Al subir la temperatura y alcanzar los 60° C el número de células totales disminuye inicialmente para posteriormente recuperarse. En el experimento A la disminución es mas acentuada y la recuperación mas lenta, iniciándose poco antes de volver a disminuir la temperatura (Figura 5.4 (A)). Sin embargo, el porcentaje de células que tienen un biovolumen mayor a $3 \mu\text{m}^3$ aumenta desde el momento que se alcanzan los 60° C llegando a valores del 70 y el 80 % al final del periodo de incubación a 60° C confirmando un crecimiento activo en ese periodo de exposición a 60°C.

La viabilidad celular durante los experimentos de ciclo de temperatura no se ve comprometida aunque en el experimento A, la unidad formadora de colonias (UFC) disminuye drásticamente (tres órdenes de magnitud menos) después de 8 horas a 60°C (Figura 5.5) pero posteriormente se recupera durante el tiempo de bajada de temperatura. Por el contrario, en el experimento B no hay cambios significativos en la UFC a lo largo de los ciclos de temperatura.

Capítulo 5

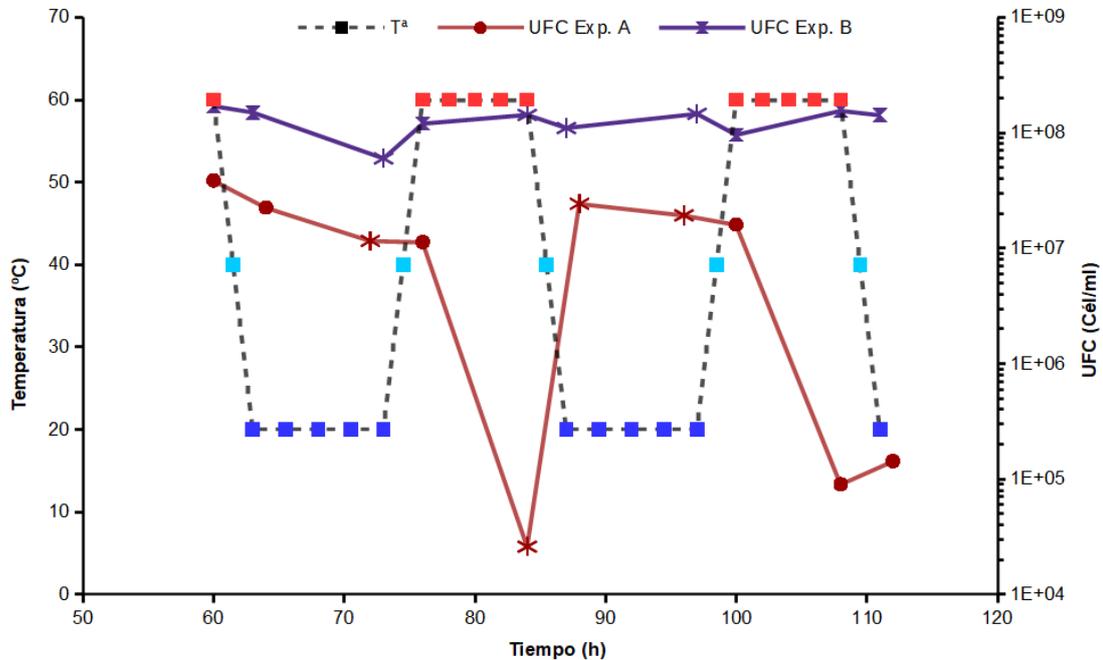


Figura 5.5. Evolución del número de UFC a lo largo del ciclo de temperaturas entre 60° C y 20° C. Mientras que en el experimento A el número de UFC disminuye al final de los períodos de 60° C, en el experimento B se mantiene aproximadamente constante el número de UFC a lo largo del tiempo.

El descenso de tres ordenes de magnitud de la UFC a 60° C (Figura 5.5) en el experimento A no se corresponde con la disminución de células totales (Figura 5.4). Posiblemente, esta diferencia se deba a que las células del experimento A son de mayor longitud que las del experimento 2, hecho que se ve mas acentuado al final del periodo de incubación a 60° C (Figura 5.6). En concreto, durante esta fase del ciclo mas de un 12 % de células tienen un volumen superior a 8 μm^3 y se han medido volúmenes máximos de 40,7 μm^3 . La aparición de células largas se correlaciona con el recuento de UFC, cuando las células largas se colocan en una

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

placa de NB forman una sola colonia pero en realidad representan múltiples células.

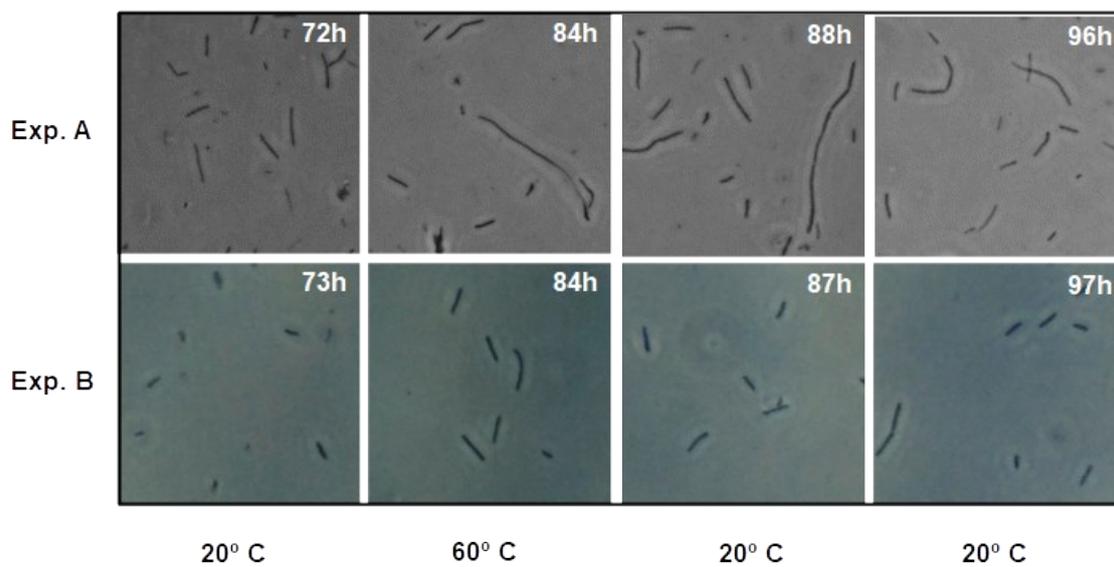


Figura 5.6. Cambio morfológico de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 durante el cultivo en quimiostato con ciclos de temperatura. En el experimento A las células presentan una morfología mas alargada. Las imágenes seleccionadas se corresponden con los puntos representados con un asterisco en la figura 5.5.

La abundancia de células es el resultado del equilibrio entre su tasa de crecimiento y su mortalidad. No se descarta que la incubación a 60° C después de un periodo de bajas temperaturas afecte a la viabilidad celular ya que se registra un descenso en el número de células totales superior al factor de dilución. En el experimento A el descenso se prolonga mas que en el experimento B. Esta diferencia posiblemente se deba a la configuración de los ciclos de temperatura. Al romper la estabilidad del cultivo en quimiostato la tasa de crecimiento se ve afectada. Las células del experimento B disponen de mas nutrientes (mejores condiciones, tras 10 h de dilución a 20° C) al inicio del periodo de incubación a 60°

Capítulo 5

C y entran rápidamente en fase de crecimiento exponencial. Las células se dividen con una tasa de duplicación de 2,3 horas en el primer crecimiento del ciclo y de 1,6 horas en el segundo (Figura 5.4 (B)). Sin embargo las células del experimento A, al tener un período más corto (8 h) a 20°C, disponen de menos nutrientes y tiene una tasa de duplicación de 3,4 horas en la primera fase de crecimiento (Figura 5.4 (A)). Posiblemente esta diferencia en la tasa de crecimiento explica la diferencia de tamaño celular entre ambos experimentos (Figura 5.6). En el capítulo 2 se ha descrito la correlación negativa entre la tasa de crecimiento y el tamaño celular que ha sido utilizada para comprender la evolución de estos cultivos en los experimentos A y B.

Durante el ciclo de temperatura generado (60-20° C), la división celular empieza cuando la temperatura aumenta a valores superiores de 40° C. Sin embargo, la separación de las células en dos células hijas es mas lenta en el experimento A (alargamiento celular) y no se detiene cuando la temperatura desciende a 20° C. Este fenómeno genera un aumento del número de células que viene derivado de un aumento previo en biomasa durante su exposición a 60° C. Durante todo el experimento de ciclos de temperatura no se detectó la producción de esporas, la viabilidad se mantuvo constante y no se observó daño celular que conduzca a rotura celular. Las diferencias en la UFC se corresponden al aumento del tamaño celular que dio una visión sesgada de la situación de crecimiento en el bioreactor en las condiciones de temperatura estudiadas.

5.4.1. Análisis del transcriptoma

Para el análisis del transcriptoma seleccionamos 3 tiempos del ciclo de temperatura (representados con un círculo en la figura 5.3): T0 (60° C), proviene de un estado de crecimiento lento; T1, primera muestra a 20° C y T3, después de 10 horas de incubación a 20° C. Si tomamos como referencia T0 comparamos la respuesta transcripcional ocasionada por el descenso de la temperatura, mientras que si tomamos como referencia T1 comparamos la regulación transcripcional durante el periodo de incubación a 20° C.

Al disminuir la temperatura encontramos que aproximadamente el 66 % de los genes de la cepa 23.6 se expresa diferencialmente (un listado de estos genes expresados diferencialmente entre estas condiciones se muestran en la Tabla 5.1), siendo la represión la respuesta transcripcional mayoritaria con un total de 1742 genes en el primer punto a 20° C y 1884 genes al final del periodo de incubación a 20° C. Los genes sobreexpresados representan aproximadamente un tercio del total de genes regulados significativamente y se mantiene prácticamente constante durante el tiempo de incubación a 20°C. Destacar que el número de genes que mantienen constante su nivel de expresión es elevado y solo se reduce en unos 100 genes en T2.

Si tomamos como referencia T1 (20° C), el 85 % de los genes mantienen su nivel de expresión, mientras que el 15 % se expresa significativamente siendo la represión la regulación principal (470 genes). Resaltar que 167 genes se sobreexpresan tras el periodo de incubación a 20°C.

Capítulo 5

Tabla 5.1. Descripción general comparativa del número de genes en los que se observan diferencias en sus niveles de expresión durante un ciclo de temperaturas

Tiempo	Temperatura °C	Número de genes con diferencias de expresión significativas			Nivel constante de expresión
		Total	Reprimidos	Sobreexpresados	
T0	60	N/A Condición de referencia			
T1	20	2670	1742	928	1521
T2	20	2781	1884	897	1410
T1	20	N/A Condición de referencia			
T2	20	637	470	167	3554

La cepa en estudio era una cepa termófila por lo que esperaríamos que la gran mayoría de genes se reprimiesen al descender la temperatura por debajo del mínimo del rango de temperatura de crecimiento (40-70° C). Sin embargo, lo más relevante es que la gran mayoría de los genes mantienen la misma expresión de ARN en sus células, después de un periodo de incubación a 20° C, incluso la cantidad de ARN por célula se mantiene constante (Figura 5.7).

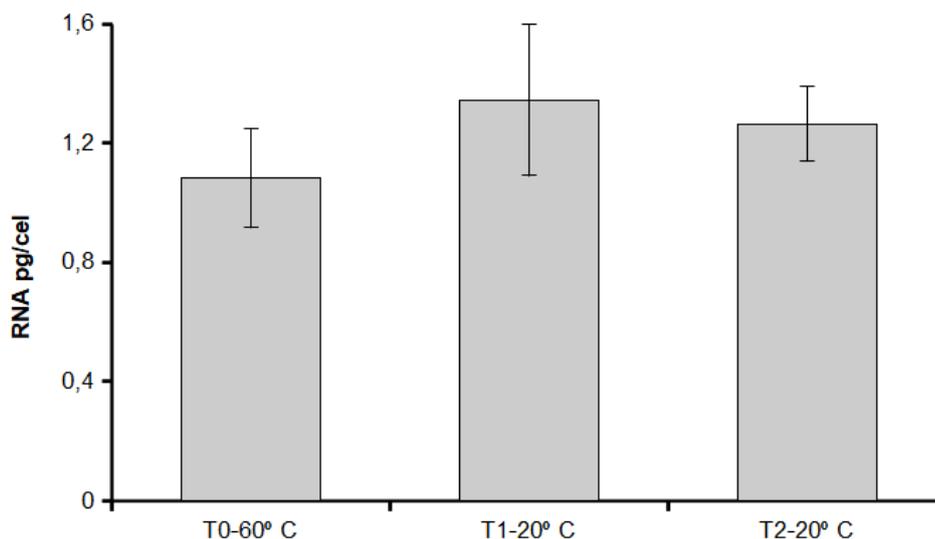


Figura 5.7. Cuantificación del ARN por célula a lo largo de un ciclo de temperatura.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

Con el fin de buscar una respuesta transcripcional mas específica durante el ciclo de temperatura se ha hecho un análisis de los datos en base a categorías funcionales COG.

Al comparar la expresión diferencial de las categorías COG tomando como referencia T0 (60° C) (Figura 5.8) observamos que mayoritariamente entre un 40-60 % de los genes de cada COG se reprimen al disminuir la temperatura a 20° C. Las barras en rojo muestran las categorías COGs que presentan mayor número de genes sobreexpresados (aproximadamente un 40%), llegando incluso a superar a los genes reprimidos. Estas categorías son: transporte y metabolismo de nucleótidos (F); traducción, estructura ribosómica y biogénesis (J); transporte de iones inorgánicos (P); tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (U); mecanismos de defensa (V). Solo se representa el análisis transcripcional de una muestra (T2) a baja temperatura porque con la otra muestra los resultados obtenidos son muy similares.

Aunque la represión génica es la respuesta mayoritaria de los genes cuando la cepa 23.6 pasa de una temperatura óptima de crecimiento (60° C) a una temperatura que está fuera de su rango de crecimiento, vemos que alrededor del 20 % de los genes de cada grupo COG están sobreexpresados (Figura 5.8). Esto sugiere que la célula activa un mecanismo de respuesta general ante el descenso de temperatura.

Capítulo 5

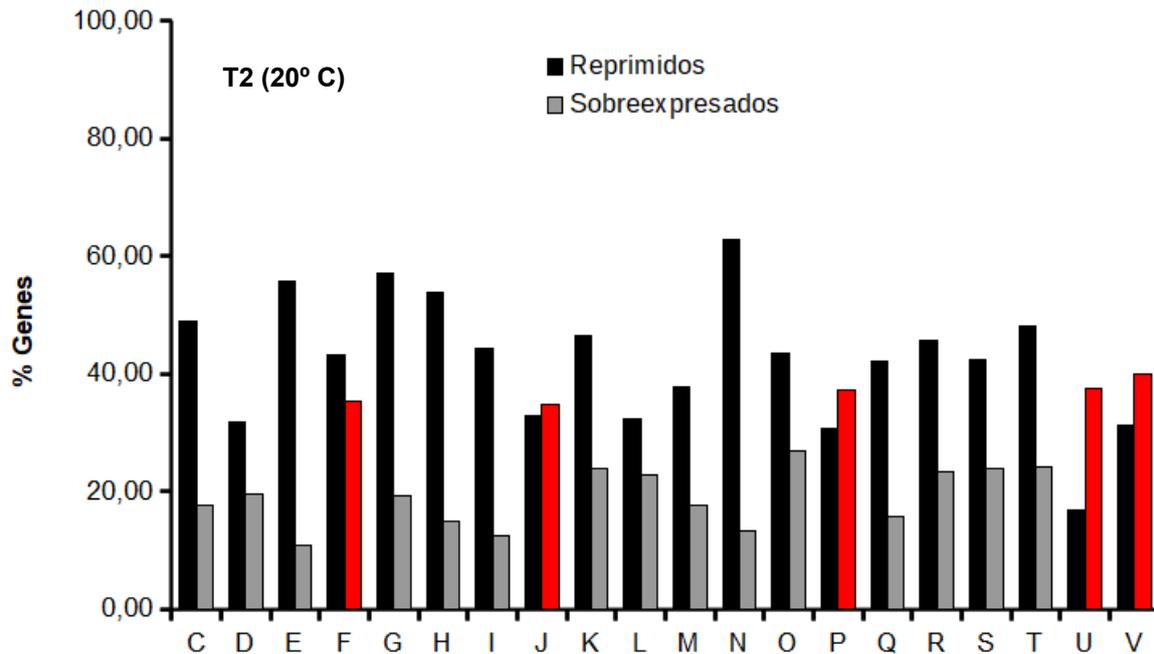


Figura 5.8. Porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados en cada categoría COG tomando como referencia la expresión transcripcional a 60° C (T0). En rojo aquellas categorías COG que muestran un nivel elevado de genes sobreexpresados.

Por otro lado, si comparamos la expresión diferencial de las categorías COG tomando como referencia la primera muestra a baja temperatura (20° C) (Figura 5.9) vemos que la respuesta comparativa de los niveles de transcripción que presentan valores significativos es muy baja, dominando en todos los grupos COG la represión.

Hay algunos grupos COG que presentan genes sobreexpresados y forman una parte importante de genes sobreexpresados en estas condiciones tras un largo período a 20°C (barras en rojo, figura 5.9). Estos grupos COG están relacionados con la obtención de energía: producción y conversión de energía (C); transporte y

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

metabolismo de aminoácidos (E); transporte y metabolismo de carbohidratos (G) y biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios (Q). También hay genes sobreexpresados en el grupo COG de modificación postraduccional (O).

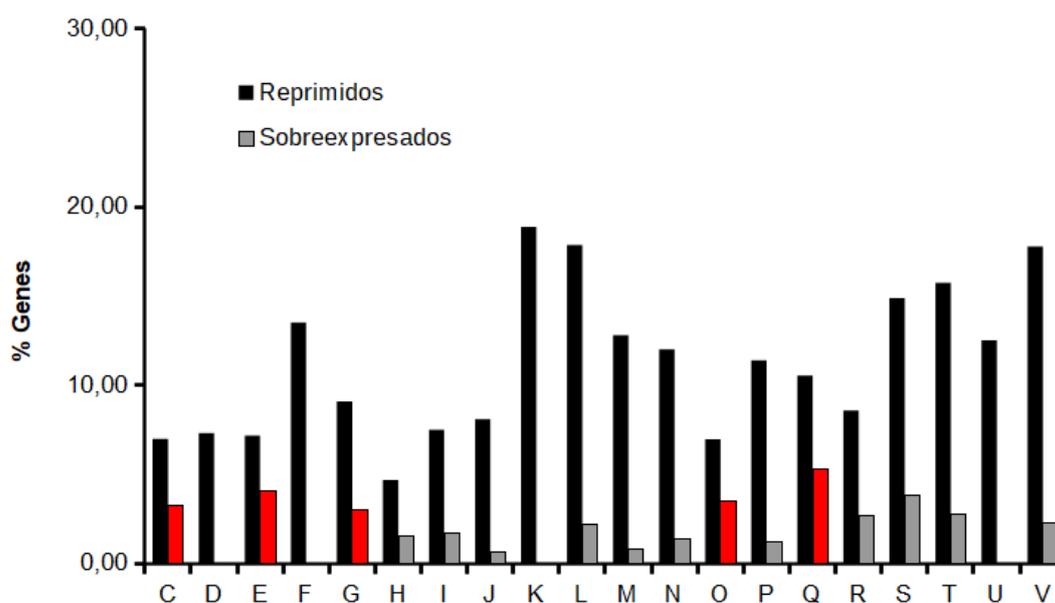


Figura 5.9. Porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados en cada categoría COG tomando como referencia la expresión transcripcional a 20° C (T1).

Para obtener mas información sobre respuesta transcripcional de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 a la bajada de temperatura, analizamos los principales reguladores transcripcionales sobreexpresados: Factor sigma de la ARN polimerasa (inicio de la transcripción), *marR* (reguladores de resistencia a antibióticos y estrés oxidativo), *lysR* (regulador general involucrado en la virulencia, metabolismo, motilidad etc), *tetR* (represor transcripcional), *gntR* (regulador general del metabolismo), *merR* (activador de la transcripción), *nusA* (parte del complejo procesivo de transcripción y antiterminación del ARNr), *mntR*

Capítulo 5

(regulador de la homeostasis de manganeso y cadmio), proteínas de choque frío (cold shock protein, csp) etc.

El aumento en la expresión de los reguladores transcripcionales a 20° C concuerda con la sobreexpresión de genes implicados en la síntesis de proteínas ribosomales 30s y 50s; factores de iniciación de la traducción if-1, if-2 e if-3; genes involucrados en la glucólisis (*gap*, *pfkA*, *pyk*); transportadores de azúcares ABC ; transportadores de iones inorgánicos (fosfato, manganeso, hierro, zinc, etc) sistemas de fosfotransferasa (*ptsP*), genes involucrados en la quimiostaxis y movimiento flagelar (*motB*, *fliL*, *pilM*), proteínas de secreción (*secY*), etc.

Como describimos en el capítulo 2, el genoma principal (Tnp1) consta de 100 ARN transferentes (ARNt) y 5 ARN no codificantes (ARNnc). Los datos de transcriptómica muestran que 81 ARNt y 3 ARNnc (endoribonucleasa P, 6S y 4.5 S) aumentan significativamente cuando la temperatura baja a 20° C (Figura 5.10). Estos ARNnc están involucrados en la biosíntesis de ARNt (*rnpB*), son reguladores transcripcionales (6S) y mantienen la viabilidad celular (4.5S). Además, genes relacionados con la modificación de los ARNt (*truA*, *truB*) también están sobreexpresados. Todo esto indicaría que la cepa termófila 23.6 mantiene un metabolismo activo durante el periodo de incubación a 20° C.

Respuesta fisiológica y transcripcional de *Parageobacillus thermoglucosidarius*
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

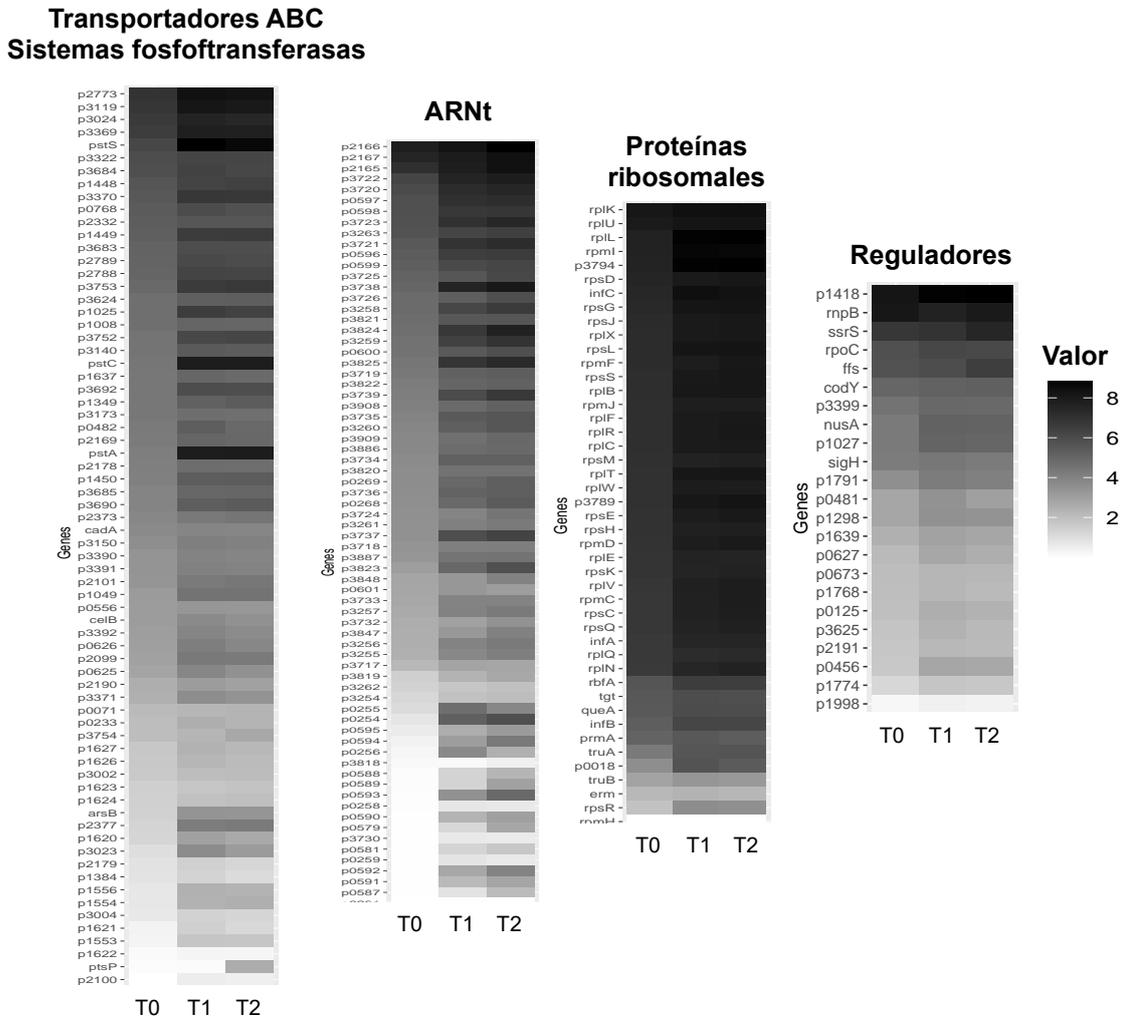


Figura 5.10. Regulación transcripcional de rutas metabólicas generales a diferentes temperaturas (T0-60° C, T1-20° C y T2-20° C). Se muestran los niveles de expresión relativa de cada gen. Las indicaciones de color son negro para una mayor expresión y blanco para una expresión disminuida.

Capítulo 5

La característica más destacada de la expresión transcripcional de *Parageobacillus thermoglucosidarius* 23.6 cuando se encuentra a temperaturas bajas (20° C) es que la cantidad de ARN de la gran mayoría de los genes se mantiene constante. Esto sugiere que no hay degradación del ARN o que la síntesis de ARN supera a la degradación, permitiendo a las células responder rápidamente cuando las condiciones vuelvan a ser óptimas.

4.3.4. Análisis transcripcional de Tmp2, Tmp3 y Tmp4.

Las moléculas Tmp2, Tmp3 y Tmp4 muestran una expresión transcripcional diferente durante el ciclo de temperatura (Figura 5.11). En este caso representamos los tres tiempos, tomando como referencia ambas temperaturas T0 (60° C) y T1 (20° C).

De modo similar al capítulo 4, Tmp2 también mostraba una regulación transcripcional similar a Tmp1 (Figura 5.11), al disminuir la temperatura a 20° C entre el 40 y el 60 % de los genes se reprimen y durante el periodo a 20° C la expresión de ARN se mantiene constante. De igual modo que Tmp1, hay genes en Tmp2 que se sobreexpresan a temperaturas de 20°C.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

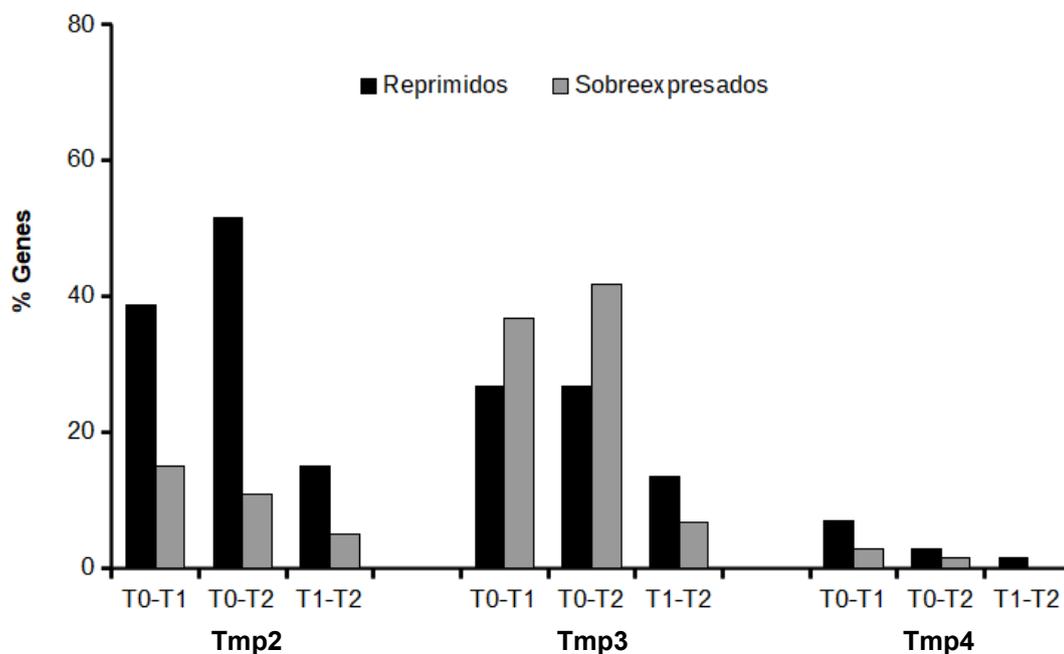


Figura 5.11. Comparaciones por pares de los resultados de transcripción para tres elementos genómicos (tmp2, tmp3 y tmp4) de *P. thermoglucosidasius* 23.6.

En el caso de Tmp3 se observa un efecto contrario a Tmp2, la sobreexpresión génica es la situación dominante cuando baja la temperatura (40-50 % de los genes). Recordamos que Tmp3 tiene un elemento integrativo y conjugativo en su secuencia (COG L y U) (Capítulo 3). Los genes de Tmp1 categorizados en el grupo COG U también se sobreexpresan cuando la temperatura desciende a 20° C (Figura 5.6), en concreto el gen *secY* junto con otros que forman parte del sistema de secreción están regulados positivamente, indicando que este tipo de funciones se activan cuando la célula detecta una bajada de temperatura.

En Tmp4, entre el 90 y el 95% de los genes no tienen una expresión significativa durante el ciclo de temperatura y los valores normalizados son muy bajos o

Capítulo 5

directamente no muestran expresión (permanecen indetectables). Considerando que se trata de un fago termófilo y que la cepa 23.6 inicia el ciclo de temperatura a una tasa de crecimiento baja ($0,025 \text{ h}^{-1}$), caracterizada por una fuerte represión de los genes de Tmp4 (capítulo 4), cabía esperar que los genes de Tmp4 no se expresasen cuando la temperatura disminuye y ello se mantenga durante el período a 20° C (Figura 5.11).

Los espaciadores en secuencias CRISPR descritos en el capítulo 4 como posibles reguladores de la expresión de los genes de Tmp4 a tasa de crecimiento baja están reprimidos con respecto a su estado en quimiostato, o no muestran expresión, durante el ciclo de temperatura (Figura 5.12.)

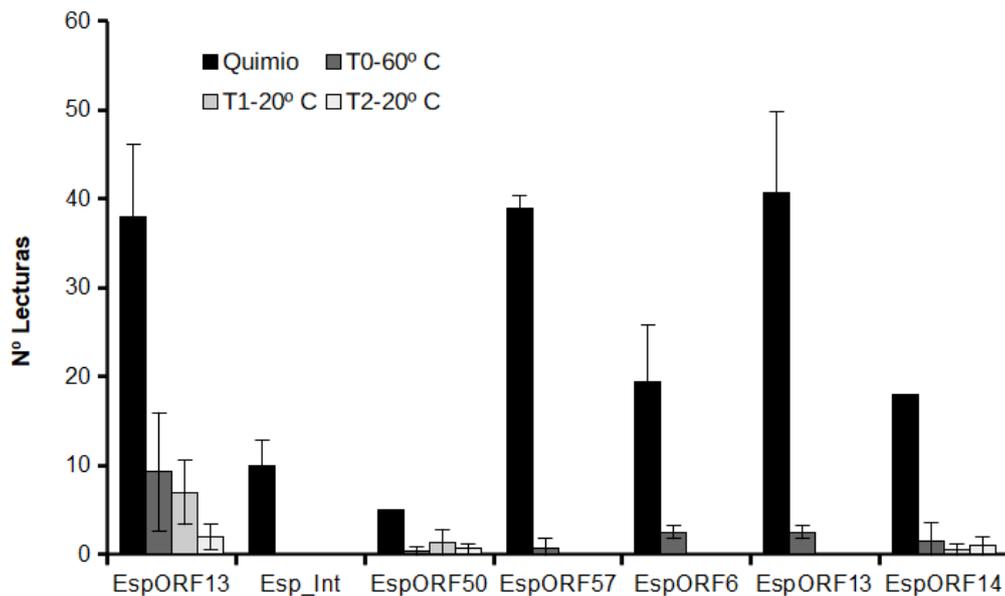


Figura 5.12. Número de lecturas obtenidos durante la secuenciación del ARN para los distintos espaciadores de *P. thermoglucosidasius* 23.6 (Figura 4.12) durante el cultivo en quimiostato y durante el ciclo de temperatura (T0, T1, T2).

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

La disminución en el número de lecturas de los espaciadores durante el ciclo de temperatura nos manifiesta que al descender la temperatura a 20° C hay una fuerte degradación de estos oligonucleótidos de ARN y que en este caso no serían los responsables de mantener la represión de los genes de Tmp4. Posiblemente, la bajada de temperatura y la escasez de nutrientes disponibles cuando las condiciones vuelven a ser óptimas (60° C) reprimen la expresión de Tmp4 ya que las células no se encuentran en un período de elevado y sostenido crecimiento para llegar a activar la expresión génica generalizada en Tmp4.

5.5. Discusión

Para comprender mejor como los microorganismos termófilos, en concreto los pertenecientes al género *Parageobacillus*, pueden persistir en ambientes fríos o durante periodos prolongados a baja temperatura, se realizaron dos experimentos en un quimiostato simulando temperaturas registradas en la superficie del suelo durante un día completo partiendo de un estado de escasez nutricional (típico del medio natural). La diferencia entre los dos experimentos fue la configuración temporal del ciclo de temperaturas. En el experimento B el tiempo de incubación a 20° C es mayor que en el A y, por tanto, las células disponen de más nutrientes en el momento en el que las condiciones de crecimiento pasan a ser óptimas (la temperatura aumenta hasta llegar a 60° C). Esta diferencia reflejaría una adaptación a condiciones en las que la disponibilidad de nutrientes no es constante y es parte de la variabilidad existente en el ecosistema suelo, que consecuentemente afectará a los microorganismos que en el habitan.

Capítulo 5

Los análisis transcriptómicos mostraron la regulación génica de esta especie cuando las células de *P. thermoglucosidasius* 23.6 se encuentran en condiciones que no son óptimas para su crecimiento.

A la temperatura de 20° C y una tasa de crecimiento específica inicial de 0.025 h⁻¹, la cepa *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 no crece (aumento de biomasa) pero mantiene su viabilidad. Marchant et al. (2008) llevó a cabo experimentos de viabilidad a 25° C con una cepa de *Geobacillus thermoleovorans* y observó que el porcentaje de células vivas disminuía rápidamente. Estos experimentos los realizaron en matraces (cultivos discontinuos o “batch”) donde las condiciones del medio cambian a lo largo del tiempo pudiendo afectar a la viabilidad celular. Sin embargo, cuando estos autores incubaron la cepa estudiada a 4° C durante 9 meses observaron un crecimiento muy lento (Marchant et al., 2008). Este crecimiento alejado de las temperaturas óptimas lo justificaron considerando que la tasa de mortalidad fue muy inferior a la tasa de crecimiento. En nuestros experimentos observamos que la mortalidad a 20° C es insignificante y que incluso algunos procesos relacionados con la división celular (como la separación celular) no se detienen ya que las células en un estado avanzado de la división fueron capaces de completar el ciclo celular a temperatura de 20° C. Teniendo en cuenta que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 puede crecer a tasas de crecimiento muy bajas (capítulo 3) y que nuestros resultados confirman que las temperaturas bajas no influyen negativamente en su capacidad de mantener su viabilidad, cabría esperar que estas células presentasen un crecimiento lento cuando las condiciones no son óptimas debido a diversos factores.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

Después del periodo de incubación a 20° C cuando se alcanza la temperatura óptima de crecimiento (60° C) se observa un descenso en el número de células totales (mas pronunciado en el experimento A), indicando posibles eventos de mortalidad celular. Las altas temperaturas tienen efectos importantes sobre las propiedades estructurales y fisiológicas de las bacterias, afectando las membranas, ADN, ARN, ribosomas, etc. (Russell, 2003). Los microorganismos termófilos no están exentos de esos efectos aunque hasta cierto modo les favorece ya que pueden aproximarse a su temperatura óptima de crecimiento. Aunque la viabilidad celular se vea comprometida al subir la temperatura, el descenso pronunciado de células totales y UFC en el experimento A se podría explicar mediante el cambio en la morfología celular (Figura 5.6). Overkamp et al., (2015) observó que el aumento del tamaño celular de *Bacillus subtilis* durante el crecimiento en retentostato generaba un descenso en la UFC ya que las células largas están constituidas por varias células pero solo darían lugar a una colonia. Con respecto al número total de células, en el experimento A la disponibilidad de nutrientes por célula es menor que en el B cuando se alcanzan las condiciones óptimas de crecimiento (a 60° C tras un período a 20° C) y esto se ve reflejado en una tasa de crecimiento menor ya que durante el experimento el crecimiento en quimiostato es limitado por el aporte de nutrientes. En estas condiciones las células se alargan (Capítulo 3; Overkamp et al., 2015) y tardan mas tiempo en separarse por lo que no observaríamos un aumento en el número de células. Si el mantenimiento de la abundancia celular es un equilibrio entre la tasa de crecimiento y la tasa de mortalidad (Marchant et al., 2008; Pedrós-Alió, 2012), al aumentar la temperatura en el experimento A inicialmente no detectaríamos un crecimiento y la mortalidad existente (Russell, 2003) daría lugar a un descenso en el número de células totales hasta que completasen la división. Por el contrario en el experimento B al disponer de mas nutrientes las células tienen una tasa de

Capítulo 5

crecimiento mayor y fueron capaces de terminar su ciclo de división antes, no se acumularon células largas en el bioreactor y, por lo tanto, el descenso en el número de células totales es mucho menor y solo se observa al inicio de la fase de incubación a 60° C.

Una de las respuestas más importantes que presentan las especies del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* ante situaciones adversas es la formación de esporas como estructuras de resistencia (Nazina et al., 2001). El estrés térmico (por baja temperatura) originado por los ciclos de temperatura junto con el estrés nutricional (capítulo 3) no induce la formación de esporas en la cepa 23.6. De hecho, según nuestro conocimiento, no existen citas de inducción de esporas por reducción de la temperatura en *Bacillales*, aunque la formación de esporas es una respuesta típica a aumentos de temperatura extremos para numerosas bacterias Gram-positivas. Esas condiciones de variaciones de temperatura son típicas de los suelos y la periodicidad de las condiciones ambientales, como las climáticas y ciclos diarios, lo que confirma que la cepa 23.6 al igual que otras cepas de *Geobacillus/Parageobacillus* (Marchant et al., 2002; Portillo et al., 2012) se encuentran en los suelos en forma vegetativa y participan activamente en el ecosistema suelo y mantenimiento de su salud.

Para comprender mejor cómo las bacterias termófilas a nivel molecular se adaptan a las bajas temperaturas, se realizó un estudio transcriptómico para identificar genes que se expresan diferencialmente a 20° C. Un gran número de reguladores de la transcripción, *marR*, *lysR*, *tetR*, *gntR*, *merR*, *nusA* y *mntR* se regularon significativamente al inicio del periodo de incubación a 20° C. La sobreexpresión de estos reguladores transcripcionales indica que las células

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

detectan el descenso de temperatura y ponen en marcha un programa global de expresión génica.

Algunos genes específicos de choque térmico al frío descritos en *Bacillus subtilis* como *cps*, inosina fosforilasa (purine nucleoside phosphorylase, *pnp*), factor de elongación, if-1, if-1 e if-3 (Phadtare e Inouye, 2008) también se sobreexpresan en *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6. La inducción de los factores de traducción es necesaria para reiniciar la síntesis de proteínas durante el estrés por frío (Wounters et al., 2001; Phadtare e Inouye, 2008). También se observó un aumento en la expresión del factor sigma 54, que está involucrado en la expresión de genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono, metabolismo energético, modificación del ARN, quimiotaxis etc. (Buck et al., 2000; Jagannathan et al., 2001). Esta respuesta transcripcional concuerda con el aumento de expresión a temperaturas bajas (20° C) de los genes de la glucólisis (*gap*, *pfkA*, *pyk*), transportadores ABC de azúcares e iones inorgánicos, sistemas de fosfotransferasa (*ptsP*), genes involucrados en la quimiostaxis y movimiento flagelar (*motB*, *fliL*, *pilM*) y proteínas de secreción (*secY*).

La expresión de esos genes podría ayudar al microorganismo a obtener suficientes nutrientes esenciales y mantener un nivel mínimo de metabolismo anabólico y catabólico. En este sentido, una explicación para este aumento de expresión génica encaminado a aumentar la funcionalidad de las células puede ser resultado del concepto citado por distintos autores (Wiebe et al. 1992) según el cual la eficiencia metabólica a bajas temperaturas disminuye y, por tanto, para mantener cierto metabolismo las células requieren mayor abundancia de proteínas funcionales (i.e., enzimas).

Capítulo 5

Al final del periodo de incubación a 20° C la gran mayoría de los genes mantiene su expresión (incluso algunos aumentan su nivel de expresión) y la cantidad de ARN por célula permanece constante. Esto puede sugerir que la degradación del ARN ha sido inhibida a lo largo del tiempo de exposición a 20° C o que la síntesis y degradación del ARN presentaban un equilibrio. También hemos de tener en cuenta que al descender la temperatura, la degradación del ARN debe reducirse por el efecto de la bajada de temperatura sobre la actividad (reducida) de los enzimas destinados a su descomposición. La vida media de los ARNm en las bacterias puede variar de segundos a mas de una hora y generalmente son mas cortos que el tiempo de duplicación del organismo (Laalami et al., 2014). De este modo, mientras el ARN es relativamente estable a temperaturas moderadas, la degradación del ARN se acelera significativamente al aumentar la temperatura en mesófilos llegando a una vida media de menos de 3 min (Portillo y González, 2008). Por otra parte, en los últimos años, diferentes estudios han manifestado una estabilización del ARNm como respuesta a condiciones de estrés, generalmente factores que alteran la tasa de crecimiento (Vargas-Blanco y Shell, 2020). Una de las respuestas al estrés es la reducción de ribonucleasas (enzimas que degradan el ARN). A temperaturas de 20° C la cepa 23.6 inhibe la transcripción de las principales ribonucleasas (*rnr*, *rny*, ribonucleasa J) que constituyen el degradosoma (complejo multiproteico especializado en la degradación del ARN). Otra de las respuestas que se observa es un aumento en la expresión de las proteínas ribosomales, ARNt, *rnpB* y genes encargados de la modificación epigenética del ARN (*truA*, *truB*, *queA*). Se ha descrito que un aumento en la expresión y función de estos genes aumenta la estabilidad del ARN (Vargas-Blanco y Shell, 2020).

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

En condiciones de estrés (temperatura de 20° C y limitación de nutrientes) los microorganismos termófilos estabilizan la degradación y mantienen sus niveles de ARN. Esta característica confiere una ventaja adaptativa ya que al mantener los niveles de expresión de los genes les evita la necesidad de sintetizar nuevo ARN y la presencia de un nivel elevado de ARN les permitirá responder rápidamente cuando las condiciones vuelvan a ser óptimas y facilitan la viabilidad celular ya que ambos factores de estrés para *P. thermoglucosidasius* 23.6 representan un descenso en la eficiencia nutricional de estas células. Como se observa en nuestros resultados la respuesta de *P. thermoglucosidasius* 23.6 al aumento de temperatura es muy rápida y es proporcional a las condiciones del medio, es decir, si las células disponen de más nutrientes cuando las temperaturas son altas (60° C) la tasa de crecimiento específico aumenta y viceversa. Por lo tanto, esta condición coincide con el estado de “alerta fisiológico” que mantiene a las células potencialmente activas (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013) permitiendo responder rápidamente ante cambios ambientales y nutricionales.

La plasticidad genómica mediada por la transferencia horizontal de genes es una característica típica en los géneros *Geobacillus* y *Parageobacillus* (Stuknyte et al., 2008; De Maayer et al., 2014; Burgess et al., 2017). Al disminuir las temperaturas muchos de los genes involucrados en estos procesos, como las secuencias de inserción o transposasas y la infección vírica (tmp4), se reprimen. Sin embargo la conjugación, representada principalmente por el plásmido tmp3, es el único elemento genómico de esta cepa que presenta más genes sobreexpresados que reprimidos cuando la temperatura baja a 20° C. Teniendo en cuenta que Tmp3 tiene unas características muy diferentes al genoma principal (capítulo 2), un origen reciente en la cepa 23.6 y una gran homología con representantes mesófilos del género *Bacillus* y *Clostridium*, cabría indicar que el descenso de

Capítulo 5

temperatura favorece la incorporación de ADN exógeno, contribuyendo a una mayor diversidad genómica y una mejor adaptación del medio.

Los fagos son muy abundantes en la tierra y en términos globales la abundancia de fagos representa aproximadamente un orden de magnitud superior al de células bacterianas. Los fagos juegan un papel importante en la regulación y desarrollo de las comunidades bacterianas (Breitbart y Rohwer, 2005; Hambly y Suttle, 2005). La infección del fago (Tmp4) depende de la tasa de crecimiento de la cepa 23.6 (mayor tasa de crecimiento mayor expresión del fago) (capítulo 4) y durante los ciclos de temperatura la escasez de nutrientes mantiene tasas de crecimiento bajas, que junto con el descenso de la temperatura provoca que Tmp4 no se exprese, lo que favorece el mantenimiento de la viabilidad y el crecimiento de la cepa 23.6 en el suelo.

La respuesta transcripcional de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 al descenso de la temperatura es muy similar a la descrita por Tripathy et al., (2014) en *Brevibacillus borstelensis*. El género *Brevibacillus* incluye representantes termófilos y presenta características similares a *Parageobacillus*: bacterias gram-positivas, taxonómicamente cercanas (O. Bacillales, Firmicutes) y se encuentran habitualmente en suelos. Los cambios de temperatura en la superficie del suelo es uno de los factores de estrés más frecuentes y todo parece indicar que estos microorganismos termófilos están muy bien adaptados a las bajas temperaturas, manteniendo un metabolismo activo y posiblemente llevando a cabo un crecimiento lento que les permite persistir en el ecosistema y responder con rapidez a cambios favorables en este hábitat.

5.6. Conclusiones.

La simulación de ciclos de temperaturas del suelo en un cultivo de quimiostato nos ha permitido confirmar que microorganismos termófilos como *Parageobacillus thermoglucosidasius* están adaptados a este tipo de estrés ambiental, manteniendo su viabilidad como células vegetativas y respondiendo rápidamente cuando las condiciones vuelven a ser óptimas para el crecimiento. Incluso algunos procesos celulares, como la citocinesis, no se detienen a temperaturas de 20° C. El perfil transcripcional a 20° C indicó una sobreexpresión de numerosos reguladores transcripcionales, incluidos genes de choque frío, que indujeron una respuesta transcripcional general regulando diferencialmente el 66 % de los genes anotados y sobreexpresando genes relacionados con la traducción, sistemas de secreción, conjugación, obtención de energía etc. En general, estos hallazgos sugieren que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 regula un gran número de genes que le permiten adaptarse a un ambiente de baja temperatura incluso responder rápidamente cuando las condiciones vuelven a ser óptimas para el crecimiento ya que a temperatura de 20° C los niveles de expresión de los genes se mantienen constantes.

5.7. Bibliografía

- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y. (2013) Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 67: 192-211.
- Blazewicz, S. J., Barnard, R. L., Daly, R. A., Firestone, M. K. (2013) Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *The ISME journal*, 7(11): 2061-2068.
- Breitbart, M., Rohwer, F. (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?. *Trends in microbiology*, 13(6): 278-284.
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y., Gralla, J. D. (2000) The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *Journal of bacteriology*, 182(15): 4129-4136.
- Burgess, S. A., Flint, S. H., Lindsay, D., Cox, M. P., Biggs, P. J. (2017) Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC microbiology*, 17(1): 140.
- Cockell, C. S., Cousins, C. R., Wilkinson, P. T., Olsson-Francis, K., Rozitis, B. (2015) Are thermophilic microorganisms active in cold environments? *International Journal of Astrobiology*.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

- Conant R. T., Ryan M. G., Agren G. I., Birge H. E., Davidson E. A., Eliasson P. E., Evans S. E., Frey S. D., Giardina C. P., Hopkins F., Hyvönen R., Kirschbaum U. F., Lavallee J. M., Leifeld J., Parton W. J., Steinweg J. M., Wallenstein M. D., Wetterstedt J. A. M., Bradford M. A. (2011) Temperature and soil organic matter decomposition rates – synthesis of current knowledge and a way forward. *Global Change biology*, 17: 3392-3404.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16): 10494-10499.
- Davidson, E. A., Janssens, I. A. (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440(7081): 165-173.
- De Maayer, P., Brumm, P. J., Mead, D. A., Cowan, D. A. (2014) Comparative analysis of the *Geobacillus* hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. *BMC genomics*, 15(1): 836.
- Els, N., Larose, C., Baumann-Stanzer, K., Tignat-Perrier, R., Keuschnig, C., Vogel, T. M., Sattler, B. (2019) Microbial composition in seasonal time series of free tropospheric air and precipitation reveals community separation. *Aerobiologia*, 35(4): 671-701.
- Ferenci T. (2001) Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state. *Environmental microbiology*, 3(10): 605-611

Capítulo 5

- Godon, J. J., Galès, A., Latrille, E., Ouichanpagdee, P., Seyer, J. P. (2020) An “overlooked” habitat for thermophilic bacteria: the phyllosphere. *BioDiscovery*, 23: e47033.
- Gómez, E. J., Delgado, J. A., González, J. M. (2020a) Environmental factors affect the response of microbial extracellular enzyme activity in soils when determined as a function of water availability and temperature. *Ecology and evolution*, 10(18): 10105-10115.
- Gómez, E. J., Delgado, J. A., González, J. M. (2020b) Persistence of microbial extracellular enzymes in soils under different temperatures and water availabilities. *Ecology and evolution*, 10(18): 10167-10176.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010a) Procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo. P201031177. España. Patente del CSIC. 29 Julio 2010.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010b) Microorganismo heterótrofo termófilo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* y su uso para la producción de sulfatos. PCTES2010070851. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.
- González, J. M., Portillo, M. C. (2010c) Microorganismo heterótrofo termófilo CECT7628 del género *Ureibacillus* y su uso para la producción de sulfatos PCTES2010070852. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.

*Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)*

- Gonzalez, J. M., Portillo, M. C., Belda-Ferre, P., Mira, A. (2012) Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PloS one*, 7(1): e29973.
- González, J. M., Portillo, M. C., Piñero-Vidal, M. (2015) Latitude-dependent underestimation of microbial extracellular enzyme activity in soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2427-2434.
- Hambly, E., Suttle, C. A. (2005) The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Current opinion in microbiology*, 8(4): 444-450.
- Ho, A., Frenzel, P. (2012) Heat stress and methane-oxidizing bacteria: effects on activity and population dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 50: 22-25.
- Jagannathan, A., Constantinidou, C., Penn, C. W. (2001) Roles of rpoN, fliA, and flgR in expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Journal of bacteriology*, 183(9): 2937-2942.
- Jones, S. E., Lennon, J. T. (2010) Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13): 5881-5886.
- Kjelleberg, S., Hermansson, M., Mårdén, P., Jones, G. W. (1987) The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annual review of microbiology*, 41: 25-49.

Capítulo 5

- Koch A. L. (1997) Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(3): 305-318.
- Laalami, S., Zig, L., Putzer, H. (2014) Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cellular and molecular life sciences*, 71(10): 1799-1828.
- Long, S. K., Williams, O. B. (1959) Growth of obligate thermophiles at 37 C as a function of the cultural conditions employed. *Journal of bacteriology*, 77(5): 545-547.
- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002) The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 4:595-602.
- Marchant, R., Franzetti, A., Pavlostathis, S. G., Tas, D. O., Erdbrugger, I., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., Banat, I. M. (2008) Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport?. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(5): 841-852.
- McCalley, C. K., Sparks, J. P. (2009) Abiotic gas formation drives nitrogen loss from a desert ecosystem. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5954): 837-840.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., Ivanov, M. V., (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermoglucosidasius* *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51:433–446.
- Overkamp, W., Ercan, O., Herber, M., van Maris, A. J., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P. (2015) Physiological and cell morphology adaptation of *Bacillus subtilis* at near-zero specific growth rates: a transcriptome analysis. *Environmental microbiology*, 17(2): 346-363.
- Pavlostathis, S. G., Marchant, R., Banat, I. M., Ternan, N. G., McMullan, G. (2006) High growth rate and substrate exhaustion results in rapid cell death and lysis in the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans*. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1): 84-95.
- Pedrós-Alió C. (2012) The rare bacterial biosphere. *Annual review of marine science*, 4: 449-466.
- Perteua, M., Kim, D., Perteua, G. M., Leek, J. T., Salzberg, S. L. (2016) Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nature protocols*, 11(9): 1650-1667.

Capítulo 5

- Phadtare, S., Inouye, M. (2008) The cold shock response. *EcoSal Plus*, 3(1).
- Portillo, M. C., González, J. M. (2008) Microbial communities and immigration in volcanic environments of Canary Islands (Spain). *Die Naturwissenschaften*, 95(4): 307-315.
- Portillo, M. C., Santana, M., González, J. M. (2012) Presence and potential role of thermophilic bacteria in temperate terrestrial environments. *Die Naturwissenschaften*, 99(1): 43-53.
- Raubuch, M., Dyckmans, J., Joergensen, R. G., Kreuzfeldt, M. (2002) Relation between respiration, ATP content, and Adenylate Energy Charge (AEC) after incubation at different temperatures and after drying and rewetting. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165(4): 435-440.
- Rozak, D. B., Colwell, R. R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews*, 51(3): 365-379.
- Russell A. D. (2003) Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science progress*, 86(Pt 1-2):115–137.
- Santana, M., Portillo, M. C., González, J. M., Clara, I. E. (2013) Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176:47-56.

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius
23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

- Santana, M. M., González, J. M. (2015) High temperature microbial activity in upper soil layers. *FEMS microbiology letters*, 362(22): fnv182.
- Santana, M. M., Dias, T., González, J. M., Cruz, C. (2021) Transformation of organic and inorganic sulfur—adding perspectives to new players in soil and rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 108306.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (2011) Biometry the principles and practice of statistics in biological research, 4th edition. W.H. Freeman & co, New York, 937 pp.
- Stuknyte, M., Guglielmetti, S., Mora, D., Kuisiene, N., Parini, C., Citavicius, D. (2008) Complete nucleotide sequence of pGS18, a 62.8-kb plasmid from *Geobacillus stearothermophilus* strain 18. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 12(3): 415-429.
- Suzuki, H. (2017) *Geobacillus kaustophilus* HTA426: a model organism for moderate thermophiles. *Advances in medicine and biology*. Nova Science Publishers, New York: 75-108.
- Takami, H., Inoue, A., Fuji, F., Horikoshi, K. (1997) Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS microbiology letters*, 152(2): 279-285.
- Townsend, A. R., Vitousek, P. M., Holland, E. A. (1992) Tropical soils could dominate the short-term carbon cycle feedbacks to increased global temperatures. *Climatic change*, 22(4): 293-303.

Capítulo 5

- Tripathy, S., Sen, R., Padhi, S. K., Sahu, D. K., Nandi, S., Mohanty, S., Maiti, N. K. (2014) Survey of the transcriptome of *Brevibacillus borstelensis* exposed to low temperature shock. *Gene*, 550(2): 207-213.
- Vargas-Blanco, D. A., Shell, S. S. (2020) Regulation of mRNA stability during bacterial stress responses. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Wiebe, W. J., Sheldon, W. M., Pomeroy, L. R. (1992) Bacterial growth in the cold: evidence for an enhanced substrate requirement. *Applied and environmental microbiology*, 58(1): 359-364.
- Wong, M. L., An, D., Caffrey, S. M., Soh, J., Dong, X., Sensen, C. W., Oldenburg, T. B., Larter, S. R., Voordouw, G. (2015) Roles of Thermophiles and Fungi in Bitumen Degradation in Mostly Cold Oil Sands Outcrops. *Applied and environmental microbiology*, 81(19): 6825-6838.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., Kuipers, O. P., de Vos, W. M., Abee, T. (2001) The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation. In *Cell and Molecular Response to Stress*, Vol. 2: 43-56).
- Zeigler, D. R. (2014) The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology (Reading, England)*, 160:1-11

Capítulo 5

5.8. Anexo

Tabla suplementaria 5.1. Anotación de los genes representados en la figura 5.10

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_000002	<i>rpmH</i>	50S ribosomal protein L34
pgaptmp_000018	-	30S ribosomal protein S6
pgaptmp_000020	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18
pgaptmp_000071	-	PTS sucrose transporter subunit IIBC
pgaptmp_000125	-	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator
pgaptmp_000233	-	ABC transporter permease
pgaptmp_000254	-	tRNA-Asn
pgaptmp_000255	-	tRNA-Ser
pgaptmp_000256	-	tRNA-Glu
pgaptmp_000258	-	tRNA-Glu
pgaptmp_000259	-	tRNA-Lys
pgaptmp_000261	-	tRNA-Leu
pgaptmp_000268	-	tRNA-Met
pgaptmp_000269	-	tRNA-Asp
pgaptmp_000340	-	ABC transporter permease
pgaptmp_000456	-	TetR family transcriptional regulator
pgaptmp_000481	-	GntR family transcriptional regulator
pgaptmp_000482	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_000556	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_000579	-	tRNA-Val
pgaptmp_000581	-	tRNA-Lys
pgaptmp_000582	-	tRNA-Leu
pgaptmp_000583	-	tRNA-Gly
pgaptmp_000585	-	tRNA-Arg
pgaptmp_000586	-	tRNA-Pro
pgaptmp_000587	-	tRNA-Ala
pgaptmp_000588	-	tRNA-Met
pgaptmp_000589	-	tRNA-Ile
pgaptmp_000590	-	tRNA-Ser
pgaptmp_000591	-	tRNA-Met
pgaptmp_000592	-	tRNA-Asp
pgaptmp_000593	-	tRNA-Phe
pgaptmp_000594	-	tRNA-Thr
pgaptmp_000595	-	tRNA-His
pgaptmp_000596	-	tRNA-Gly
pgaptmp_000597	-	tRNA-Ile
pgaptmp_000598	-	tRNA-Asn
pgaptmp_000599	-	tRNA-Glu
pgaptmp_000600	-	tRNA-Glu
pgaptmp_000601	-	tRNA-Gly
pgaptmp_000625	-	multidrug efflux SMR transporter

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius

23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_000626	-	multidrug efflux SMR transporter
pgaptmp_000627	-	TetR/AcrR family transcriptional regulator
pgaptmp_000667	<i>arsB</i>	ACR3 family arsenite efflux transporter
pgaptmp_000673	-	MarR family transcriptional regulator
pgaptmp_000768	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_001008	-	ABC transporter permease
pgaptmp_001025	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_001027	-	TetR/AcrR family transcriptional regulator
pgaptmp_001049	-	PTS transporter subunit EIIC
pgaptmp_001051	<i>ptsP</i>	phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase
pgaptmp_001134	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32
pgaptmp_001231	<i>codY</i>	GTP-sensing pleiotropic transcriptional regulator CodY
pgaptmp_001276	<i>nusA</i>	transcription termination/antitermination protein NusA
pgaptmp_001279	<i>infB</i>	translation initiation factor IF-2
pgaptmp_001281	<i>rbfA</i>	30S ribosome-binding factor RbfA
pgaptmp_001282	<i>truB</i>	tRNA pseudouridine(55) synthase TruB
pgaptmp_001298	-	GntR family transcriptional regulator
pgaptmp_001349	-	MFS transporter
pgaptmp_001384	-	MFS transporter
pgaptmp_001418	-	cold-shock protein
pgaptmp_001448	-	iron chelate uptake ABC transporter family permease subunit
pgaptmp_001449	-	iron ABC transporter permease
pgaptmp_001450	-	iron-siderophore ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_001553	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_001554	-	sugar ABC transporter permease
pgaptmp_001556	-	ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_001620	-	ABC transporter permease
pgaptmp_001621	-	ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_001622	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_001623	-	ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_001624	-	ABC transporter permease
pgaptmp_001626	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_001627	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_001637	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_001639	-	TetR/AcrR family transcriptional regulator
pgaptmp_001768	-	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator
pgaptmp_001774	-	MerR family transcriptional regulator
pgaptmp_001777	<i>ceiB</i>	PTS cellobiose transporter subunit IIC
pgaptmp_001791	-	DeoR/GlpR transcriptional regulator
pgaptmp_001998	-	sigma-70 family RNA polymerase sigma factor
pgaptmp_002099	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002100	-	carbohydrate ABC transporter permease
pgaptmp_002101	-	sugar ABC transporter permease
pgaptmp_002165	-	tRNA-Ser
pgaptmp_002166	-	tRNA-Ala
pgaptmp_002167	-	tRNA-Pro

Capítulo 5

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_002169	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002178	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002179	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002187	<i>cadA</i>	cadmium-translocating P-type ATPase
pgaptmp_002190	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002191	-	GntR family transcriptional regulator
pgaptmp_002273	<i>rnpB</i>	RNase P RNA component class B
pgaptmp_002332	-	methionine ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002373	-	iron-siderophore ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_002377	-	ammonium transporter
pgaptmp_002470	-	tRNA-Gly
pgaptmp_002471	-	tRNA-Cys
pgaptmp_002472	-	tRNA-Gly
pgaptmp_002773	-	phosphate ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002779	<i>pstA</i>	phosphate ABC transporter permease PstA
pgaptmp_002780	<i>pstC</i>	phosphate ABC transporter permease subunit PstC
pgaptmp_002781	<i>pstS</i>	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS family protein
pgaptmp_002788	-	metal ABC transporter permease
pgaptmp_002789	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_002821	<i>prmA</i>	50S ribosomal protein L11 methyltransferase
pgaptmp_002890	<i>ssrS</i>	6S RNA
pgaptmp_002903	<i>tgt</i>	tRNA guanosine(34) transglycosylase Tgt
pgaptmp_002904	<i>queA</i>	tRNA preQ1(34) S-adenosylmethionine ribosyltransferase-isomerase QueA
pgaptmp_002925	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21
pgaptmp_003002	-	ABC transporter permease
pgaptmp_003004	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003023	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003024	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003037	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20
pgaptmp_003038	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L35
pgaptmp_003039	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3
pgaptmp_003119	-	cation transporter
pgaptmp_003140	-	zinc ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_003150	-	ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_003173	-	MFS transporter
pgaptmp_003200	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4
pgaptmp_003254	-	tRNA-Gln
pgaptmp_003255	-	tRNA-His
pgaptmp_003256	-	tRNA-Trp
pgaptmp_003257	-	tRNA-Tyr
pgaptmp_003258	-	tRNA-Thr
pgaptmp_003259	-	tRNA-Phe
pgaptmp_003260	-	tRNA-Asp
pgaptmp_003261	-	tRNA-Met
pgaptmp_003262	-	tRNA-Val

Respuesta fisiológica y transcripcional de Parageobacillus thermoglucosidasius

23.6 a cambios de temperatura (60 – 20° C)

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_003263	-	tRNA-Glu
pgaptmp_003322	-	inorganic phosphate transporter
pgaptmp_003369	-	MetQ/NlpA family ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_003370	-	ABC transporter permease
pgaptmp_003371	-	methionine ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003390	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003391	-	iron chelate uptake ABC transporter family permease subunit
pgaptmp_003392	-	ABC transporter permease
pgaptmp_003399	-	GntR family transcriptional regulator
pgaptmp_003624	-	MFS transporter
pgaptmp_003625	-	TetR/AcrR family transcriptional regulator
pgaptmp_003630	-	LysR family transcriptional regulator
pgaptmp_003680	<i>erm</i>	23S ribosomal RNA methyltransferase Erm
pgaptmp_003683	-	ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003684	-	iron-hydroxamate ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_003685	-	iron ABC transporter permease
pgaptmp_003690	-	iron ABC transporter permease
pgaptmp_003692	-	iron-hydroxamate ABC transporter substrate-binding protein
pgaptmp_003717	-	tRNA-Ala
pgaptmp_003718	-	tRNA-Gly
pgaptmp_003719	-	tRNA-Lys
pgaptmp_003720	-	tRNA-Gln
pgaptmp_003721	-	tRNA-Tyr
pgaptmp_003722	-	tRNA-Thr
pgaptmp_003723	-	tRNA-Val
pgaptmp_003724	-	tRNA-Glu
pgaptmp_003725	-	tRNA-Thr
pgaptmp_003726	-	tRNA-Asn
pgaptmp_003730	-	tRNA-Ile
pgaptmp_003732	-	tRNA-Ala
pgaptmp_003733	-	tRNA-Pro
pgaptmp_003734	-	tRNA-Arg
pgaptmp_003735	-	tRNA-Leu
pgaptmp_003736	-	tRNA-Gly
pgaptmp_003737	-	tRNA-Leu
pgaptmp_003738	-	tRNA-Lys
pgaptmp_003739	-	tRNA-Val
pgaptmp_003751	<i>truA</i>	tRNA pseudouridine(38-40) synthase TruA
pgaptmp_003752	-	energy-coupling factor transporter transmembrane protein EcfT
pgaptmp_003753	-	energy-coupling factor ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003754	-	energy-coupling factor ABC transporter ATP-binding protein
pgaptmp_003755	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17
pgaptmp_003757	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11
pgaptmp_003758	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13
pgaptmp_003759	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36
pgaptmp_003760	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1

Capítulo 5

Referencia	Gen	Nombre
pgaptmp_003765	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30
pgaptmp_003766	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5
pgaptmp_003767	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18
pgaptmp_003768	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6
pgaptmp_003769	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8
pgaptmp_003771	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5
pgaptmp_003772	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24
pgaptmp_003773	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14
pgaptmp_003774	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17
pgaptmp_003775	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29
pgaptmp_003777	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3
pgaptmp_003778	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22
pgaptmp_003779	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19
pgaptmp_003780	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2
pgaptmp_003781	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23
pgaptmp_003783	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3
pgaptmp_003784	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10
pgaptmp_003787	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7
pgaptmp_003788	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12
pgaptmp_003789	-	50S ribosomal protein L7ae-like protein
pgaptmp_003790	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
pgaptmp_003793	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12
pgaptmp_003794	-	50S ribosomal protein L10
pgaptmp_003796	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11
pgaptmp_003800	<i>sigH</i>	RNA polymerase sporulation sigma factor SigH
pgaptmp_003818	-	tRNA-Ala
pgaptmp_003819	-	tRNA-Pro
pgaptmp_003820	-	tRNA-Arg
pgaptmp_003821	-	tRNA-Leu
pgaptmp_003822	-	tRNA-Gly
pgaptmp_003823	-	tRNA-Leu
pgaptmp_003824	-	tRNA-Lys
pgaptmp_003825	-	tRNA-Val
pgaptmp_003847	-	tRNA-Glu
pgaptmp_003848	-	tRNA-Met
pgaptmp_003886	-	tRNA-Ala
pgaptmp_003887	-	tRNA-Ile
pgaptmp_003894	<i>ffs</i>	signal recognition particle sRNA large type
pgaptmp_003908	-	tRNA-Ala
pgaptmp_003909	-	tRNA-Ile

Discusión y conclusiones generales

6.1. Discusión general

La distribución de los microorganismos y los factores que afectan a la composición de las comunidades microbianas están sujetos a un intenso debate por parte de la comunidad científica (Horner-Devine et al., 2004; Whitfield, 2005; Martiny et al., 2006; Pedrós-Alió, 2012; Zeigler, 2014). Esto se debe a la variabilidad existente en los ambientes naturales y al gran número de factores (abióticos y bióticos) que influyen en dichos ecosistemas (Ward, 2006). En la naturaleza, podemos encontrar ambientes que mantienen unas características mas o menos constantes a lo largo del tiempo, como por ejemplo las fuentes termales, donde los microorganismos se distribuyen principalmente dentro del rango de temperaturas a los que se encuentran mejor adaptados (Cuecas et al., 2014) o en otras palabras dentro de sus condiciones óptimas de crecimiento. También podemos encontrar muchos microorganismos que no se distribuyen siguiendo los límites aparentemente establecidos por las condiciones ambientales, como es el ejemplo de los microorganismos termófilos del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* que han sido aislados de ambientes muy dispares (Suzuki, 2018), incluido algunos con características muy alejadas a sus condiciones óptimas de crecimiento (Marchant et al., 2002; Santana y González, 2015; Wong et al., 2015). La presencia de estos microorganismos termófilos en ambientes fríos y su repercusión ecológica en estos nichos no ha tenido una explicación consensuada, alguno autores lo atribuyen a la dispersión de células desde ambientes geotérmicos o cálidos y a su capacidad de formar esporas (Zeigler, 2014), mientras que otros autores sugieren que pueden participar activamente en las reacciones biogeoquímicas del suelo y desempeñar un papel ecológico importante (González y Portillo, 2010 a, b,c; Santana et al., 2013 González et al., 2015; Santana et al. 2021).

Discusión y conclusiones generales

El presente trabajo busca profundizar en el estudio de las características fisiológicas y moleculares de un microorganismo termófilo típico del suelo cuando se encuentra en condiciones muy diferentes de sus condiciones óptimas de crecimiento, por ejemplo, en suelos. De este modo podremos comprender si estas bacterias termófilas son capaces de persistir en el medio ambiente y que estrategias utilizan durante estos períodos con condiciones adversas en relación a sus requerimientos de crecimiento. Para ello, una parte importante de esta tesis se ha centrado en: (i) el desarrollo de un sistema versátil de bioreactores que permite un amplio rango de condiciones de cultivo de microorganismos con especial interés en la posibilidad de explorar si estos microorganismos pueden persistir a tasas de crecimiento cercanas a cero, típicas de condiciones limitantes por recursos nutritivos en la naturaleza, y (ii) la simulación de ciclos diarios de temperatura típicos en la superficie de suelos. Ese tipo de bioreactores, junto con las nuevas técnicas de secuenciación masiva y el uso de herramientas bioinformáticas nos han permitido contribuir a una mejor comprensión del modo de vida de los microorganismos termófilos mas allá de sus condiciones óptimas de crecimiento.

El microorganismo utilizado en este estudio es *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 (CECT9776), una cepa termófila aislada del suelo del Parque Nacional de Doñana (Huelva). Inicialmente, la secuenciación de su genoma estaba pensada como paso previo a los análisis transcriptómicos, sin embargo, una vez ensamblado, este genoma proporciona una enorme cantidad de información, como por ejemplo, la presencia de secuencias en cuatro elementos genómicos (Tmp1, Tmp2, Tmp3 y Tmp4) que presentan datos muy valiosos relacionados con la adaptación e interacción de estos microorganismos con su ambiente y su modo de vida.

Capítulo 6

Una de las características más importantes de la cepa 23.6 es que dispone de numerosas herramientas en su genoma para llevar a cabo transferencia horizontal de genes (Furuya y Lowy, 2006). Transformación, promovida por el elevado número de secuencias de inserción presentes en Tmp1 y Tmp2 y su proximidad a genes únicos en esta cepa; Conjugación, representada por Tmp3, y Traducción, por la presencia de un fago (Tmp4) y el elevado número de regiones CRISPR con homología a fagos. La detección y evaluación de fenómenos de HGT resulta una tarea aún complicada (Ravenhall et al., 2015) aunque algunos estudios han sugerido que la transferencia de material genético se ve favorecida bajo las condiciones de estrés a la que están sometidos los microorganismos, específicamente los termófilos, en el ambiente (van Wolferen et al., 2013; Urbieto et al., 2015; Cuecas et al., 2017). En nuestro trabajo observamos que la respuesta transcripcional de los elementos genómicos que llevan a cabo la HGT varía en función del estrés aplicado. A tasas de crecimiento cercanas a cero y temperaturas de 60° C (condición muy frecuente en la superficie de los suelos durante el periodo estival) la transformación mediada por transposasas sería el principal motor evolutivo (capítulo 4). Por el contrario, a temperaturas bajas (20° C) y tasas de crecimiento reducidas se ve favorecido el intercambio de ADN con otros microorganismos o la captación de ADN exógeno (capítulo 5). Tmp4 no se activaría bajo condiciones de estrés ya que solo se expresa a tasas de crecimiento elevadas (60°C y abundancia de nutrientes) (capítulo 4). Esto podría deberse, en parte, a la sobreexpresión a tasas de crecimiento cercanas a cero del "sistema inmunológico adaptativo" específico de secuencia (Marraffini y Sontheimer, 2010), llevado a cabo por los espaciadores con homología a Tmp4 y las proteínas CAS. Cuando las temperaturas son bajas (20° C) la expresión de Tmp4 permanece inhibida (capítulo 5).

El hecho de que los mecanismos de HGT se regulen diferencialmente bajo estas condiciones de estrés no excluye que estos mecanismos puedan activarse con la

influencia de otros estímulos diferentes. La heterogeneidad del suelo es tan alta que los microorganismos están sometidos constantemente a multitud de interacciones (abióticas y bióticas) y en este trabajo hemos destacado alguna de las más comunes.

Como han postulado algunos autores (Bezuidt et al., 2016; Esin et al., 2018 y Wang et al., 2020), la transferencia horizontal de genes es la principal fuerza evolutiva del género *Geobacillus* y *Parageobacillus*. La heterogeneidad en las condiciones a las que están sometidos estos microorganismos en la naturaleza implicarían un aumento de la presión ambiental promoviendo el intercambio genético. Como consecuencia, las especies de estos géneros presentan una distribución mundial y muestran la adquisición de características relacionadas con los hábitats donde han sido aislados (Das et al., 2014; Burgess et al., 2017; Fujii et al., 2018; Gómez et al., 2020; Gómez et al., 2021).

Para que los microorganismos termófilos puedan vivir en condiciones que no son óptimas para su crecimiento no basta con integrar nuevos fragmentos de ADN, si no que también han de iniciar una respuesta transcripcional general y adecuadamente regulada que le confiera ventajas adaptativas para aprovechar al máximo los recursos que ofrece el medio y mantener su viabilidad.

De este modo, el cultivo de los microorganismos termófilos en el retentostato es una muy buena aproximación al estudio de tasas de crecimiento cercanas a cero (típica de los termófilos en ambientes naturales) y experimentalmente ha sido sobradamente probada (Arbige y Chesbro, 1982; van Verseveld et al., 1984,1986; Tappe et al., 1996,1999; Boender et al., 2009; Ercan et al., 2013; Overkamp et al., 2015; van Mastrigt et al., 2017). Por lo tanto, en esta tesis se describe el primer cultivo en retentostato de una bacteria termófila, en nuestro caso aislada de una muestra de suelo, *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6.

Capítulo 6

Los cultivos en retentostato permitieron demostrar que los microorganismos termófilos (e.j., *P. thermoglucosidasius* 23.6) pueden crecer lentamente sin que su viabilidad se vea comprometida lo que representa una posible estrategia para persistir durante largos períodos de tiempo bajo condiciones ambientales adversas.

Las especies del género *Geobacillus* y *Parageobacillus* son quimiorganotrofos obligados (Nazina et al., 2001) por tanto, utilizan carbono orgánico como donador de electrones y fuente de energía. En condiciones de crecimiento cercano a cero hay un alivio gradual de la represión de catabolitos de carbono (CCR). Esta respuesta es bastante común en otros microorganismos (Goffin et al., 2010; Boender et al., 2011; Ercan et al., 2015; Overkamp et al., 2015) y también ha sido observada durante el crecimiento en fase estacionaria (Fujita, 2009; Kotte et al., 2014). La regulación de CCR en 23.6 favorece el transporte y utilización de sustratos alternativos (ácidos grasos, aminoácidos ramificados, compuestos aromáticos). La obtención de energía de varias fuentes de carbono simultáneamente a tasas de crecimiento cercanas a cero confiere a los microorganismos alternativas metabólicas lo que representa una ventaja adaptativa (Egli, 2010). El elevado número de genes en el genoma de *P. thermoglucosidasius* 23.6 destinados al metabolismo, transporte a través de membranas y traducción de señales, junto con el enriquecimiento progresivo de genes en estas categorías mediante transferencia horizontal (capítulo 2) hace posible que estos microorganismos puedan desarrollarse o persistir cuando las condiciones no son óptimas ya que aumentan su espectro metabólico y les permite obtener energía de fuentes alternativas. Estas características genéticas y metabólicas son comunes en las diferentes especies de *Geobacillus* y *Parageobacillus* (Wang et al., 2020); ello indica que estos microorganismos

Discusión y conclusiones generales

presentan una intensa interacción con su medio ambiente, incluso en condiciones que no son óptimas para su crecimiento.

Durante el cultivo en retentostato también se ha observado la disminución en los sistemas de división celular que conducen a una reducción de la tasa de crecimiento (represión de la replicación, transcripción, traducción y síntesis de peptidoglicanos) y a una mayor supervivencia (sobreexpresión de quimiotaxis, flagelo, defensa, transposasas etc.) (capítulo 4). El hecho de que la escasez de nutrientes encontrada en el retentostato genere una regulación tan eficaz viene marcada por la alta viabilidad registrada en los cultivos a lo largo del tiempo de experimentación.

Las células de la cepa 23.6 presentan una morfología heterogénea durante el cultivo de retentostato (capítulo 3). La formación de células alargadas y sus beneficios no están muy claros ya que diferentes factores pueden dar lugar a este tipo de morfología (Marchant et al., 2002; Overkamp et al., 2015; Westfall y Levin, 2017). La restricción calórica reduce el gasto energético en crecimiento (e.i., división celular) para invertir en el mantenimiento de las funciones celulares esenciales, de ahí que a medida que disminuye la tasa de crecimiento el porcentaje de células pequeñas es mayor.

Gracias a la configuración específica empleada en los bioreactores para la obtención de tasas de crecimiento reducidas, hemos podido estudiar la respuesta de *P. thermoglucosidasius* 23.6 ante dos estreses muy comunes para los microorganismos termófilos en la naturaleza: escasez de nutrientes y temperaturas bajas (20° C). Bajo estas condiciones no se percibe un crecimiento de la cepa 23.6, pero si se observa que ciertos procesos relacionados con la división celular (citocinesis) continúan activos. Por ejemplo, a la temperatura de

Capítulo 6

20° C, se observó que aquellas células en avanzado estado de división, completaban su ciclo celular (capítulo 5). Esta observación indicaría una especie de inercia en los procesos encaminados a la división celular, incluso a baja temperatura y complementaría las observaciones de Marchant et al. (2008) que citaron un crecimiento muy lento a 4°C para el caso de los termófilos del suelo (i.e., *Geobacillus* y *Parageobacillus*).

Con la simulación de los ciclos de temperatura ha quedado claro que en condiciones de baja temperatura la tasa de mortalidad es la que condiciona la abundancia del microorganismo en condiciones adversas (Pedrós-Alió, 2012) ya que si existe crecimiento, este es muy reducido. En estas condiciones la viabilidad de la cepa 23.6 no se ve afectada de modo que estos micororganismos termófilos mantienen su abundancia durante períodos de exposición a baja temperatura y limitación de nutrientes. Además, al descender la temperatura se produce un gran reajuste transcripcional común a los procesos citados para otros microorganismos (Weber y Marahiel, 2003; Tripathy et al., 2014) aumentando la expresión de la maquinaria de traducción, transportadores, glucólisis, movimiento flagelar, etc. En este estudio, resulta novedoso que durante el periodo de incubación a 20°C no se observó degradación del ARN de modo que a baja temperatura se mantenían los niveles de expresión de un gran número de genes. Esta característica junto con una mayor actividad y persistencia de las enzimas extracelulares de estos termófilos (González et al., 2015; Gómez et al., 2020) explicaría el rápido crecimiento observado para los microorganismos termófilos cuando las condiciones ambientales se vuelven óptimas. De esta forma queda demostrado que estos termófilos de suelos son capaces de proporcionar una muy rápida respuesta a cambios en el medio ambiente aunque estos se produzcan sólo esporádicamente en su ecosistema.

Discusión y conclusiones generales

El sistema de retentostato desarrollado en esta tesis es muy adecuado para el cultivo controlado y reproducible de microorganismos termófilos y es una buena aproximación para intentar comprender mejor a los microorganismos termófilos en condiciones naturales aparentemente distantes de las condiciones que habitualmente se consideran óptimas para una especie de microorganismos termófilos.

Como hemos podido observar a lo largo de la tesis que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 y, por extensión otras cepas en géneros cercanos, representan un modelo adaptativo al ecosistema en el que viven, adaptándose a la periodicidad de las condiciones ambientales y suministro de nutrientes. Esta adaptación e integración en un ecosistema aparentemente hostil está basada en su plasticidad genómica (capítulo 3) y su regulación transcripcional (capítulo 4 y 5) ante estreses típicos del suelo. Estas características genómicas promueven su diversidad metabólica y permite a estos microorganismos vivir en ambientes muy diferentes, participando de forma activa en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes (Portillo et al., 2012; Santana y González, 2015).

En un marco de cambio climático, la temperatura ambiental media global sube año tras año y se prevé un aumento en la frecuencia y virulencia de eventos meteorológicos extremos (Lee, 2007; Battisti y Naylor, 2009) incluso en lugares de latitudes altas (BBC News: Canadá rompe su récord de temperatura por tercer día consecutivo: 49,6 ° C en Lytton, Columbia Británica, Junio de 2021). Estas condiciones favorecen el desarrollo de los microorganismos termófilos que debido a su amplia distribución mundial y sus características metabólicas se espera que tengan una relevancia cada vez mayor en los ecosistemas con el desarrollo de los siguientes años. Así, sería esperable que influyesen activamente y progresivamente con mayor relevancia en el balance de carbono suelo-atmósfera (Davidson y Janssens, 2006; Conant et al., 2011) ya que han demostrado ser

Capítulo 6

consumidores muy activos de la materia orgánica del suelo y participan de forma decisiva en el reciclaje de N, S y P (Portillo et al., 2012; Santana y González, 2015; Santana et al., 2021).

Tradicionalmente los microorganismos termófilos han tenido una gran transcendencia en la industria biotecnológica (Vieille and Zeikus, 2001; Uma y Satyanarayana, 2003; Vaičikauskaitė et al., 2019; Wang et al 2021). En condiciones industriales, la disponibilidad de los nutrientes es limitada y como consecuencia las tasas de crecimiento son mas bajas de lo deseable. Comprender las estrategias que emplean los microorganismos y como estos microorganismos crecen a tasas de crecimiento mínimas sería de gran utilidad para optimizar los procesos industriales ya que durante condiciones de alta limitación del crecimiento se reduce enormemente el gasto de nutrientes o substratos para la formación de biomasa y, por tanto, los procesos industriales pueden alcanzar una mayor eficiencia permitiendo el desarrollo de procesos mucho más optimizados.

6.2. Conclusiones generales

El trabajo realizado ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. El cultivo en retentostato es un sistema de cultivo continuo adecuado para el estudio de microorganismos termófilos como *Parageobacillus thermoglucosidasius* frente a situaciones limitantes o factores de estrés. La tasa de crecimiento específica alcanzada en el retentostato disminuyó hasta $0,0002 \text{ h}^{-1}$ correspondiendo con un tiempo de duplicación de 141 días.
2. El genoma de *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 ha sido secuenciado y ensamblado. El genoma completo de este microorganismo está formado por cuatro moléculas de ADN circular de doble cadena: El genoma principal o Tmp1 (3.870.682pb), dos plásmidos: Tmp2 (102283pb) y Tmp3 (50843pb) y un bacteriófago, Tmp4 (55505pb).
3. *P. thermoglucosidasius* 23.6 tiene todas las herramientas genómicas necesarias para el intercambio genético (transformación, conjugación y traducción). Esta gran predisposición al intercambio de material genético genera pangenomas abiertos y aumenta el número de genes únicos que confieren ventajas selectivas para su rápida adaptación a posibles cambios ambientales.
4. El estudio transcriptómico revela que *Parageobacillus thermoglucosidasius* 23.6 puede vivir a tasas de crecimiento cercanas a cero, reprimiendo los genes involucrados en la replicación y división celular y sobreexpresando

Capítulo 6

genes encargados de obtener energía de fuentes alternativas (lípidos) y de su metabolismo secundario.

5. En condiciones adversas (escasez de nutrientes) la cepa 23.6 activa un gran número de elementos móviles genéticos favoreciendo la diversificación del genoma e impidiendo la infección por el fago (Tnp4) que coexiste con esta cepa, lo que favorece su viabilidad y persistencia en los ambientes que coloniza cuando las condiciones son restrictivas para su crecimiento.
6. La simulación de cambios de temperatura, o ciclos diurnos de temperatura del suelo, en un cultivo continuo en quimiostato confirma que *Parageobacillus thermoglucosidans* 23.6 mantiene su viabilidad como células vegetativas, permitiéndole una rápida respuesta tan pronto vuelvan las condiciones óptimas para su crecimiento.
7. El perfil transcripcional a 20° C indicó una sobreexpresión de numerosos reguladores transcripcionales que influyen directamente en la traducción, sistemas de secreción, conjugación, obtención de energía etc, que les permite adaptarse a un ambiente de baja temperatura. Una característica importante durante su persistencia a bajas temperaturas es el mantenimiento de sus moléculas de ARN lo que les permite una pronta respuesta a cambios ambientales y un ahorro en la síntesis de nuevas macromoléculas.

6.3. Bibliografía

- Arbige, M., Chesbro, W. R. (1982) Very slow growth of *Bacillus polymyxa*: stringent response and maintenance energy. *Archives of Microbiology*, 132(4): 338-344.
- Battisti, D. S., Naylor, R. L. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5911): 240-244.
- Bezuidt, O. K., Pierneef, R., Gomri, A. M., Adesioye, F., Makhanyane, T. P., Kharroub, K., Cowan, D. A. (2016) The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus. *Frontiers in microbiology*, 7, 723.
- Boender, L. G., de Hulster, E. A., van Maris, A. J., Daran-Lapujade, P. A., Pronk, J. T. (2009) Quantitative physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero specific growth rates. *Applied and environmental microbiology*, 75(17): 5607-5614.
- Boender, L. G., van Maris, A. J., de Hulster, E. A., Almering, M. J., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., Daran-Lapujade, P. (2011). Cellular responses of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero growth rates: transcriptome analysis of anaerobic retentostat cultures. *FEMS yeast research*, 11(8): 603-620.
- Burgess, S. A., Flint, S. H., Lindsay, D., Cox, M. P., Biggs, P. J. (2017) Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC microbiology*, 17(1): 140.

Capítulo 6

- Conant, R. T., Ryan, M. G., Ågren, G. I., Birge, H. E., Davidson, E. A., Eliasson, P. E., ... Bradford, M. A. (2011) Temperature and soil organic matter decomposition rates—synthesis of current knowledge and a way forward. *Global Change Biology*, 17(11): 3392-3404.
- Cuecas, A., Portillo, M. C., Kanoksilapatham, W., González, J. M. (2014). Bacterial distribution along a 50° C temperature gradient reveals a parceled out hot spring environment. *Microbial ecology*, 68(4): 729-739.
- Cuecas, A., Kanoksilapatham, W., González, J. M. (2017) Evidence of horizontal gene transfer by transposase gene analyses in *Fervidobacterium* species. *PloS one*, 12(4): e0173961.
- Das, S., Jean, J. S., Kar, S., Chou, M. L., Chen, C. Y. (2014) Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of hazardous materials*, 272: 112-120.
- Davidson, E. A., Janssens, I. A. (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440(7081): 165-173.
- Ercan, O., Smid, E. J., Kleerebezem, M. (2013) Quantitative physiology of *Lactococcus lactis* at extreme low-growth rates. *Environmental microbiology*, 15(8): 2319-2332.

- Ercan, O., Wels, M., Smid, E. J., Kleerebezem, M. (2015). Molecular and metabolic adaptations of *Lactococcus lactis* at near-zero growth rates. *Applied and environmental microbiology*, 81(1), 320-331.
- Esin, A., Ellis, T., Warnecke, T. (2018) Horizontal gene flow into *Geobacillus* is constrained by the chromosomal organization of growth and sporulation. *BioRxiv*.
- Fujii, K., Tominaga, Y., Okunaka, J., Yagi, H., Ohshiro, T., Suzuki, H. (2018) Microbial and genomic characterization of *Geobacillus thermodenitrificans* OS27, a marine thermophile that degrades diverse raw seaweeds. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(11): 4901-4913.
- Fujita Y. (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(2): 245-259.
- Goffin, P., Van De Bunt, B., Giovane, M., Leveau, J. H., Höppener-Ogawa, S., Teusink, B., Hugenholtz, J. (2010) Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth. *Molecular systems biology*, 6(1): 413.
- Gómez, E. J., Delgado, J. A., González, J. M. (2020) Persistence of microbial extracellular enzymes in soils under different temperatures and water availabilities. *Ecology and evolution*, 10(18): 10167-10176.
- Gómez, E. J., Delgado, J. A., González, J. M. (2021) Influence of water availability and temperature on estimates of microbial extracellular enzyme activity. *PeerJ*, 9: e10994.

Capítulo 6

González, J. M., Portillo, M. C. (2010a) Procedimiento ecológico de tratamiento de suelos de cultivo. P201031177. España. Patente del CSIC. 29 Julio 2010.

González, J. M., Portillo, M. C. (2010b) Microorganismo heterótrofo termófilo de la especie bacteriana *Brevibacillus thermoruber* y su uso para la producción de sulfatos. PCTES2010070851. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.

González, J. M., Portillo, M. C. (2010c) Microorganismo heterótrofo termófilo CECT7628 del género *Ureibacillus* y su uso para la producción de sulfatos PCTES2010070852. PCT. Patente del CSIC. 20 Diciembre 2010.

González, J. M., Portillo, M. C., Piñero-Vidal, M. (2015) Latitude-dependent underestimation of microbial extracellular enzyme activity in soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2427-2434.

Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., Bohannan, B. J. (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature*, 432(7018): 750–753.

Kearns, D. B., Losick, R. (2005) Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes & development*, 19(24): 3083-3094.

Kotte, O., Volkmer, B., Radzikowski, J. L., Heinemann, M. (2014) Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism. *Molecular systems biology*, 10(7): 736.

Lee, H. (2007). Intergovernmental Panel on Climate Change.

- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002) The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 4:595-602.
- Marchant, R., Franzetti, A., Pavlostathis, S. G., Tas, D. O., Erdbrugger, I., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., Banat, I. M. (2008) Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport?. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(5): 841-852.
- Marraffini, L. A., Sontheimer, E. J. (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature reviews. Genetics*, 11(3): 181-190.
- Martiny, J. B., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Ovreås, L., Reysenbach, A. L., Smith, V. H., Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature reviews. Microbiology*, 4(2): 102-112.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., Ivanov, M. V., (2001) Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G.*

Capítulo 6

thermoglucoasidasius. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51:433–446.

O'Connor, D. (2012). Time-correlated single photon counting. *Academic Press*.

Overkamp, W., Ercan, O., Herber, M., van Maris, A. J., Kleerebezem, M., & Kuipers, O. P. (2015) Physiological and cell morphology adaptation of *Bacillus subtilis* at near-zero specific growth rates: a transcriptome analysis. *Environmental microbiology*, 17(2): 346-363.

Pedrós-Alió C. (2012) The rare bacterial biosphere. *Annual review of marine science*, 4: 449-466.

Ravenhall, M., Škunca, N., Lassalle, F., Dessimoz, C. (2015) Inferring horizontal gene transfer. *PLoS Comput Biol*, 11(5): e1004095.

Russell A. D. (2003) Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science progress*, 86(Pt 1-2):115–137.

Santana, M., Portillo, M. C., González, J. M., Clara, I. E. (2013) Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176:47-56.

Santana, M. M., González, J. M. (2015) High temperature microbial activity in upper soil layers. *FEMS microbiology letters*, 362(22): fnv182.

- Santana, M. M., Dias, T., González, J. M., Cruz, C. (2021) Transformation of organic and inorganic sulfur—adding perspectives to new players in soil and rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 108306.
- Sorek, R., Zhu, Y., Creevey, C. J., Francino, M. P., Bork, P., Rubin, E. M. (2007). Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5855): 1449-1452.
- Suzuki H. (2018). Peculiarities and biotechnological potential of environmental adaptation by *Geobacillus* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24): 10425-10437.
- Tappe, W., Tomaschewski, C., Rittershaus, S., Groeneweg, J. (1996) Cultivation of nitrifying bacteria in the retentostat, a simple fermenter with internal biomass retention. *FEMS microbiology ecology*, 19(1): 47-52.
- Tappe, W., Laverman, A., Bohland, M., Braster, M., Rittershaus, S., Groeneweg, J. V., Van Verseveld, H. W. (1999) Maintenance energy demand and starvation recovery dynamics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* cultivated in a retentostat with complete biomass retention. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2471-2477.
- Tripathy, S., Sen, R., Padhi, S. K., Sahu, D. K., Nandi, S., Mohanty, S., Maiti, N. K. (2014) Survey of the transcriptome of *Brevibacillus borstelensis* exposed to low temperature shock. *Gene*, 550(2): 207-213.
- Uma Maheswar Rao, J. L., Satyanarayana, T. (2003) Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca²⁺-

Capítulo 6

independent alpha-amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Letters in applied microbiology*, 36(4): 191-196.

Urbietta, M. S., Donati, E. R., Chan, K. G., Shahar, S., Sin, L. L., Goh, K. M. (2015) Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology advances*, 33(6 Pt 1): 633-647.

Vaičikauskaitė, M., Ger, M., Valius, M., Maneikis, A., Lastauskienė, E., Kalėdienė, L., Kaunietis, A. (2019) Geobacillin 26 - high molecular weight bacteriocin from a thermophilic bacterium. *International journal of biological macromolecules*, 141, 333-344.

van Mastrigt, O., Abee, T., Lillevang, S. K., Smid, E. J. (2018) Quantitative physiology and aroma formation of a dairy *Lactococcus lactis* at near-zero growth rates. *Food microbiology*, 73: 216-226.

van Verseveld, H. K., Arbige, M., Chesbro, W. R. (1984) Continuous culture of bacteria with biomass retention. *Trends in Biotechnology*, 2(1): 8-12.

van Verseveld, H. W., de Hollander, J. A., Frankena, J., Braster, M., Leeuwerik, F. J., Stouthamer, A. H. (1986) Modeling of microbial substrate conversion, growth and product formation in a recycling fermentor. *Antonie van Leeuwenhoek*, 52(4) 325-342.

van Wolferen, M., Ajon, M., Driessen, A. J., Albers, S. V. (2013) Molecular analysis of the UV-inducible pili operon from *Sulfolobus acidocaldarius*. *MicrobiologyOpen*, 2(6): 928-937.

- Vieille, C., Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 65(1): 1-43.
- Wang, M., Zhu, H., Kong, Z., Li, T., Ma, L., Liu, D., Shen, Q. (2020) Pan-Genome Analyses of *Geobacillus spp.* Reveal Genetic Characteristics and Composting Potential. *International journal of molecular sciences*, 21(9): 3393.
- Wang, J., Salem, D. R., Sani, R. K. (2021) Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus sp.* WSUCF1: Characterization and bioactivities. *New biotechnology*, 61: 29-39.
- Ward D. M. (2006) Microbial diversity in natural environments: focusing on fundamental questions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(4): 309-324.
- Weber, M. H., Marahiel, M. A. (2003) Bacterial cold shock responses. *Science progress*, 86(Pt 1-2): 9–75.
- Westfall, C. S., Levin, P. A. (2017) Bacterial cell size: multifactorial and multifaceted. *Annual review of microbiology*, 71: 499-517.
- Whitfield J. (2005) Biogeography. Is everything everywhere?. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5750): 960-961.
- Wong, M. L., An, D., Caffrey, S. M., Soh, J., Dong, X., Sensen, C. W., Oldenburg, T. B., Larter, S. R., Voordouw, G. (2015) Roles of Thermophiles and Fungi

Capítulo 6

in Bitumen Degradation in Mostly Cold Oil Sands Outcrops. *Applied and environmental microbiology*, 81(19): 6825-6838.

Zeigler D. R. (2014) The Geobacillus paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 1): 1-11.