

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR
DE LA HALOPROTEASA CP1 PRODUCIDA POR
*Pseudoalteromonas ruthenica***

Cristina Sánchez-Porro Álvarez

Sevilla, 2005

Memoria que presenta la Lcda. en Farmacia
Cristina Sánchez-Porro Álvarez para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Sevilla



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Prof. García González, s/n.

Apdo. 874

41080 - SEVILLA

Teléfono: 95 455 67 63

Fax: 95 462 81 62

ANTONIO VENTOSA UCERO, CATEDRÁTICO y ENCARNACIÓN MELLADO DURÁN, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada: “Caracterización Bioquímica y Molecular de la Haloproteasa CP1 Producida por *Pseudoalteromonas ruthenica*,” presentada por la Lcda. en Farmacia CRISTINA SÁNCHEZ-PORRO ÁLVAREZ para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Sevilla, a 1 de junio de 2005.

Fdo.: Antonio Ventosa Ucero

Fdo.: Encarnación Mellado Durán



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Prof. García González, s/n.

Apdo. 874

41080 - SEVILLA

Teléfono: 95 455 67 63

Fax: 95 462 81 62

MANUEL MEGÍAS GUIJO, CATEDRÁTICO y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada: “Caracterización Bioquímica y Molecular de la Haloproteasa CP1 Producida por *Pseudoalteromonas ruthenica*”, presentada por la Lcda. en Farmacia CRISTINA SÁNCHEZ-PORRO ÁLVAREZ para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores D. ANTONIO VENTOSA UCERO y Dña. ENCARNACIÓN MELLADO DURÁN.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 1 de junio de 2005.

Fdo.: Manuel Megías Guijo

La realización de esta Tesis ha sido parcialmente financiada mediante ayudas de los Proyectos de Investigación:

“Extremophiles as cell factories”. BIO4-CT96-0488. Subvencionado por el Programa BIOTECH de la Comisión Europea (1997-1999).

“Amilasas de bacterias halófilas moderadas: caracterización bioquímica y molecular”. PB98-1150. Subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (1999-2002).

“Haloproteasa CP1: Análisis molecular de los genes implicados en la síntesis y secreción”. BMC2003-01344. Subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (2003-2006).

“Multigenome Access Technology for Industrial Catalysts” (MGAtch). QLK3-CT-2002-01972. Subvencionado por la Comisión Europea (2003-2005).

Parte de los resultados de esta Tesis se obtuvieron durante estancias breves de la doctoranda en la Technische Universitat Hamburg-Harburg (Hamburgo), bajo la dirección del Dr. Garabed Antranikian y en la Unidad de Genética Molecular del Instituto Pasteur (París), bajo la dirección del Dr. Anthony Pugsley.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

C. Sánchez-Porro, S. Martín, E. Mellado and A. Ventosa.
Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 94: 295-300 (2003).

C. Sánchez-Porro, E. Mellado, C. Bertoldo, G. Antranikian and A. Ventosa.
Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles* 7: 221-228 (2003).

Patente de invención:

C. Sánchez-Porro, E. Mellado, S. Martín y A. Ventosa.
Proteasa producida por una bacteria halófila moderada: modo de producción de la enzima. Patente española P200300745 (2003).

A mi madre
A Moisés

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo.

Quiero agradecer en primer lugar a Antonio Ventosa el haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis en el Departamento, por estar dispuesto a ayudarme siempre, por confiar en mí, por escucharme y tener siempre una palabra de ánimo.

A Encarnación Mellado, por enseñarme todo lo que se hace en el laboratorio, por su paciencia, por estar siempre dispuesta a inventar un nuevo experimento, por todos aquellos momentos que nunca olvidaré.

A Garo Antranikian, por aceptarme en su laboratorio y sobre todo a Costanzo Bertoldo por toda su ayuda en mi estancia en Alemania.

A Tony Pugsley, por acogerme sin conocerme en su departamento y tener siempre una sonrisa y, como no, a Olivera Francetic, por su cariño, por hacer de mis estancias en París, una de las etapas más bonitas de este trabajo.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología por todo el apoyo que me han dado.

A Carmen Gutiérrez por el cariño que siempre me ha demostrado. A M^a Carmen Márquez, por estar dispuesta a ayudarme en todo, por esas charlitas en su despacho. A Rosario, por hacer que cada pedido fuera una aventura y creo que aunque todavía no distingo una casa comercial de una marca, nos tenemos mucho cariño. A Carmen Vargas, por tener siempre esa sonrisa alentadora en cada seminario. Y al resto de los profes, Joaquín, Lola, Teresa, por poder contar con ellos cuando lo he necesitado.

A mis amigos parisinos, Maxi, Alejandro, Valeria, Jorge y Ruth por hacer que vida en París sea inolvidable.

A todos mis amigos, Juan Antonio, Rosario, Toni, Elena, Lola, Sánchez, Bego, Ana, Espe, Juande, Laura, Diego, Sonia y a la familia de Moisés por interesarse por mis bichitos y preguntarme por ellos.

Y como no, a mis compañeros halófilos, por haber hecho que cada día acudiera sonriente, con ganas de trabajar y de pasar con ellos tantas horas. Muchas gracias por haber compartido conmigo tantos momentos especiales.

A M^a José Coronado y David Ruíz por haber aportado su granito de arena en este trabajo.

A mis compañeros de la lucha diaria en el laboratorio Ana, Cristina, Inma y Javi por alegrar con su presencia el día a día.

A Maribel Calderón por todas esas horas que hemos compartido y por ser mi primera amiga del labo.

A Mercedes por aportar esa alegría al grupo, por radio labo, por hacerme siempre reír.

A Montse por ser mi talismán de la suerte, gracias por ser tan dulce y por transmitir tan bien todo lo que sabes.

A Raúl muchas gracias por tu ayuda, por estar siempre dispuesto a echar una mano, gracias por tu amistad.

Gracias Sara por que contigo he trabajado estrechamente, gracias por aguantar mi superactividad y estar siempre dispuesta a ayudar, por que hemos aprendido a compenetrarnos a la perfección y porque ya no hacen falta palabras para comunicarnos.

Gracias Maribel porque siempre estás ahí, porque nunca fallas, por transmitirme esas ganas de trabajar y seguir adelante aunque las cosas no salgan, te echo de menos.

Gracias Vir, por ser siempre tan buena amiga, por transmitirme esa seguridad que sólo tú sabes darme, por ser tan fuerte y por permitirme estar a su lado en todo momento.

Guardo este jequecito especial para mi familia, los que están y los que no, porque creo que todos estarán igual de orgullosos de mi, de lo que si estoy segura es de soy muy afortunada por contar con todos ellos en los momentos buenos y malos. Especialmente quiero dedicar este trabajo a mi madre, mi tía Isa, mis hermanos y como no, a Moisés.

Y como dijo alguien una vez... "el daño ya está hecho".

GRACIAS A TODOS

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. AMBIENTES EXTREMOS: AMBIENTES HIPERSALINOS	1
Ambientes hipersalinos	1
Historia	3
I.2. MICROORGANISMOS HALÓFILOS	4
I.2.1. Bacterias halófilas moderadas	8
I.2.1.1. Características generales	8
Taxonomía	8
Fisiología.....	8
Ecología	10
Genética	11
I.2.1.2. Aplicaciones industriales de las bacterias halófilas moderadas.....	13
Enzimas.....	13
Polímeros	14
Solutos compatibles.....	15
Biodegradación de residuos	16
Alimentos fermentados	18
Otros usos potenciales	19
I.3. ENZIMAS BACTERIANAS EXTRACELULARES.....	19
I.3.1. Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas.....	20
I.3.2. Enzimas extracelulares producidas por haloarqueas	24
I.3.3. Adaptación de las enzimas a los ambientes salinos	28
I.3.4. Proteasas microbianas	31
I.3.4.1. Definición	31
I.3.4.2. Clasificación	32
Serina proteasas	34
Aspartato proteasas.....	35
Cisteína proteasas.....	35
Metaloproteasas	36
I.3.5. Proteasas producidas por los microorganismos extremófilos.....	37
I.3.6. Aplicaciones industriales de las proteasas microbianas	42
I.4. SECRECIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES.....	47

I.4.1. Sistema de secreción de tipo I.....	48
I.4.2. Sistema General de Secreción (GSP): sistema de secreción de tipo II	49
Mecanismo de la chaperona PapC.....	49
Secreción tipo ShIA.....	50
Mecanismo de nucleación/precipitación	50
I.4.2.1. Sistema de secreción de tipo II.....	51
I.4.2.1.1. Maquinara Sec.....	58
I.4.2.1.2. Maquinaria Tat	59
I.4.3. Sistema de secreción de tipo III.....	61
I.4.4. Sistema de secreción de tipo IV.....	64
I.4.5. Sistema de secreción de tipo V.....	65
Sistema de autotransporte o tipo V _a	66
Sistema de tipo V _b	68
Sistema de tipo V _c	68
I.5. SECRECIÓN EN MICROORGANISMOS HALÓFILOS	69
II. OBJETIVOS	71
III. MATERIAL Y MÉTODOS	75
III.1. MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO	75
III.2. MATERIAL BIOLÓGICO	76
III.2.1. Cepas aisladas	76
III.2.2. Cepas de colección	77
III.2.3. Plásmidos utilizados	79
III.2.4. Plásmidos construidos	81
III.3. MUESTREO, TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	82
III.3.1. Toma de muestras	82
III.3.2. Tratamiento de las muestras	82
III.3.3. Conservación de las cepas.....	83
III.4. MEDIOS DE CULTIVO	83
III.4.1. Medios de cultivo para microorganismos halófilos.....	83
Medio SW	83
Agar marino	84
III.4.2. Medios de cultivo para microorganismos no halófilos	84
Medio LB.....	84

Medio JLB.....	84
III.4.3. Medios de cultivo para detecciones enzimáticas	85
III.4.3.1. Amilasas: Agar almidón.....	85
III.4.3.2. DNAsas: Agar DNA.....	85
III.4.3.3. Lipasas: Tween 80	86
III.4.3.4. Pululanases: AZCL-Pululano	86
III.4.3.5. Proteasas: Agar caseína	86
III.4.3.6. Xilanasas: AZCL-Xilano.....	87
III.5. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS.....	87
III.6. ACTIVIDAD PROTEASA EN LAS DISTINTAS FRACCIONES CELULARES	88
III.6.1. Preparación de las fracciones celulares.....	88
III.6.1.1. Sobrenadante	88
III.6.1.2. Fracción periplásmica	88
III.6.1.3. Extracto celular	88
III.6.2. Ensayo de la actividad proteolítica.....	89
Hide Powder Azure.....	89
Método de Kunitz.....	89
III.6.3. Determinación del contenido en proteínas totales.....	90
III.7. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	90
III.7.1. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo para la producción de la haloproteasa CP1	90
III.7.1.1. Determinación de la concentración de sales óptima y del tiempo de incubación.....	90
III.7.1.2. Determinación de la temperatura óptima	91
III.7.1.3. Determinación de la composición del medio de cultivo	91
III.7.2. Determinación de las condiciones óptimas del ensayo para determinar la actividad proteasa	91
III.7.2.1. Determinación del pH óptimo	91
III.7.2.2. Determinación de la temperatura óptima	92
III.7.2.3. Determinación de la concentración de NaCl óptima.....	92
III.7.3. Dializado de las muestras	92
III.7.4. Columna de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow	93
III.7.5. Columna de filtración en gel Superdex S-200	94
III.8. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	94
III.8.1. Geles de SDS-poliacrilamida	94

III.8.2. Zimograma	96
III.8.3. Geles nativos.....	96
III.8.4. Tinción con azul de Coomassie.....	97
III.8.5. Tinción con negro amido.....	97
III.8.6. Secado y conservación de los geles.....	97
III.8.7. Western blot.....	97
III.8.8. Secuenciación de proteínas	98
III.9. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HALOPROTEASA CP1	98
III.9.1. Determinación del pH óptimo de actividad	98
III.9.2. Determinación de la temperatura óptima de actividad	99
III.9.3. Determinación de la concentración de NaCl óptima de actividad	99
III.9.4. Estudio de la estabilidad de la haloproteasa CP1 en distintas concentraciones de NaCl.....	99
III.9.5. Estudios de termoestabilidad.....	99
III.9.6. Determinación de los sustratos sobre los que actúa la proteasa	99
III.9.7. Influencia de metales pesados en la actividad enzimática	100
III.9.8. Efecto de los inhibidores sobre la haloproteasa CP1	100
III.9.9. Estudios cinéticos.....	100
III.9.9.1. Determinación de la K_m y V_{max}	100
III.9.10. Determinación del peso molecular	101
III.10. OBTENCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A LA RIFAMPICINA.....	101
III.11. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DEL MATERIAL GENÉTICO.....	102
III.11.1. Conjugación	102
III.11.2. Transformación.....	103
III.11.2.1. Preparación de células competentes	103
III.11.2.2. Transformación de células competentes por choque térmico.....	103
III.11.2.3. Preparación de células electrocompetentes	104
III.11.2.4. Electrotransformación de <i>E.coli</i>	105
III.12. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DEL ADN.....	105
III.12.1. Extracción de ADN plasmídico	105
III.12.1.1. Minipreps	106
III.12.1.2. Lisis alcalina	106
III.12.2. Extracción de ADN genómico	107
III.12.2.1. Método del CTAB	108

III.11.2.2. Método de Marmur.....	108
III.12.3. Electroforesis del ADN en geles de agarosa	109
III.12.4. Determinación de la concentración del ADN.....	111
III.12.5. Manipulación enzimática del ADN	112
III.12.5.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	112
III.12.5.2. Desfosforilación de los extremos 5'.....	113
III.12.5.3. Ligación de los fragmentos de restricción	113
III.12.6. Purificación de ADN.....	114
III.12.7. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa	114
III.12.8. Reacción de amplificación de ADN mediante PCR.....	114
III.12.9. Reacción de amplificación de ADN mediante PCR inversa.....	117
III.13. HIBRIDACIÓN DE ADN	120
III.13.1. Marcaje de las sondas con digoxigenina.....	120
III.13.2. Transferencia del ADN a las membranas	121
III.13.3. Prehibridación	122
III.13.4. Hibridación	122
III.13.5. Lavado de las membranas.....	122
III.13.6. Detección.....	122
III.13.7. Reutilización de filtros.....	123
III.14. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ADN	123
III.14.1. Secuenciación de ADN.....	123
III.14.2. Análisis de la secuencia de ADN	124
III.15. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	126
III.15.1. Generalidades.....	126
Vectores de la serie pET	126
Expresión heteróloga	126
III.15.2. Clonación en un vector de expresión.....	128
III.15.3. Proceso de inducción	129
III.15.4. Aislamiento de fracciones	129
III.15.5. Solubilización de los cuerpos de inclusión.....	131
III.15.6. Purificación de proteínas expresadas en <i>E. coli</i> mediante una columna de afinidad	131
III.16. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA	132
III.16.1. Caracterización fenotípica	132

III.16.1.1. Características morfológicas	132
Morfología y motilidad	132
Tinción de Gram.....	132
III.16.1.2. Características fisiológicas	133
Crecimiento a distintas concentraciones salinas	133
Crecimiento en anaerobiosis	133
III.16.1.3. Pruebas bioquímicas	133
Prueba de la oxidasa	133
Prueba de la catalasa	133
Prueba de la fosfatasa	134
Producción de ácidos a partir de carbohidratos	134
Producción de indol	135
Prueba del rojo de metilo.....	135
Prueba de Voges-Proskauer	136
Reducción de nitratos y nitritos	136
Citrato de Simmons.....	136
Pruebas de la fenilalanina desaminasa.....	137
Prueba de la arginina desaminasa.....	137
Prueba de la ureasa	137
III.16.1.4. Pruebas nutricionales.....	138
III.16.1.5. Sensibilidad frente a los antimicrobianos.....	140
III.16.2. Caracterización genotípica	141
III.16.2.1. Determinación del porcentaje guanina mas citosina (G+C) del ADN	141
III.16.2.1.1. Extracción de ADN.....	141
III.16.2.1.2. Determinación de la temperatura media de denaturalización.....	141
III.16.2.2. Hibridación ADN-ADN	141
III.16.2.2.1. Marcaje del ADN.....	141
III.16.2.2.2. Procedimientos de hibridación ADN-ADN.....	142
III.16.2.3. Secuenciación del ARNr 16S.....	143
III.16.2.3.1. Obtención del ADN.....	143
III.16.2.3.2. Amplificación del gen ARNr 16S	143
III.16.2.3.3. Análisis filogenético de las secuencias	143
III.16.3. Caracterización quimiotaxonómica.....	144

IV. RESULTADOS	145
IV.1. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LAS CEPAS DE COLECCIÓN.....	145
IV.2. SCREENING DE BACTERIAS HALÓFILAS MODERADAS PRODUCTORAS DE HIDROLASAS EXTRACELULARES.....	145
IV.2.1. Caracterización taxonómica de las cepas productoras de hidrolasas.....	148
IV.2.2. Selección de una cepa halófila moderada con actividad proteolítica.....	149
IV.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LA CEPA CP76 PARA LA MÁXIMA PRODUCCIÓN DE LA PROTEASA	149
IV.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA CP76	152
IV.5. ACTIVIDAD PROTEASA EN LAS DISTINTAS FRACCIONES CELULARES	154
IV.6. PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE LA CEPA CP76	154
IV.7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HALOPROTEASA CP1	156
IV.7.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad	156
IV.7.2. Determinación del pH óptimo de actividad	156
IV.7.3. Determinación de la concentración de NaCl óptima de actividad	157
IV.7.4. Estabilidad de la haloproteasa CP1 en diferentes concentraciones de NaCl	158
IV.7.5. Determinación de la termoestabilidad de la haloproteasa CP1	158
IV.7.6. Influencia de inhibidores en la actividad de la haloproteasa CP1	159
IV.7.7. Influencia de metales en la actividad de la haloproteasa CP1.....	159
IV.7.8. Capacidad de la haloproteasa CP1 de actuar sobre diferentes sustratos	160
IV.7.9. Influencia de diferentes compuestos en la actividad de la haloproteasa CP1.....	160
IV.7.10. Determinación de la secuencia del extremo N-terminal de la haloproteasa CP1.....	161
IV.8. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LA CEPA CP76	162
IV.8.1. Filogenia.....	162
IV.8.2. Caracterización fenotípica	165
IV.8.3. Caracterización genotípica	167
IV.8.3.1. Determinación del porcentaje guanina más citosina (G+C) del ADN.....	167
IV.8.4. Caracterización quimiotaxonómica	168
IV.9. CLONACIÓN DEL GEN DE SÍNTESIS DE LA HALOPROTEASA CP1	170
IV.9.1. Obtención de mutantes de <i>P. rutherfordiana</i> CP76 con fenotipo proteasa negativo	170
IV.9.1.1. Mutagénesis con el transposón Tn 1732.....	170
IV.9.2. Construcción de un banco de genes de <i>P. rutherfordiana</i> CP76	170
IV.9.3. Clonación de la haloproteasa CP1 mediante PCR inversa.....	171
IV.9.3.1. Obtención de una sonda de la haloproteasa CP1	171

IV.9.3.2. PCR inversa para la obtención del gen <i>cp1</i>	173
IV.9.4. Clonación, secuenciación y análisis de la región corriente abajo de <i>cp1</i>	176
IV.9.5. Análisis molecular de la región secuenciada	178
IV.9.6. Análisis predictivo de la estructura tridimensional de CP1 y CP2	197
IV.10. EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>cp1</i> Y <i>cp2</i> . PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	199
IV.10.1. Clonación en el vector pET22b(+)	199
IV.10.2. Expresión y purificación de las proteasas recombinantes CP1 y CP2	201
IV.10.2.1. Solubilización de los cuerpos de inclusión	204
IV.10.2.2. Purificación mediante columnas de afinidad de la haloproteasa CP1 recombinante.....	205
IV. 11. ESTUDIOS DE SECRECIÓN	206
IV.11.1. Detección y amplificación mediante PCR del gen que codifica la proteína D de <i>P. ruthenica</i> CP76.....	207
IV.11.2. PCR inversa para la obtención del gen completo que codifica la proteína D de <i>P. ruthenica</i> CP76.....	209
IV.11.3. Análisis molecular de la región secuenciada	214
IV.11.4. Construcción de mutantes <i>wmpD::ΩSm^R</i>	223
IV.11.4.1. Análisis molecular de los transconjugantes por PCR.....	225
IV.11.4.2. Análisis funcional del mutante <i>P. ruthenica</i> CP77 (<i>wmpD::ΩSm^R</i>).....	227
V. DISCUSIÓN	229
VI. CONCLUSIONES.....	257
VII. SUMMARY.....	259
VIII. BIBLIOGRAFÍA	263

Índice de Tablas

Tabla 1.	Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas	24
Tabla 2.	Enzimas extracelulares producidas por haloarqueas.....	27
Tabla 3.	Valores de pI de proteínas de diversos microorganismos	31
Tabla 4.	Tipos de peptidasas descritas en "Enzyme Nomenclature List of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology	33
Tabla 5.	Selección de proteasas microbianas extracelulares con actividad óptima a elevada temperatura	38
Tabla 6.	Selección de proteasas microbianas extracelulares alcalinas.....	40
Tabla 7.	Selección de proteasas extracelulares producidas por microorganismos halófilos	41
Tabla 8.	Proteasas utilizadas en detergentes	44
Tabla 9.	Distribución y localización celular de las proteínas que forman parte del sistema de secreción de tipo II	53
Tabla 10.	Proteínas que forman parte del TTSS	63
Tabla 11.	Procedencia de las muestras con actividades hidrolíticas	76
Tabla 12.	Cepas bacterianas utilizadas	77
Tabla 13.	Plásmidos utilizados	79
Tabla 14.	Plásmidos construidos en este trabajo	81
Tabla 15.	Compuestos antimicrobianos utilizados.....	87
Tabla 16.	Inhibidores de proteasas.....	100
Tabla 17.	Marcadores de pesos moleculares de proteínas.....	101
Tabla 18.	Cebadores utilizados para la amplificación de ADN mediante PCR.....	116
Tabla 19.	Condiciones de las reacciones cíclicas de PCR.....	117
Tabla 20.	Cebadores utilizados para realizar la amplificación de ADN mediante PCR inversa	119
Tabla 21.	Cebadores utilizados para la secuenciación de ADN	124
Tabla 22.	Programas utilizados en el análisis de secuencias con sus correspondientes direcciones Web	125
Tabla 23.	Sustratos utilizados en las pruebas nutricionales para la caracterización de microorganismos Gram-positivos	138
Tabla 24.	Sustratos utilizados en las pruebas nutricionales para la caracterización de microorganismos Gram-negativos	139
Tabla 25.	Antimicrobianos utilizados.....	140
Tabla 26.	Producción de enzimas extracelulares en bacterias halófilas moderadas de colección.....	145
Tabla 27.	Salinidad de las muestras de agua	146
Tabla 28.	Producción de enzimas extracelulares en bacterias halófilas moderadas procedentes de distintos muestreos.....	147
Tabla 29.	Porcentajes de actividades hidrolíticas	147

Tabla 30.	Identificación taxonómica de 122 aislados capaces de producir diferentes enzimas extracelulares.....	148
Tabla 31.	Cuantificación de la actividad proteolítica de las 17 cepas elegidas.....	149
Tabla 32.	Influencia del medio de cultivo en la actividad de la proteasa extracelular de la cepa CP76	152
Tabla 33.	Purificación de la haloproteasa CP1	154
Tabla 34.	Efecto de distintos inhibidores en la actividad de la haloproteasa CP1	159
Tabla 35.	Efecto de distintos metales en la actividad de la haloproteasa CP1	160
Tabla 36.	Efecto de distintos sustratos en la actividad de la haloproteasa CP1	161
Tabla 37.	Matriz de semejanza de las secuencias de ARNr 16S de la cepa CP76 y otras Especies del género <i>Pseudoalteromonas</i> relacionadas filogenéticamente.....	164
Tabla 38.	Características de crecimiento de la cepa CP76 y <i>P. ruthenica</i>	165
Tabla 39.	Características bioquímicas de la cepa CP76 y <i>P. ruthenica</i>	166
Tabla 40	Características nutricionales de la cepa CP76 determinadas mediante el sistema Biolog.....	167
Tabla 41.	Contenido en G+C del ADN y porcentajes de hibridación ADN-ADN entre la cepa CP76 y especies del género <i>Pseudoalteromonas</i> relacionadas filogenéticamente	168
Tabla 42.	Contenido en ácidos grasos de la cepa CP76 y algunas especies del género <i>Pseudoalteromonas</i> relacionadas	169
Tabla 43.	Proteasas de diferentes bacterias Gram-negativas utilizadas para el alineamiento con el extremo N-terminal de la haloproteasa CP1	171
Tabla 44.	Características bioquímicas de las proteasas CP1 y CP2	179
Tabla 45.	Similitud entre la haloproteasa CP1 y proteasas de diferentes microorganismos	185
Tabla 46.	Similitud entre la proteasa CP2 y proteasas de diferentes microorganismos	188
Tabla 47.	Similitud entre los dominios conservados de CP1 y CP2 y dominios homólogos de proteasas de diferentes microorganismos	192
Tabla 48.	Comparación de las principales características de las proteasas CP1 y CP2 y diversas proteasas depositadas en las bases de datos	196
Tabla 49.	Selección de proteínas D de diversos microorganismos	207
Tabla 50.	Características bioquímicas de la proteína WmpD	214
Tabla 51.	Similitud entre la proteína WmpD y las proteínas homólogas de diferentes microorganismos.....	218
Tabla 52.	Comparación de las principales características bioquímicas de WmpD y proteínas homólogas depositadas en las bases de datos	221
Tabla 53.	Actividad proteasa relativa en las distintas fracciones celulares de <i>P. ruthenica</i> CP76 y del mutante <i>P. ruthenica</i> CP77	227

Índice de Figuras

Figura 1.	Salina de Huelva.....	2
Figura 2.	Ambientes hipersalinos	3
Figura 3.	Cristal de sal	4
Figura 4.	Colonias de <i>Halomonas maura</i>	15
Figura 5.	Soluto compatible (ectoína).....	15
Figura 6.	Aguas contaminadas con petróleo.....	18
Figura 7.	Lodos contaminados de Aznalcóllar (Sevilla).....	38
Figura 8.	Hábitat de microorganismos psicrófilos.....	42
Figura 9.	Representación del mercado industrial de enzimas en el año 2000	43
Figura 10.	Industria farmacéutica	46
Figura 11.	Esquema general de los mecanismos de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas	47
Figura 12.	Estructura de la proteína TolC.....	48
Figura 13.	Esquema del sistema de secreción de tipo II.....	52
Figura 14.	Organización de los genes involucrados en el sistema de secreción de tipo II	57
Figura 15.	Maquinaria Sec	58
Figura 16.	Modelo de la organización estructural del sistema Tat.....	60
Figura 17.	Convergencia en el sistema de secreción de tipo II de proteínas secretadas por los sistemas Sec y Tat	61
Figura 18.	Representación del flagelo bacteriano y del sistema de secreción de tipo II en <i>Y. pestis</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. syringae</i>	62
Figura 19.	Sistema TFSS de <i>A. tumefaciens</i>	64
Figura 20.	Esquema del sistema de secreción de tipo V.....	67
Figura 21.	Esquema representando los sistemas de secreción de tipo I, II, III y IV.....	69
Figura 22.	Toma de muestras en Isla Cristina	82
Figura 23.	Toma de muestras en Isla Bacuta	82
Figura 24.	Muestras de agua y sedimento	82
Figura 25.	Colonias mostrando actividad amilasa	85
Figura 26.	Cultivo mostrando actividad DNAsa	85
Figura 27.	Actividad lipolítica	86
Figura 28.	Cepas con actividad pululanasa.....	86
Figura 29.	Cepas con actividad proteolítica	86
Figura 30.	Columna de intercambio iónico Sepharose Fast Flow	93
Figura 31.	Sistema de filtración Amicón	93
Figura 32.	Columna Superdex S-200 de filtración en gel	94

Figura 33.	Sistema de electroforesis de proteínas.....	95
Figura 34.	Marcador de pesos moleculares de proteínas.....	101
Figura 35.	Placa de Petri con medio SW2 y filtros de conjugación.....	102
Figura 36.	Placa con colonias procedentes de una transformación de <i>E. coli</i>	104
Figura 37.	Extracción ADN genómico.....	108
Figura 38.	Transiluminador y geles de agarosa.....	110
Figura 39.	Marcador de pesos moleculares 1 kb DNA ladder y λ / <i>Hind</i> III.....	110
Figura 40.	Sistema electroforesis de ADN.....	111
Figura 41.	Esquema de la estrategia de PCR inversa.....	120
Figura 42.	Esquema de actuación de los vectores pET.....	127
Figura 43.	Región de clonación/expresión del vector pET22b(+).	129
Figura 44.	Columnas de purificación HiTrap Chelating HP.....	131
Figura 45.	Campana de anaerobiosis.....	133
Figura 46.	Prueba del indol.....	135
Figura 47.	Prueba del rojo de metilo.....	135
Figura 48.	Sistema de identificación Biolog.....	140
Figura 49.	Preparativos de la hibridación.....	142
Figura 50.	Contador de centelleo.....	142
Figura 51.	Logotipo del programa ARB.....	143
Figura 52.	Crecimiento de la cepa CP76 a diferentes concentraciones salinas.....	150
Figura 53.	Influencia del tiempo de incubación y de la composición de sales del medio de cultivo en la actividad proteolítica del sobrenadante de la cepa CP76.....	151
Figura 54.	Efecto de la temperatura, pH y de la concentración de sales en la actividad proteolítica del sobrenadante de la cepa CP76.....	153
Figura 55.	Electroforesis SDS-PAGE de los pasos seguidos en la purificación de la haloproteasa CP1.....	155
Figura 56.	Gel de actividad (zimograma) de la haloproteasa CP1.....	155
Figura 57.	Gel nativo de la haloproteasa CP1.....	156
Figura 58.	Efecto de la temperatura, pH y de la concentración de NaCl del tampón de reacción del ensayo enzimático.....	157
Figura 59.	Estabilidad de la haloproteasa CP1 frente a diferentes concentraciones de NaCl.....	158
Figura 60.	Estabilidad de la haloproteasa CP1 cuando se incubaba a 50 y 55°C.....	158
Figura 61.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación del gen ARNr 16S mediante PCR.....	162
Figura 62.	Árbol filogenético de la cepa CP76 y las especies del género <i>Pseudoalteromonas</i> relacionadas.....	163
Figura 63.	Colonias de la cepa CP76 en medio SW7,5.....	165
Figura 64.	Preparación en fresco de la cepa CP76 y Tinción de Gram de la cepa CP76.....	165

Figura 65.	Alineamiento de la secuencia N-terminal de la haloproteasa CP1 y las proteínas de mayor similitud depositadas en las bases de datos.....	172
Figura 66.	Fragmentos de ADN amplificados utilizando los cebadores Aminoproll, ProR y ProL.....	172
Figura 67.	Diseño de los cebadores para la PCR inversa a partir de CPA	173
Figura 68.	Estrategia de PCR inversa utilizada para amplificar zonas de secuencia desconocida corriente arriba y corriente abajo del fragmento CPA.....	174
Figura 69.	Esquemas de los plásmidos pCP2 y pCP3.....	175
Figura 70.	Estrategia de secuenciación de los fragmentos adyacentes a la sonda CPA contenidos en las plásmidos pCP2 y pCP3.....	175
Figura 71.	Diseño de los cebadores para la obtención de la sonda CPB y de los cebadores para la PCR inversa corriente abajo del gen <i>cp1</i>	176
Figura 72.	Estrategia de PCR inversa utilizada para amplificar zonas de secuencia desconocida corriente abajo del gen <i>cp1</i>	177
Figura 73.	Esquema del plásmido pCP4	178
Figura 74.	Estrategia de secuenciación de los fragmentos adyacentes a la sonda CPB contenidos en el plásmidos pCP4.....	178
Figura 75.	Secuencia de 6.223 pb amplificada mediante PCR inversa, incluida en los plásmidos pCP1, pCP2, pCP3 y pCP4.....	184
Figura 76.	Alineamiento de la haloproteasa CP1 con proteínas homólogas depositadas en las bases de datos.....	187
Figura 77.	Alineamiento de la proteasa CP2 con proteínas homólogas depositadas en las bases de datos.....	190
Figura 78.	Dominios conservados de la haloproteasa CP1	191
Figura 79.	Dominios conservados de la proteasa CP2	191
Figura 80.	Predicción del péptido señal de la haloproteasa CP1, la proteasa CP2 y la esterasa LipP.....	193
Figura 81.	Perfiles de hidrofobicidad de la haloproteasa CP1 y la proteasa CP2.....	194
Figura 82.	Comparación de las secuencias de aminoácidos de CP1 y CP2	195
Figura 83.	Árbol filogenético que muestra la posición de las proteasas CP1 y CP2 de <i>P. ruthenica</i> CP76 con otras proteasas depositadas en las bases de datos.....	197
Figura 84.	Predicción de la estructura tridimensional de la haloproteasa CP1	198
Figura 85.	Predicción de la estructura tridimensional de la proteasa CP2	198
Figura 86.	Cebadores utilizados para la amplificación de los genes <i>cp1</i> y <i>cp2</i>	200
Figura 87.	Reacciones de amplificación de los genes <i>cp1</i> y <i>cp2</i>	201
Figura 88.	Estrategia seguida para la clonación del gen <i>cp1</i> en el vector de expresión pET22b(+)	202
Figura 89.	Estrategia seguida para la clonación del gen <i>cp2</i> en el vector de expresión pET22b(+).....	203
Figura 90.	Análisis en gel SDS-PAGE de las fracciones inducidas con 0,5 mM de IPTG de la proteína recombinante CP1	204
Figura 91.	Expresión de la proteasa CP1 recombinante en geles SDS-PAGE.....	205
Figura 92.	Gel de SDS-PAGE correspondiente a la purificación de la haloproteasa CP1 recombinante	206

Figura 93.	Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas D de diversas bacterias Gram-negativas depositadas en las bases de datos	208
Figura 94.	Diseño de los cebadores para amplificar los fragmentos que constituyen las sondas PDT y PDD.....	210
Figura 95.	Técnica de PCR inversa utilizada para la amplificación de la zona de secuencia desconocida corriente arriba del fragmento incluido en el clon pPD1	211
Figura 96.	Técnica de PCR inversa utilizada para la amplificación de la zonas de secuencia desconocida corriente abajo del fragmento incluido en el clon pPD1	212
Figura 97.	Esquema de los plásmidos pPD2, pPD3 y pPD4	213
Figura 98.	Estrategia de secuenciación de los fragmentos adyacentes a las sondas PDT y PDD ..	213
Figura 99.	Secuencia de 2.979 pb amplificada mediante PCR inversa, incluida en los plásmidos pPD1, pPD2, pPD3 y pPD4.....	217
Figura 100.	Alineamiento de proteínas D depositadas en las bases de datos que muestran mayor similitud con WmpD	220
Figura 101.	Predicción del péptido señal de la proteína WmpD	220
Figura 102.	Predicción de la topología de la proteína WmpD.....	221
Figura 103.	Árbol filogenético construido seleccionando proteínas D depositadas en las bases de datos.	222
Figura 104.	Estrategia seguida para la construcción de los plásmidos pDP, pDPQ y pDPQQ	224
Figura 105.	Placa de SW7,5 caseína mostrando el mutante <i>wmpD::Q</i> con fenotipo proteasa negativo	225
Figura 106.	Representación esquemática de la mutagénesis por doble recombinación del plásmido pDPQQ y el ADN genómico de <i>P. ruthenica</i> CP76	226
Figura 107.	Electroforesis correspondiente a la comprobación de la inserción del cassette QSm en los mutantes <i>wmpD::Q</i> mediante PCR.....	226
Figura 108.	Actividad proteasa relativa de <i>P. ruthenica</i> CP76 y del mutante <i>P. ruthenica</i> CP77	228
Figura 109.	Modelo del posible procesamiento de la haloproteasa CP1	247

Abreviaturas

A	: absorbancia
Å	: amstrong
A	: adenosina
Aa	: aminoácido
ADN	: ácido desoxirribonucleico
Amp ^{R/S}	: fenotipo de resistencia/sensibilidad a la ampicilina
ARN	: ácido ribonucleico
ARNr	: ácido ribonucleico ribosómico
BSA	: seroalbúmina bovina
C	: citosina
°C	: grado centígrado
CIA	: cloroformo-alcohol isoamílico
Cm ^{R/S}	: fenotipo de resistencia/sensibilidad al cloranfenicol
col.	: colaboradores
csp	: cantidad suficiente para
CSPD	: 3-(4-metoxypiro[1,2-dioxetano-3,2'-(5'- cloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decano]-4-il) fenil fosfato disódico
CTAB	: hexadecil trimetil bromuro de amonio
Da	: dalton
DMSO	: dimetilsulfóxido
dNTP	: desoxinucleótido trifosfato
DO	: densidad óptica
DTT	: ditioneitol
ed.	: editor
eds.	: editores
EDTA	: ácido etilen-diamino-tetracético
Fig.	: figura
g	: gramo
<i>g</i>	: unidades de fuerza centrífuga relativa
G	: guanina
Gm ^{R/S}	: Fenotipo de resistencia/sensibilidad a la gentamicina
h	: hora
IPTG	: isopropil-β-D- tiogalactopiranosido
Kb	: kilobase
KDa	: kilodalton
KGB	: tampón universal de restricción
Km	: constante de afinidad
Km ^{R/S}	: fenotipo de resistencia/sensibilidad a la kanamicina
l	: litro
<i>lacZ</i>	: gen que codifica la enzima β-galactosidasa
LB	: medio de cultivo de Luria Bertani
M	: molar
mA	: miliamperio
MCS	: Región de clonaje múltiple
mg	: miligramo
min	: minuto
ml	: mililitro

mM	: milimolar
mm	: milímetro
Mob ^{+/-}	: presencia o ausencia de los genes <i>mob</i>
N	: normal
nm	: nanometro
ORF	: marco abierto de lectura
Ori	: origen de replicación
PAGE	: electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb	: pares de bases
PBS	: tampón fosfato
PCR	: reacción de amplificación en cadena de la polimerasa
PEG	: polietilenglicol
PMSF	: fluoruro de fenilmetilsulfonato
p/v	: relación peso/volumen
PVDF	: fluoruro de polivinilideno
rpm	: revoluciones por minuto
Rf ^{R/S}	: fenotipo de resistencia/sensibilidad a la rifampicina
SDS	: dodecil sulfato sódico
seg	: segundo
Sm ^{R/S}	: fenotipo de resistencia/sensibilidad a la estreptomicina
SSC	: solución salina citratada
Sp ^{R/S}	: fenotipo de resistencia/sensibilidad a la espectomicina
T	: timina
Tc ^{R/S}	: fenotipo de resistencia/sensibilidad a la tetraciclina
TEMED	: N,N,N',N',-tetrametil etilendiamino
Tm	: temperatura de desnaturalización del ADN
Tra ^{+/-}	: presencia o ausencia de los genes <i>tra</i>
µg	: microgramo
µl	: microlitro
µm	: micrometro
U	: unidad(es) de enzima
UV	: ultravioleta
V	: voltio
v/v	: relación volumen/volumen
W	: vatio
X-gal	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

Colecciones de cultivo

ATCC	: American Type Culture Collection
CCM	: Czech Collection of Microorganisms
JCM	: Japan Collection of Microorganisms
NCIMB	: National Collection of Industrial and Marine Bacteria
OCM	: Oregon Collection of Methanogens
UQM	: University of Queensland Microbial Culture Collection
DSM	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Tabla de aminoácidos

Aminoácido		
Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V

Tabla de equivalencia entre molaridad (M) y % de NaCl

NaCl (M)	NaCl (%)
0,1	0,6
0,2	1,2
0,5	2,9
0,75	4,3
1,0	5,8
1,5	8,7
1,7	9,9
2,0	11,6
2,5	14,5
3,0	17,4
4,0	23,2
5,0	29,0

I. INTRODUCCIÓN

I.1. AMBIENTES EXTREMOS: AMBIENTES HIPERSALINOS

El concepto de “ambiente extremo” ha sido tradicionalmente difícil de definir debido a la complejidad y subjetividad del término. Estos ambientes se caracterizan por presentar valores extremos de determinados parámetros, tales como temperatura, pH, presión hidrostática, irradiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos, potencial redox, actividad del agua o salinidad, condiciones en principio, poco favorables o letales para la mayoría de los seres vivos. A pesar de ello, en dichos ambientes extremos se pueden encontrar organismos que toleran e, incluso, requieren para crecer estas condiciones, son los organismos denominados extremófilos.

En 1979, Brock definió los ambientes extremos desde un punto de vista taxonómico como “ambientes en los que existe una escasa diversidad de especies y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos”. En los últimos años los microorganismos extremófilos están siendo ampliamente estudiados, poniéndose de manifiesto que la diversidad taxonómica existente en dichos ambientes extremos no es tan reducida como se pensó en un principio (Oren, 1993; 2002a; Horikoshi y Grant, 1998; Ventosa y col., 1998c; Jones y col., 1998; Litchfield y col., 1999; Litchfield y Gillevet, 2002; Benlloch y col., 2002; González-Toril y col., 2003; Cifuentes y col., 2003; Pedersen y col., 2004).

Ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos son aquellos que presentan una elevada concentración de sal y constituyen un ejemplo característico de ambiente extremo. Estos ambientes además de un alto contenido en iones (factor que le confiere la característica de ser un ambiente inhóspito para la mayoría de los microorganismos), suelen poseer otras peculiaridades ambientales tales como elevadas o muy bajas temperaturas, elevados valores de pH o bajas concentraciones de oxígeno (Javor, 1989; Rodríguez-Valera, 1993).

Los suelos salinos son aquellos que contienen una concentración superior al 0,2% de sales solubles (Javor, 1989). Están extendidos por todo el mundo, especialmente, aunque no de manera exclusiva, por zonas áridas o semiáridas. Estudios realizados en suelos hipersalinos han puesto de manifiesto la existencia de una compleja microbiota adaptada a estos ambientes (Quesada y col., 1982; Rodríguez-Valera, 1988; 1993). Asimismo, estudios realizados en minas de sal (Norton y Grant, 1988) muestran esta variada diversidad de microorganismos.

Los ambientes hipersalinos que se han estudiado en mayor profundidad son los acuáticos. Estos ambientes hipersalinos se caracterizan por tener una concentración salina superior a la del agua de mar, que corresponde aproximadamente a un 3,5% de sales (Edgerton y Brimblecome, 1981). Podemos clasificarlos en dos grupos en base al origen y naturaleza de las sales presentes: talasosalinos y atalasosalinos.

Las aguas talasosalinas (del término griego “thalasso”, mar) tienen un origen marino y, por tanto, una composición salina inicial similar a la del agua de mar. La evaporación del agua permite la concentración de las sales, manteniendo proporciones relativas muy parecidas a las que se presentan en el mar (Brock, 1979; Williams, 1981). Este proceso de evaporación se produce, por ejemplo, en las salinas construidas por el hombre para obtener sal común (Figura 1).



Figura 1. Salina de Huelva

Las salinas presentan además de una elevada concentración de sales, otras características como estar sometidas a una fuerte irradiación solar, a oscilaciones de temperatura entre el día y la noche y poseer un bajo contenido en oxígeno, pues su solubilidad en estos medios tan concentrados es mínima (Rodríguez-Valera y Ruiz-Berraquero, 1983). Una excepción dentro de este tipo de aguas talasosalinas la constituye el Gran Lago Salado, en Utah (Estados Unidos) ya que no

siendo su origen marino, presenta una composición química semejante a la del agua de mar (Post, 1977; Rodríguez-Valera, 1993).

Las aguas atalasosalinas corresponden a los lagos salados naturales, formados por disolución de depósitos minerales de origen continental, cuyas proporciones se alejan, a veces, de las que se encuentran en un medio marino típico, predominando generalmente en su composición cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} (Brock, 1979; Rodríguez-Valera y Ruiz-Berraquero, 1983, Rodríguez-Varela, 1993). Así, la composición iónica de estas aguas puede diferir ampliamente en función de las características geológicas, topográficas o climatológicas a las que estén sometidas (Grant y Ross, 1986). Ejemplos de estos ambientes hipersalinos son el Mar Muerto, algunos lagos hipersalinos de la Antártida, los lagos del Wadi Natrun en Egipto y el lago Magadi en Kenia, entre otros (Oren, 2002a; 2002b). En el caso de los lagos alcalinos, en la composición de sales predominan los iones monovalentes. Debido al elevado pH de estas aguas (a veces hasta un valor de 10-11 o superior), la solubilidad de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} es muy baja, siendo los iones carbonato y bicarbonato los que más contribuyen al total de los aniones presentes en dichas aguas, además de los iones cloruro y sulfato (Oren, 2002a).

Los lagos salados naturales cuya microbiota se ha estudiado en mayor profundidad son el Mar Muerto y el Gran Lago Salado, éste último talasosalino, como ya se ha mencionado anteriormente (Volcani, 1940; Nissenbaum, 1975; Post, 1977; Kushner, 1978; Brock, 1979; Javor, 1989; Arahal y col., 1996; Arahal, 1997; Ventosa y col., 1998a). De igual manera, se han estudiado algunos lagos alcalinos, como el lago Magadi en Kenia (Grant y

Tindall, 1986), el Mono Lake y el Big Soda Lake en Estados Unidos (Jones y col., 1998), los lagos del Wadi Natrun (Imhoff y col., 1979; Jones y col., 1998), así como algunos lagos hipersalinos de la Antártida (Franzmann y col., 1987) (Figura 2).



Figura 2. Ejemplos de ambientes hipersalinos: A. Gran Lago Salado, B. Salinas de Isla Bacuta (Huelva), C. Mono Lake (Estados Unidos), D. Salinas de Isla Cristina (Huelva), E. Salinas Bras del Port (Alicante), F. Mar Muerto

Historia

La sal forma parte de la historia de la Humanidad, es el condimento más antiguo usado por el hombre y su importancia para la vida es tal, que ha marcado el desarrollo de la historia en diversas fases. El primer tratado del que se tiene evidencia sobre la sal se publicó en China sobre el año 2700 a.c.

La ubicación de depósitos de sal tuvo especial relevancia en los emplazamientos de asentamientos humanos, pues la sal era ya usada desde antaño con fines culinarios, bien como condimento, bien para la conservación de alimentos (salazón). Por este motivo se crearon rutas específicas para el mercado de la sal y se han producido numerosas guerras por controlar los depósitos y los mercados de sal.



Figura 3. Cristal de sal

Hubo tratados en la Antigua Grecia que incluían intercambios de sal por esclavos, de hecho el término "salario" proviene de sal, e indica la cantidad de sal que se le daba a un legionario romano para poder salar los alimentos para su conservación. Hasta el siglo XIX se cobraba un impuesto específico para la sal.

Aunque el interés por los microorganismos halófilos ha aumentado en las últimas décadas, la especie humana ha hecho uso de ellos desde hace miles de años. Estos microorganismos halófilos han intervenido tradicionalmente en los procesos de producción de sal.

Así, los cristales de sal común (Figura 3) que se forman en las salinas en la fase de saturación suelen contener una gran cantidad de microorganismos halófilos viables cuya presencia provocaba la aparición de un color rojo brillante en las aguas de las salinas, lo que indicaba a los productores de sal de antaño el momento de trasladarlas a otras balsas para su cristalización final (Baas-Becking, 1931). Recientemente se ha determinado que las responsables de la coloración rojiza son principalmente haloarqueas, bacterias pertenecientes al género *Salinibacter* y el alga *Dunaliella salina* (Oren y Rodríguez-Valera, 2001). Asimismo, la aparición de una coloración rojiza y un olor putrefacto en los alimentos conservados en salazón se debe a la descomposición de estos alimentos por haloarchaeas y bacterias halófilas moderadas proteolíticamente activas (Flannery, 1956).

I.2. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

El término halófilo proviene del griego *hals* (sal) y *phil* (amigo, amor) por lo que etimológicamente halófilo significa "amigo, amante de la sal". En los hábitats hipersalinos coexisten una gran diversidad de seres vivos; se han descrito organismos superiores como el crustáceo *Artemia salina*, larvas de mosca del género *Ephydra*, algunos eucariotas flagelados fotosintéticos pertenecientes a los géneros *Dunaliella* y *Asteromonas*, diatomeas, y constituyendo la microbiota predominante se ha descrito un heterogéneo grupo de procariotas (Archaea y Bacteria) (Rodríguez-Valera y col., 1985; Rodríguez-Valera, 1988; Ventosa y col., 1998c; Grant y col., 1998; Oren, 2002b). La diversidad presente en estos ambientes hipersalinos varía en función de una serie de parámetros entre los que destacan

la salinidad, la composición iónica, la solubilidad del oxígeno, el pH o la temperatura (Rodríguez-Varela, 1988; Javor, 1898, Oren, 1993).

Los microorganismos halófilos son organismos que están especializados para vivir en ambientes hipersalinos. Se han descrito asimismo microorganismos que toleran la sal a concentraciones elevadas pero que crecen mejor en ausencia de la misma, a los que se les denominan microorganismos halotolerantes (Kushner, 1978). Cabe destacar que los conceptos “halófilo” y “halotolerante”, así como las diferentes respuestas a la sal, han tenido muy diversas interpretaciones según el criterio utilizado. Por este motivo, Kushner y Kamekura (1988) clasificaron a los microorganismos en distintas categorías atendiendo a la concentración de sal que requieren para su crecimiento óptimo en:

- **No halófilos:** crecen óptimamente en medios con menos de 0,2 M (aprox. 1%) de NaCl. Algunos pueden tolerar elevadas concentraciones de sal y se les denomina **halotolerantes**. Si toleran hasta una concentración salina de 2,5 M, se denominan microorganismos **halotolerantes extremos**.
- **Halófilos débiles (bacterias marinas):** tienen su crecimiento óptimo en medios que contienen de 0,2 a 0,5 M (aprox. 1-3%) de NaCl.
- **Halófilos moderados:** presentan un crecimiento óptimo en medios con 0,5-2,5 M (aprox. 3-15%) de NaCl.
- **Halófilos extremos:** presentan un crecimiento óptimo en medios que contienen de 2,5 a 5,2 M (saturación) de NaCl.

En los ambientes hipersalinos, especialmente en aquellos con una salinidad superior a 1,5 M de NaCl, los dos grupos de microorganismos predominantes son los halófilos moderados y los halófilos extremos. Las bacterias halófilas moderadas son más abundantes a concentraciones salinas intermedias (1,5-3 M de NaCl), mientras que los microorganismos halófilos extremos, representados fundamentalmente por las arqueas aerobias halófilas extremas o haloarqueas (también denominadas halobacterias) y la bacteria *Salinibacter*, predominan en ambientes con salinidades superiores a 3 M de NaCl. Hay que destacar que existe un rango salino en el cual coexisten y compiten ambas categorías de microorganismos (Rodríguez-Valera y col., 1985; Rodríguez-Valera, 1988; Benlloch y col., 2002).

Los primeros trabajos sobre microorganismos halófilos se centraron en su fisiología, ecología y bioquímica, especialmente los realizados sobre los halófilos extremos (Larsen, 1962; Lanyi, 1974; Dundas, 1978; Kushner, 1978; 1985); el descubrimiento de que las haloarqueas se encontraban en una nueva rama filogenética denominada Archaea despertó un mayor interés por el estudio de dichos microorganismos halófilos (Woese y Fox, 1977; Woese, 1987). Por otra parte, la introducción de nuevas técnicas aplicadas al campo de la taxonomía, como el uso de sondas específicas y técnicas de PCR ha aportado

datos muy interesantes sobre la diversidad microbiana en los ambientes hipersalinos (Rodríguez-Valera y col., 1999; Antón y col., 1999; Benlloch y col., 2001; 2002; Casamayor y col., 2002).

La inmensa mayoría de los microorganismos halófilos extremos son arqueas incluidas en diversos géneros agrupados en la familia *Halobacteriaceae*, con pocas excepciones: varias bacterias fotosintéticas del género *Halorhodospira*, la cianobacteria *Aphanocete halophytica*, el actinomiceto *Actinopolyspora halophila*, la bacteria anaerobia *Acetohalobium arabaticum* y la bacteria recientemente descrita *Salinibacter ruber* (Antón y col., 2002).

Estudios recientes demuestran la presencia de hongos en aguas hipersalinas, concretamente están presentes diferentes especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Wallemia*, *Scopulariopsis* y *Alternaria*. También se ha descrito la presencia de levaduras halófilas, concretamente especies del género *Cladosporium*, y las especies *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmatostroma salinum* y *Aureobasidium pullulans* (Gunde-Cimerman y col., 2000).

El grupo de los microorganismos halófilos moderados está constituido por un elevado número de especies pertenecientes a géneros muy diversos; en su mayoría, son microorganismos quimiotrofos, a excepción de alguna arquea metanógena y algunas bacterias fotótrofos (Pedrós-Alió y col., 2002; Ventosa, 1988; 1993; 1994; Ventosa y col., 1998c; Oren, 2002a; 2002b). En la actualidad, el estudio de sus mecanismos de adaptación para vivir y proliferar en ambientes que poseen amplios rangos salinos así como su importancia biotecnológica son, sin duda, los aspectos que los han hecho aun más interesantes.

Una de las estrategias en la osmoadaptación de los microorganismos halófilos y halotolerantes a estos hábitats extremos es la acumulación de una elevada concentración de solutos en el citoplasma que compensa el estrés osmótico al que se ven sometidos (Larsen, 1986; Tindall, 1988; Gilmour, 1990; Galinski y Trüper, 1994; Galinski, 1995). En el caso de las haloarqueas y algunas bacterias halófilas anaerobias, el equilibrio osmótico se consigue al mantener una concentración iónica citoplasmática tan elevada como la del medio externo (Oren y col., 1984a; Zhilina y Zavarzin, 1990; Oren, 1991). Generalmente, se acumulan sales inorgánicas constituidas por iones K^+ , Na^+ y Cl^- que originan un citoplasma hipersalino. Esta estrategia implica una serie de cambios fisiológicos en la célula, como el que las proteínas producidas por éstas posean en su superficie una mayor cantidad de aminoácidos ácidos para neutralizar las cargas positivas (Lanyi, 1974; Eisenberg y Watchel, 1987; Danson y Hough, 1997). Por otro lado, las membranas celulares sufren una serie de cambios en su composición lipídica aumentando su proporción de aniones lipídicos tales como fosfatidilglicerol y/o glicolípidos, y una

disminución de fosfatidiletanolamina, lo que se traduce en un aumento de fosfolípidos cargados negativamente (Russell y Kogut, 1985; Russell, 1989; Sutton y col., 1991).

El mecanismo de adaptación a ambientes salinos que utilizan las bacterias halófilas moderadas es la acumulación en su citoplasma de determinados compuestos orgánicos neutros de bajo peso molecular, que no interfieren en su metabolismo, denominados solutos compatibles (Brown, 1976). El espectro de estos compuestos sintetizados o acumulados como solutos compatibles es muy amplio (Wohlfarth y col., 1990; Severin y col., 1992; Galinski, 1995; Vargas y col., 2003). Así, pueden ser aminoácidos (glicina y prolina), azúcares (sacarosa, trehalosa), polioles (glicerol, arabinol), betaínas (glicina betaína) y ectoínas (ectoína e hidroxiectoína), que bien se sintetizan “de novo”, o bien, si están presentes en el medio externo, son transportados y acumulados en el citoplasma (Galinski y Trüper, 1994; Cánovas y col., 1996). Entre ellos destacan la glicina y la prolina, que son solutos muy solubles, generalmente en condiciones de baja salinidad (Trüper y Galinski, 1986), el glicerol, ampliamente distribuido entre los microorganismos eucariotas (Borowitzka, 1981) o las ectoínas (Galinski, 1993) y las betaínas, acumuladas principalmente cuando aumenta la concentración salina externa (Galinski y Tindall, 1992), a pesar de que estas últimas no pueden sintetizarse “de novo” por la mayoría de las bacterias (Csonka y Epstein, 1995).

En el ámbito industrial, los microorganismos halófilos poseen un enorme potencial biotecnológico, presentando, incluso, una serie de ventajas adicionales con vistas a su manipulación genética, como, por ejemplo, la de ser fáciles de cultivar y mantener en el laboratorio y bajo unas condiciones asépticas que se ven reducidas al máximo (Ventosa y Nieto, 1995). Algunas de las aplicaciones más interesantes son la utilización de halobacterias en la producción de bacteriorrodopsina, bioplásticos y enzimas, en la degradación de productos tóxicos, o en la detección de determinados tipos de cáncer (Rodríguez-Valera, 1992, Galinski y Tindall, 1992; Ventosa y col., 1998c; Mellado y Ventosa, 2003). También, el alga *Dunaliella* se emplea en la producción comercial de β -caroteno (Avron y Ben-Amotz, 1992; Ventosa y Nieto, 1995). Las bacterias halófilas moderadas también poseen numerosas aplicaciones industriales, como la producción de solutos compatibles y de enzimas, la biodegradación de residuos, o la mejora de los procesos de extracción de petróleo (Ventosa y Nieto, 1995; Ventosa y col., 1998c; Margesin y Schinner, 2001). Este grupo de microorganismos, así como su gran potencial biotecnológico serán objeto de un estudio detallado a lo largo de esta Tesis.

I.2.1. Bacterias halófilas moderadas

I.2.1.1. Características generales

Taxonomía

Las bacterias halófilas moderadas se definen como aquellos microorganismos que crecen óptimamente en medios que contienen de 0,5 a 2,5 M (aprox. 3-15%) de NaCl (Kushner y Kamekura, 1988; Ventosa y col., 1998c). Sin embargo, algunos son capaces de crecer en un rango de salinidades aún más amplio que abarca hasta una concentración 4 M (aprox. 25%) de NaCl (Quesada y col., 1982; Ventosa y col., 1984; Rodríguez-Valera y col., 1985; Rodríguez-Valera, 1988).

Hasta 1980 sólo existían seis especies halófilas moderadas aceptadas y publicadas de forma válida en la Lista de Bacterias Aprobadas (Skerman y col., 1980). En las dos últimas décadas se han llevado a cabo estudios en ambientes hipersalinos de diferentes áreas geográficas que han permitido el aislamiento y caracterización taxonómica de un elevado número de bacterias halófilas moderadas, existiendo actualmente más de 70 especies descritas.

Las bacterias halófilas moderadas constituyen un grupo de microorganismos muy heterogéneo que incluye especies pertenecientes a géneros bacterianos muy diversos. Así, a excepción de algunas especies metanógenas pertenecientes a las arqueas, la mayoría son bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas (Ventosa, 1994; Ventosa y col., 1998c).

Fisiología

La característica común de las bacterias halófilas moderadas es su requerimiento de sal para crecer, siendo este requerimiento variable entre las distintas especies, e incluso puede variar para una misma especie en función de determinadas condiciones de cultivo, como la temperatura (Post, 1977) o la concentración de nutrientes presentes en el medio (Forsyth y Kushner, 1970). Así, se ha descrito que la concentración de sal necesaria para el crecimiento óptimo de muchas bacterias halófilas moderadas aumenta con la temperatura (Novitsky y Kushner, 1975; 1976). Por otro lado, concentraciones elevadas de nutrientes en el medio de cultivo pueden ampliar el rango salino óptimo de crecimiento de estos microorganismos (Kushner, 1993; Cánovas y col., 1996). Este hecho parece estar relacionado no sólo con la concentración de nutrientes sino con la presencia en medios complejos de sustancias osmorreguladoras o solutos compatibles que son transportados y acumulados en el interior de la célula (Galinski, 1995).

Los distintos criterios utilizados para clasificar y definir a las bacterias halófilas se basan en la concentración de NaCl, considerada la sal principal de los hábitats hipersalinos. No obstante, si bien el NaCl es el componente mayoritario de la sal, también se encuentran

presentes en la misma otras sales que pueden afectar a la respuesta o comportamiento de estos microorganismos.

Aunque el NaCl puede ser parcialmente sustituido por otros solutos como la glucosa o el glicerol en el caso de *Salinivibrio costicola* (Adams y col., 1987), generalmente, se requieren notables concentraciones de iones Na^+ para el crecimiento de las bacterias halófilas moderadas (Kushner, 1993). Sin embargo no ocurre lo mismo con los iones Cl^- ; así, *Halomonas elongata* es capaz de crecer en un medio que contiene NaBr y NaNO_3 (Vreeland y Martín, 1980) y *Halomonas halophila* en un medio con NaBr, Na_2SO_4 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Quesada y col., 1987). También existen ambientes en los que la concentración salina viene determinada por iones como Mg^{2+} , presente en el Mar Muerto en concentraciones ligeramente superiores a los iones Na^+ (Nissenbaum, 1975; Kushner, 1978; Arahal y col., 1996).

Con respecto a los requerimientos nutricionales de las bacterias halófilas moderadas, estos varían ampliamente entre las distintas especies. Algunas especies son capaces de crecer en medios mínimos que sólo contienen glucosa, NH_4Cl y la apropiada concentración de NaCl y otras sales (Kushner y Kamekura, 1988). Aunque está descrito que, en general, uno de los medios más idóneos para el cultivo rutinario de la mayoría de las bacterias halófilas moderadas en el laboratorio son aquellos enriquecidos con un 0,5% de extracto de levadura (Nieto y col., 1989).

Algunas bacterias son capaces de utilizar determinados solutos compatibles como fuente de carbono y energía. Éste podría constituir un sistema de aprovechamiento de dichos solutos tras un choque hiperosmótico. Cánovas y colaboradores (1996) demostraron que *Chromohalobacter salexigens* puede utilizar prolina, colina y betaína como fuentes de carbono a la concentración salina óptima de crecimiento, si bien el crecimiento fue más lento al observado con glucosa. Mediante experimentos con betaína marcada con ^{14}C , se ha comprobado que ésta sólo se incorpora a los componentes celulares cuando no existe glucosa en el medio (Cánovas, 1998).

Por otro lado, Nieto y colaboradores (1989) estudiaron la respuesta de un gran número de bacterias halófilas moderadas a 10 metales pesados altamente contaminantes. Los niveles de tolerancia varían considerablemente entre los diferentes grupos taxonómicos e incluso entre cepas de un mismo grupo (Nieto y col., 1989). Aunque la mayoría de las cepas son sensibles al mercurio, plata y zinc, y resistentes al plomo y cromo, su susceptibilidad al resto de los metales es considerablemente variable; así, algunas muestran una alta tolerancia al cobalto, níquel y cadmio. A este respecto, es interesante destacar la influencia de la salinidad y la concentración de extracto de levadura presentes en el medio de cultivo en la tolerancia a determinados metales pesados. Así, la toxicidad de metales como el cadmio, cobalto y cobre disminuye con el aumento de la salinidad y, en el caso del níquel y zinc, a medida que la concentración de extracto de levadura del medio de cultivo

es más elevada. Como resultado de estos estudios se ha propuesto un rango de concentraciones para definir la metalorresistencia en bacterias halófilas moderadas, el cual permite diferenciar entre cepas halófilas moderadas sensibles y tolerantes (Nieto, 1991). En 1998, Ríos y colaboradores, aislaron a partir de ambientes hipersalinos contaminados un gran número de bacterias tolerantes a metales pesados; concretamente aislaron cepas tolerantes a mercurio, cadmio, cromo y/o zinc, perteneciendo la mayoría de ellas al género *Halomonas*.

Son escasos los datos que se tienen sobre la respuesta de los microorganismos halófilos moderados a los distintos compuestos antimicrobianos. En un principio, estos estudios se realizaron en un número reducido de bacterias y empleando, casi exclusivamente, el método de los discos (Vreeland y col., 1980; Ventosa y col., 1982; Quesada y col., 1984; 1987; 1990; Fendrich, 1988). Estudios posteriores realizados por Nieto y colaboradores (1993) han demostrado que cuando las bacterias halófilas moderadas crecen a su óptima concentración salina, presentan gran resistencia a concentraciones muy elevadas de la mayoría de los compuestos antimicrobianos. Coronado (1998) realizó estudios de la susceptibilidad bacteriana a compuestos antimicrobianos a diferentes concentraciones salinas determinando sus concentraciones mínimas inhibitorias. Se demostró que el efecto inhibitorio de muchos compuestos antimicrobianos sobre el crecimiento de las bacterias halófilas moderadas está relacionado con la concentración salina presente en el medio de cultivo.

Ecología

Debido a su capacidad para crecer y desarrollarse en un amplio rango de salinidades, las bacterias halófilas moderadas están presentes en una gran variedad de ambientes hipersalinos (Rodríguez-Valera, 1988; Ventosa y col., 1998c; Oren, 2002b). Tal es el caso de las especies pertenecientes al género *Halomonas*, que se han podido aislar prácticamente de todos los ambientes acuáticos hipersalinos estudiados (Vreeland, 1992; Grant y col., 1998).

Son muchas las bacterias halófilas moderadas aisladas de aguas talasosalinas; así, a partir de distintas salinas españolas se han aislado gran cantidad de microorganismos, representantes de un gran número de grupos taxonómicos, tales como *Salinivibrio*, que constituye el género que se aísla de manera más abundante a partir de hábitats con concentraciones salinas intermedias, *Halomonas*, *Flavobacterium*, *Chromohalobacter*, *Bacillus*, *Halobacillus* y algunos cocos Gram-positivos (Rodríguez-Valera y col., 1985; Márquez y col., 1990; Ventosa y col., 1998b).

Con respecto a los ambientes acuáticos atalasalinos, aquellos cuya microbiota se ha estudiado en mayor profundidad son el Mar Muerto y algunos lagos salados alcalinos africanos (Imhoff y col., 1979; Grant y Tindall, 1986; Jones y col., 1998). En el Mar Muerto, debido a la elevada salinidad y a la peculiaridad de su composición química, los

microorganismos halófilos moderados se encuentran en baja proporción; aún así, se han aislado especies de los géneros *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Sporohalobacter*, *Halobacteroides*, *Orenia*, *Ectothiorhodospira* y *Bacillus* (Volcani, 1940; Oren 1983a; 1988; Oren y col., 1984a, 1987, 1989; Arahall, 1997; Ventosa y col., 1999). También se han descrito partículas víricas que podrían corresponder a bacteriófagos que controlarían las poblaciones procariotas en este lago (Oren y col., 1997).

En muestras de agua de mar, Ventosa y colaboradores (1982) detectaron la presencia de bacterias halófilas moderadas, aunque en un número considerablemente reducido. Más recientemente, en un estudio llevado a cabo en el Océano Pacífico (Kaye y Baross, 2000) se ha determinado que el género *Halomonas* constituye la especie bacteriana más abundante en las aguas oceánicas profundas objeto del estudio.

En determinados hábitats anaerobios se ha demostrado la existencia de bacterias halófilas moderadas anaerobias pertenecientes al género *Halanaerobium*, mayoritario en zonas anaerobias del Gran Lago Salado (Zeikus y col., 1983). También se han aislado especies sulfato-reductoras pertenecientes a los géneros *Desulfohalobium* y *Desulfovibrio* (Olliver y col., 1991; Caumette, 1991b; Tardy-Jacquenod y col., 1996).

Por otra parte, estudios ecológicos realizados en suelos hipersalinos (Quesada y col., 1982; 1983) han demostrado que la mayoría de los microorganismos presentes en los mismos son bacterias halófilas con una marcada tendencia eurihalina, siendo capaces de crecer entre un 0,9-20% de sales totales, y con un óptimo de crecimiento alrededor del 10%. Desde un punto de vista taxonómico, destacan representantes pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Halomonas*, *Pseudomonas* y en menor medida, *Nesterenkonia* (Quesada y col., 1983; Ventosa y col., 1998b). También se ha estudiado la presencia de microorganismos halófilos en la superficie de las hojas de *Atriplex halimus*, una planta que secreta sal y habita en suelos salinos de Israel (Simon y col., 1994).

Genética

Hasta hace una década, la mayoría de los estudios realizados en bacterias halófilas moderadas se centraron en su fisiología, ecología y taxonomía. El interés despertado por su manipulación con fines biotecnológicos y el estudio en profundidad de sus mecanismos de osmoadaptación ha determinado que en los últimos años se hayan realizado diversos estudios genéticos sobre estos microorganismos.

Diversos trabajos se han ocupado del estudio de la organización genómica de estos microorganismos. El primero de ellos fue realizado por Mellado y colaboradores (1997), en el cual se determinó el tamaño del genoma de *Salinivibrio costicola* mediante electroforesis en campo pulsado, usando para ello dos enzimas de restricción diferentes: 2.505 kb (*Sfi*) ó 2.259 kb (*Mbo*). Posteriormente, se ha aplicado esta misma técnica para analizar el genoma de 11 cepas pertenecientes a los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*,

obteniéndose unos tamaños de ADN genómico comprendidos entre 1.450 y 2.830 kb para el género *Halomonas* y entre 1.770 y 2.295 kb para *Chromohalobacter* (Mellado y col., 1998). Más recientemente se ha determinado el tamaño genómico de *Halomonas eurihalina*, siendo éste de 2.500 kb, aproximadamente (Llamas y col., 2002).

En la actualidad se dispone de la secuencia casi completa del genoma de la bacteria halófila moderada *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. Dicho genoma ha sido determinado por el Joint Genome Institute of the US Department of Energy y su secuencia está publicada y accesible en la dirección <http://genome.jpi-psf.org/microbial/index.html>.

Hasta el momento, la conjugación ha sido el único mecanismo de transferencia genética que se ha podido demostrar para las bacterias halófilas moderadas. Coronado (1998) determinó las condiciones óptimas de conjugación entre *Escherichia coli* y la bacteria halófila moderada *Halomonas elongata*. No se ha podido establecer la existencia de transformación natural, y tampoco han sido efectivos los métodos de electroporación y de tratamiento con CaCl₂ (Vargas y col., 1997). Igualmente, tampoco se han descrito métodos de transducción, si bien se han aislado algunos bacteriófagos específicos de bacterias halófilas moderadas (Calvo y col., 1998; García de la Paz y col., 1989; Uchida y Kanbe, 1993; Libinzon y col., 1995).

El aislamiento y caracterización de plásmidos de bacterias halófilas moderadas ha hecho posible la construcción de vectores de clonación para este grupo bacteriano. Vargas y colaboradores (1995) construyeron el plásmido pHS15 a partir del plásmido críptico pHE1 de *H. elongata* y Mellado y colaboradores (1995b) construyeron los vectores pEE3 y pEE5 a partir del replicón del plásmido críptico pCM1 de *C. marismortui*. Todos ellos son capaces de replicar tanto en *E. coli* como en distintas bacterias halófilas moderadas, poseen unos puntos de reconocimiento únicos para diversas restrictasas, un marcador de resistencia a agentes antimicrobianos y las funciones de movilización del plásmido RK2 (Mellado y col., 1995b; Vargas y col., 1995; 1997). Asimismo, Tegos y colaboradores (1997) caracterizaron uno de los promotores presentes en el plásmido pHE1 de *Halomonas elongata*. Dicho promotor puede ser de gran utilidad para la construcción de vectores de expresión para bacterias halófilas moderadas.

Respecto a genes informadores, el gen *inaZ* de *Pseudomonas syringae*, inductor del proceso de congelación, fue el primer gen informador utilizado en bacterias halófilas moderadas Gram-negativas (Arvanitis y col., 1995). Así, *inaZ* se ha expresado en *H. elongata* y *H. eurihalina* bajo el control de dos promotores heterólogos, demostrándose que pueden expresarse en bacterias halófilas moderadas, genes provenientes de otros grupos bacterianos. También se ha demostrado la utilidad de la proteína de fluorescencia GFP ("green fluorescence protein") de *Aequorea victoria* (Chalfie y col., 1994) como gen informador en bacterias halófilas moderadas y se ha utilizado con éxito en *H. elongata* (Douka y col., 2001).

Con relación a la obtención de mutantes de bacterias halófilas moderadas se han utilizado diversas técnicas. Kogut y colaboradores (1992) fueron los primeros en aislar mutantes sensibles a la sal de una cepa de *Salinivibrio costicola*. También se han llevado a cabo estudios sobre los efectos de la radiación ultravioleta en *Halomonas elongata* siendo esta bastante sensible al tratamiento mutagénico (Martin y col., 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la hidroxilamina es un agente mutagénico útil en bacterias halófilas moderadas, aislándose diversos mutantes de *Halomonas elongata* y *Halomonas meridiana* auxótrofos o sensibles a la sal (Cánovas y col., 1997b); de la misma manera se han obtenido mutantes de *Halomonas eurihalina* incapaces de sintetizar exopolisacáridos (Llamas y col., 1999). Por último, la mutagénesis biológica mediante transposones está siendo ampliamente utilizada en este grupo bacteriano. La inserción del transposón Tn1732, derivado de la familia Tn3, ha permitido el aislamiento de mutantes de *Halomonas elongata* y *Chromohalobacter salexigens* afectados en la síntesis de ectoína (Göller y col., 1998; Cánovas y col., 1997a), mutantes de *Halomonas elongata* afectados en el transporte de ectoína e hidroxiectoína (Grammamm y col., 2002), y mutantes de *Halomonas meridiana* afectados en la actividad amilasa extracelular (Coronado y col., 2000b).

I.2.1.2. Aplicaciones industriales de las bacterias halófilas moderadas

Desde que se inició su estudio, los microorganismos halófilos moderados han sido considerados como un grupo de organismos con un enorme potencial biotecnológico, al igual que otros microorganismos extremófilos. Las bacterias halófilas moderadas no sólo producen compuestos de interés biotecnológico como enzimas, solutos compatibles o biopolímeros, sino que, además, poseen unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. A este respecto, señalaremos que al ser microorganismos que crecen a elevadas concentraciones salinas se reduce el riesgo de contaminación en el laboratorio (Vreeland, 1992). A su vez, son fáciles de cultivar y con requerimientos nutricionales sencillos siendo, en general, capaces de utilizar una gran cantidad de compuestos como fuente de carbono y energía (Ventosa y Nieto, 1995; Ventosa y col., 1998c).

A continuación describiremos algunas de las aplicaciones más interesantes de las bacterias halófilas moderadas:

Enzimas

La mayoría de las enzimas halófilas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado provienen de bacterias halófilas moderadas y extremas. Las propiedades y funciones de estas enzimas han sido extensamente revisadas (Kamekura, 1986; Ventosa y col., 2005).

Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un amplio campo de aplicación para las enzimas producidas por estos microorganismos extremófilos. Algunas de estas enzimas poseen un gran interés comercial y unas características específicas que serán analizadas en mayor profundidad en el apartado 1.3.6. de este trabajo.

Polímeros

Los polisacáridos son polímeros de gran interés industrial debido a sus propiedades viscosizantes, estabilizantes, emulsificantes y formadoras de geles. Así, se encuentran ampliamente extendidos formando parte de las envolturas de crustáceos marinos, plantas, algas y microorganismos (Páez, 2004). Numerosas bacterias producen componentes extracelulares llamados exopolisacáridos (EPS), estos polímeros extracelulares se encuentran ampliamente extendidos en procariontes ya que les proporcionan una serie de ventajas como la adhesión microbiana a superficies o aumentar la captación de nutrientes. El descubrimiento de bacterias halófilas moderadas productoras de EPS está adquiriendo gran interés en los últimos años. Los EPS poseen múltiples aplicaciones industriales, así son utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y petrolífera, entre otras (Sutherland, 1998).

Los primeros estudios de EPS en bacterias halófilas moderadas fueron realizados por Quesada y colaboradores (1993) que describieron el EPS V2-7 producido por la cepa F2-7 de la especie *Halomonas eurihalina*. Es un heteropolisacárido con carácter ácido cuya producción y composición química varía en función de los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Béjar y col., 1996; Martínez-Checa y col., 1996). Sus soluciones acuosas presentan una viscosidad intermedia bastante termoestable. Esta propiedad, junto con la capacidad de formar verdaderos geles a pH ácido y su poder emulgente, le confiere unas cualidades óptimas para diversos usos industriales (Calvo y col., 1995; 2002). Además, se ha comprobado su capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T humanos extraídos de sangre periférica cuando se utiliza como estímulo antigénico el anticuerpo monoclonal AntiCD3 (Pérez-Fernández y col., 2000). Un estudio realizado por Béjar y colaboradores (1998) permitió la caracterización de los EPS producidos por 19 cepas de *Halomonas eurihalina*. Destacamos, el EPS H96 producido por *Halomonas eurihalina* cepa H96 que origina soluciones de viscosidad intermedia a pH 7; sin embargo, a pH ácido (pH 3) presenta un comportamiento similar al polímero V2-7, produciéndose un incremento de la viscosidad, lo que ocasiona la formación de un gel (Quesada y col., 1993; Béjar y col., 1998). Otra propiedad de este polímero es su poder emulgente sobre hidrocarburos y otras sustancias lipídicas (Calvo y col., 1998). También ha sido descrita la producción del EPS H-28 por la bacteria *Halomonas eurihalina* H-28. Este EPS es capaz de emulsificar crudo de petróleo más eficientemente que otros surfactantes estudiados (Tween 20, Tween 80 o

Tritón X-100) lo que lo hace potencialmente útil para su uso en la industria petrolífera (Martínez-Checa y col., 2002).

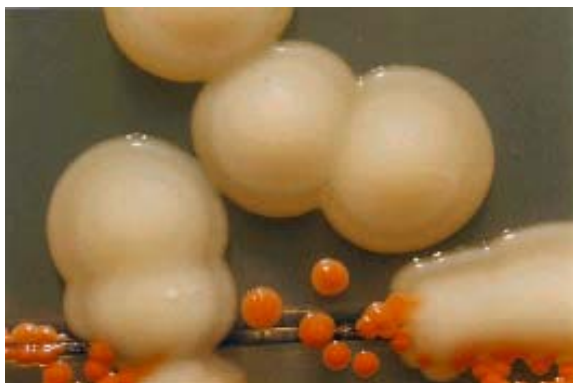


Figura 4. Colonias de *Halomonas maura*, una bacteria halófila moderada productora del EPS

El maurano es otro EPS descrito por Arias y colaboradores (2003), producido por *Halomonas maura* cepa S-30 (Bouchotroch y col., 2001). Se caracteriza por su poder viscosizante y sus propiedades emulgentes (Bouchotroch y col., 2000) (Figura 4). Así, sus soluciones acuosas son altamente viscosas y muestran un comportamiento pseudoplástico, viscoelástico y tixotrópico. La viscosidad se mantiene estable en un amplio rango de valores de pH (3-11), tras procesos de

congelación y descongelación y en presencia de sacarosa, sales y surfactantes. Además, este EPS presenta una alta capacidad de captación de plomo y otros cationes, lo que permitiría su uso potencial en procesos de biorremediación (Arias y col., 2003).

Solutos compatibles

Como ya se ha comentado anteriormente la principal estrategia utilizada por las bacterias halófilas moderadas para soportar el estrés osmótico existente en los ambientes naturales que habitan es la acumulación en su citoplasma de solutos compatibles (Brown, 1976). Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés industrial, ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas, e incluso, células enteras, frente a la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad (Galinski 1993; 1995; Louis y col., 1994).

Se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología de enzimas (biosensores, PCR, etc.) (Figura 5), y en la industria farmacéutica y cosmética, en este campo ya existe una patente (Motitschke y col., 2001) para el uso de estos compuestos en cremas para la piel (Galinski y Tindall, 1992; Galinski y Lippert, 1991; Ventosa y col., 1998c; Margensin y Schinner, 2001; Mellado y Ventosa, 2003). Algunos de estos solutos compatibles también han sido utilizados como estabilizadores de enzimas lábiles mostrando un marcado efecto protector frente al calor y procesos de congelación y descongelación (Galinski, 1993; Louis y col., 1994). Estudios realizados por Knapp y colaboradores (1999) demostraron que la β -

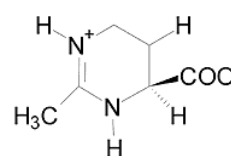


Figura 5. Soluto compatible (ectoína)

hidroxiectoína es capaz de estabilizar la ribonucleasa A aumentando su temperatura de fusión cuando actúa a una concentración 3 M de NaCl.

Hasta el momento, estos compuestos sólo pueden obtenerse biológicamente. El primer método de obtención de ectoína y hidroxiectoína fue descrito por Frings y colaboradores (1995) a partir de cultivos de *Marinococcus* sp. También se ha estudiado la producción de ectoína e hidroxiectoína por la bacteria halófila moderada *Halomonas halodenitrificans* (Thomas y Galinski, 1996). Además, se ha patentado un proceso industrial para la obtención de ectoína a partir de una cepa de *Halomonas elongata* (Galinski y col., 1997); dicho proceso se conoce como "bacterial milking" y consiste en someter a la bacteria repetidamente a choques osmóticos (de 10% a 2% de NaCl). Con un primer choque osmótico se induce la acumulación citoplasmática de los solutos compatibles (ectoína) y a continuación, al disminuir la concentración de NaCl del medio, la bacteria expulsa su contenido citoplasmático liberando al medio ectoína, principalmente. Seguidamente las células son transferidas de nuevo a un medio con elevada salinidad y vuelven a sintetizar nuevos solutos compatibles para compensar el estrés osmótico (Sauer y Galinski, 1998).

El avance en ingeniería genética experimentado en las últimas décadas ha permitido la clonación de los genes responsables de la síntesis de ectoína de *Chromohalobacter salexigens* y *Marinococcus halophilus* (Cánovas y col., 1997a; Louis y Galinski, 1997). Ono y colaboradores (1999) purificaron y caracterizaron las enzimas implicadas en la síntesis de ectoína en *Halomonas elongata*. También se han caracterizado los genes involucrados en la transformación de colina en betaína en *Chromohalobacter salexigens* (Cánovas y col., 2000). Asimismo, se ha aislado un mutante de *C. salexigens* sensible a la sal, designado CHR63, el cual puede ser potencialmente utilizado en procesos industriales de producción de solutos compatibles, principalmente N- β -acetildiaminobutirato e hidroxiectoína (Nieto y col., 2000).

Solutos compatibles tales como glicina-betaína e hidroxiectoína han sido utilizados con éxito en el proceso de producción de proteínas recombinantes, concretamente en la producción de inmunotoxinas (Barth y col., 2000). En los últimos años, se está trabajando en la obtención de plantas transgénicas capaces de tolerar altas concentraciones de sal, gracias a la transferencia de genes responsables de la síntesis de solutos compatibles. Esta estrategia permitirá que estas plantas presenten una mayor tolerancia al estrés osmótico y puedan crecer y desarrollarse en suelos áridos o semiáridos (Nakayama y col., 2000; Nieto y Vargas, 2002).

Biodegradación de residuos

Numerosos procesos industriales, tales como la producción de pesticidas, productos farmacéuticos y herbicidas, procesos de extracción de petróleo y gas, generan aguas residuales salinas en las que los microorganismos convencionales no pueden ser utilizados y

en los cuales las bacterias halófilas moderadas juegan un importante papel (Oren y col., 1992; 1993).

En los últimos años se han caracterizado diversas bacterias halófilas moderadas capaces de degradar compuestos aromáticos (Ventosa y col., 1998c). Los primeros estudios de bacterias halófilas capaces de degradar compuestos aromáticos nitro-sustituidos datan de 1991 cuando Oren y colaboradores describieron que las bacterias anaerobias *Halanaerobium preavalens* y *Orenia marismortui* eran capaces de degradar estos compuestos a concentraciones salinas de 13-14% NaCl. Otros estudios de bacterias halófilas capaces de degradar compuestos hidrocarbonados son los realizados por McMeekin y colaboradores (1993) y más recientemente los realizados por Margensin y Schinner (2001) y Peyton y colaboradores (2004). Se han descrito distintas especies del género *Marinobacter* con capacidad para degradar compuestos hidrocarbonados y algunos compuestos derivados del petróleo (Gauthier y col., 1992; Huu y col., 1999; Hedlund y col., 2001) (Figura 6). Recientemente, ha sido descrita otra especie halófila moderada, *Halomonas organivorans*, capaz de degradar un gran número de compuestos aromáticos (García y col., 2004).

Una bacteria halófila moderada perteneciente a la familia *Halomonadaceae* ha sido descrita por su capacidad para degradar el herbicida 2,4-diclorofenoxacético (2,4-D); esta cepa, I-18, fue aislada del Lago Alkali (Oregón), caracterizado por poseer aguas altamente alcalinas y saladas (Maltseva y col., 1996). Los genes responsables de la degradación del 2,4-D han sido clonados y transferidos a diferentes cepas de bacterias halófilas moderadas, confiriéndoles a éstas también la capacidad de hidrolizar el herbicida (Kleinstüber y col., 2001).

Se han descrito distintas especies halófilas moderadas capaces de degradar el fenol, un compuesto que se genera como residuo en distintas industrias. Así, Woolard e Irvine (1992) describieron la utilización de una biopelícula de bacterias halófilas moderadas aisladas del Gran Lago Salado para el tratamiento de aguas residuales hipersalinas contaminadas con fenol. Hinteregger y Streichsbier (1997) aislaron una bacteria, *Halomonas* sp. capaz de utilizar el fenol como única fuente de carbono y energía. Más recientemente se ha descrito una bacteria halófila moderada, *Halomonas venusta*, capaz de crecer en medios con 3-8% de sales y utilizar también el fenol como fuente de carbono y energía, por lo que podría utilizarse en tratamientos *in situ* de aguas salinas contaminadas por este sustrato (Muñoz y col., 2001). Alva y Peyton (2003) han estudiado el efecto del pH y la salinidad en la degradación de fenol en la bacteria *Halomonas campisalis* determinando que el fenol es usado como fuente de carbono y energía a valores de pH comprendidos entre 8-11 y una concentración de NaCl de 0 a 15% de NaCl. Mascow y Kleinstüber (2004) han descrito que la bacteria haloalcalófila *Halomonas* sp. EF11 es capaz de crecer en medios que contienen fenol y mantener su equilibrio osmótico ajustando los niveles de solutos

compatibles. Además, García y colaboradores (2005a) han descrito la presencia de una bacteria Gram-positiva halófila moderada en salinas del sur de España capaz de degradar fenol. Esta bacteria se ha clasificado como *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov.



Figura 6. Aguas contaminadas con petróleo

Recientemente se ha realizado un screening en distintas salinas del sur de España con el fin de aislar y caracterizar bacterias halófilas moderadas capaces de degradar en condiciones salinas, compuestos aromáticos que son contaminantes habituales de los residuos industriales. Este estudio ha permitido seleccionar una serie de cepas potencialmente útiles desde el punto de vista biotecnológico, no solo para la biorremediación de zonas costeras contaminadas

con estos compuestos, sino también para el tratamiento de los efluentes salinos generados por distintas actividades industriales. La caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos determinó *Halomonas* como el género más predominante (García y col., 2005b).

Con respecto a compuestos organofosforados, se ha purificado y caracterizado una enzima con actividad ácido organofosfórico anhidrasa de una bacteria halófila moderada del género *Alteromonas*. Actualmente se encuentra patentado el uso de una enzima recombinante derivada de ésta con propiedades catalítica mejoradas (Cheng y DeFrank 2000). Asimismo, también se han aislado diversas cepas capaces de degradar compuestos organofosforados y derivados (DeFrank y col., 1993; Hayes y col., 2000).

Con frecuencia, como resultado de la actividad industrial, los ambientes salinos están contaminados con metales pesados que constituyen un grave problema para el ecosistema. Bacterias halófilas moderadas resistentes a metales pesados podrían emplearse en procesos de detoxificación, o como bioindicadores de ambientes salinos contaminados (Trevors y col., 1985). Como se detalló anteriormente, diversos estudios han permitido el aislamiento de bacterias halófilas moderadas capaces de tolerar diferentes metales pesados como el cobre, níquel, cadmio y cobalto (Nieto y col., 1989; Ríos y col., 1998).

Alimentos fermentados

Las bacterias halófilas moderadas también juegan un importante papel en el campo de la alimentación. En el proceso de elaboración de la salsa de soja, los granos de trigo y soja se resuspenden en agua salina conteniendo un 19% de NaCl y se incuban durante 9 meses en la oscuridad (Kushner, 1989); la especie halófila *Tetragenococcus halophilus* interviene en el proceso de fermentación (Röling y Verseveld, 1996; Uchida y Kanbe, 1993). Otra especie del mismo género, *Tetragenococcus murii*, se emplea en la fabricación de una salsa fermentada de calamar (Satomi y col., 1997). Por otro lado, se utilizan bacterias

halófilas moderadas en la preparación de la salsa de pescado Thai, condimento alimenticio ampliamente utilizado en el sureste asiático (Thongthai y Suntainalert, 1991).

Se ha descrito la presencia de diversas especies del género *Halanaerobium* en latas de arenques suecos (Surstromming) (Kobayashi y col., 2000a). Asimismo se ha descrito una nueva especie *Halanaerobium fermentans* presente en huevos de pescado (Kobayashi y col., 2000b).

Por último, la especie *Halomonas alimentaria* parece que contribuye en el aroma y sabor del joutgal, un tradicional plato coreano basado en marisco fermentado (Yoon y col., 2002).

Otros usos potenciales

Además de las aplicaciones descritas, existe un amplio rango de posibles aplicaciones donde las bacterias halófilas moderadas pueden jugar un importante papel. Así, pueden ser utilizadas en la recuperación de fosfatos de ambientes hipersalinos, como una alternativa más barata y ecológica que la utilización de compuestos químicos (Ramos-Cormenzana, 1991), en procesamientos de residuos procedentes del procesamiento del aceite de oliva y aceitunas (salmueras), o el curtido de pieles.

Asimismo, se está trabajando en la búsqueda de bacterias halófilas productoras de diferentes compuestos de interés industrial como compuestos antimicrobianos y anti tumorales, biosurfactantes o carotenoides (Yakimov y col., 1996).

I.3. ENZIMAS BACTERIANAS EXTRACELULARES

Las enzimas son proteínas especializadas que catalizan reacciones biológicas. Constituyen una de las biomoléculas mejor estudiadas debido a su extraordinario poder catalítico y a su especificidad de acción. Las enzimas microbianas han acaparado la atención de los microbiólogos desde hace mucho tiempo; no obstante, su interés ha aumentado considerablemente, y de manera especial en los últimos años, con el desarrollo de la Biología Molecular.

La historia de la producción industrial de enzimas a partir de bacterias se remonta al siglo pasado, cuando Boiden y Efront (1908) patentaron una amilasa bacteriana capaz de eliminar el almidón presente en las prendas textiles; en 1969, alrededor del 80% de los detergentes utilizados en las lavanderías contenían enzimas. A partir de entonces son muchas y variadas las enzimas microbianas utilizadas con fines industriales y que incluyen amilasas, proteasas, lipasas, DNAsas, celulasas, isomerasas y catalasas (Crueger y Crueger, 1990).

Los avances conseguidos en la Genética y la Biología Molecular, junto con las mejoras en las condiciones de producción (empleo de enzimas inmovilizadas, sistemas de

producción continuos, etc..) han aumentado considerablemente la aplicación de estas enzimas. En este punto, es interesante destacar la importancia de las enzimas producidas por microorganismos extremófilos al ser, en su mayoría, enzimas capaces de actuar en condiciones extremas de temperatura, pH o salinidad, proporcionando nuevas posibilidades en los procesos biocatalíticos (Adams y Kelly, 1995; Eisenberg, 1995).

Cuando se estudian las actividades enzimáticas de las bacterias halófilas y en especial, su relación con la salinidad, es obligado diferenciar tres categorías enzimáticas: i) enzimas intracelulares o citoplasmáticas, que no están expuestas a las concentraciones salinas del medio externo, pero sí a la baja concentración de iones y a la presencia de solutos orgánicos característicos del medio intracelular; ii) enzimas asociadas a la membrana, incluidas las proteínas de transporte, expuestas a ambos medios, extra e intracelular; y iii) enzimas extracelulares propiamente dichas, expuestas a las concentraciones salinas externas.

Vamos a centrar nuestros estudios en las enzimas extracelulares producidas por microorganismos halófilos.

Como se ha mencionado anteriormente, en los ambientes hipersalinos los dos grupos de microorganismos predominantes son las bacterias halófilas moderadas y las arqueas halófilas extremas (haloarqueas). Cada vez son más las enzimas extracelulares que se han aislado y caracterizado de estos microorganismos y por ello vamos a realizar una revisión cronológica de las mismas (Ventosa y col., 2005).

I.3.1. Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas

En general, la actividad de las enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas depende de la concentración salina presente en el medio, requiriéndose en muchos casos, altas concentraciones salinas para su óptima actividad (Ventosa y col., 1998c).

Los primeros estudios sobre enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas fueron llevados a cabo por Onishi y Kamekura en Japón a principios de los años 70. En esa época se describieron varias enzimas extracelulares aunque ninguna de ellas fue caracterizada a nivel molecular. El primer trabajo de una enzima extracelular producida por una bacteria halófila moderada, data de 1972 en el que Onishi describió la producción de una amilasa por *Nesterenkonia halobia* (anteriormente denominado *Micrococcus halobius*). Más tarde, la enzima fue purificada y parcialmente caracterizada, presentando una actividad óptima a pH 6-7 en 0,25 M de NaCl ó 0,75 M de KCl a 50-55°C. La enzima sufría una pérdida drástica de actividad en agua destilada (Onishi y Sodona, 1979). Dos años después, Kamekura y Onishi (1974a) describieron una nucleasa, denominada nucleasa H, producida por *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* ATCC

21727, aislado de pasta de soja. Este microorganismo no es capaz de crecer en medios sin NaCl y aunque crece óptimamente en medios con 1-3 M NaCl, la máxima producción de la nucleasa se produce en medios de cultivo con 2-4 M de NaCl. Esta enzima posee tanto actividad ribonucleasa como dexosirribonucleasa y presenta un peso molecular de 99 kDa (Kamekura y Onishi, 1978a). La producción de la nucleasa se inhibe completamente con la adición de 40 mM MgSO₄ al medio complejo conteniendo 2 M de NaCl; además, esta inhibición de la producción enzimática va acompañada de la floculación de las células (Kamekura y Onishi, 1976;1978b). Para su producción, se ha descrito un medio en el que se obtiene la nucleasa H en grandes cantidades en un fermentador (Kamekura y Onishi, 1979). Se ha propuesto su aplicación en el ámbito industrial en la fabricación de aditivos alimenticios tales como los ácidos 5'-guanílico y 5'-inosílico (Kamekura y col., 1982). Estos mismos autores, Kamekura y Onishi (1983), estudiaron la influencia de distintos aniones y cationes en la producción de la nucleasa H de este microorganismo, demostrando que se detectaba actividad cuando el medio contenía NaCl, KCl, RbCl, CsCl y Na₂SO₄, pero no era detectable cuando el medio contenía LiCl, NaBr, NaI ó NaNO₃. Basándose en los datos obtenidos anteriormente, se diseñó un biorreactor con células floculadas de *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* sobre las cuales estaba adsorbida la nucleasa H para la producción industrial de 5'-nucleótidos a partir de RNA (Onishi y col., 1988; 1991).

Una segunda enzima extracelular con actividad 5'-nucleotidasa, producida también por *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* ha sido parcialmente purificada (Onishi y col., 1984). Esta enzima muestra su máxima actividad a 2 M NaCl ó 2,5 M de KCl y 0,1 mM Co²⁺ ó 0,1 mM Mn²⁺. Asimismo, Kobayashi y colaboradores (1986), describieron una amilasa producida por *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* que presentaba una actividad máxima cuando se cultivaba en un medio con una concentración 2 M de NaCl. Sin embargo, cuando crece a salinidades más bajas, la enzima secretada es inactiva, si bien puede ser reactivada si se dializa frente a una solución 2,5 M de NaCl. Esta enzima se estabiliza con CaCl₂ y está constituida por dos subunidades óptimamente activas a 0,75-1 M de NaCl o KCl y pH 6-7 a 55°C (en ausencia de CaCl₂) ó 65°C (en presencia de CaCl₂) (Kobayashi y col., 1986).

Otro estudio pionero, describe la producción de una proteasa extracelular por *Bacillus* sp. no. 21-1 aislado de una salina. Esta cepa crece óptimamente en medios con 1-2 M de NaCl, mientras que la producción de la enzima es óptima a concentraciones 1 M de NaCl; asimismo, la adición de 2 M KCl disminuye la producción de la misma (Kamekura y Onishi, 1974b). No obstante, no existen estudios posteriores sobre la purificación de esta proteasa.

Un comportamiento similar respecto a la dependencia de la concentración de sal del medio lo encontramos en la amilasa producida por una bacteria halófila moderada perteneciente al género *Acinetobacter*. La máxima producción de la amilasa tiene lugar cuando el microorganismo se cultiva en medios con 1-2 M de NaCl, producción que

disminuye cuando la salinidad es más baja o superior a 4 M de NaCl. Esta enzima tiene su óptimo de actividad a 0,2-0,6 M de NaCl o KCl, pH 7 y 50-55°C y es también estabilizada por CaCl₂ (Onishi y Hidaka, 1978).

Van Qua y colaboradores (1981) describieron y purificaron una proteasa producida por *Pseudomonas* sp. A-14. El peso molecular estimado de dicha enzima fue de 12 kDa y presentaba su máxima actividad a pH 8 y 18% de NaCl.

Onishi y colaboradores (1983) describieron una nucleasa extracelular producida por *Bacillus* sp. N23-2 (ATCC 49085). El óptimo de actividad se produce en medios con 1,4-3,2 M de NaCl ó 2,3-3,2 M de KCl, siendo estimulada su síntesis por la presencia de iones Mg²⁺ y Ca²⁺. La actividad se pierde por diálisis frente a agua, si bien los iones Ca²⁺ y la diálisis frente a una solución 3,5 M de NaCl restauran casi totalmente la actividad. El pH óptimo es 8,5 y su temperatura óptima 50 ó 60°C, cuando el sustrato es ADN o ARN ya que, al igual que la nucleasa producida por *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*, es capaz de hidrolizar ADN y ARN. Posteriormente, esta cepa, capaz de crecer óptimamente en medios con 15% de sales fue descrita como una nueva especie del género *Bacillus*, *Bacillus halophilus* (Ventosa y col., 1989a).

En 1994 se describió la existencia de otra amilasa producida por *Micrococcus* sp. 4 que muestra su máximo de actividad en medios con una concentración 1 M de NaCl, pH 7,5 y 50°C (Khire 1994).

Nuestro grupo de investigación ha realizado la clonación y caracterización del gen que codifica una enzima extracelular producida por una bacteria halófila moderada, concretamente el gen *amyH*, que codifica una α -amilasa producida por *Halomonas meridiana* DSM 5425. Se trata de una α -amilasa, que produce maltosa y maltotriosa como principales productos de su acción hidrolítica sobre el almidón. Dicha amilasa presenta una actividad óptima a 37°C y pH 7 aunque es estable a valores de pH alcalinos, y muestra una elevada tolerancia a las condiciones salinas del medio, presentando actividad hasta, incluso, un 30% de salinidad y con un óptimo al 10% de sales. La producción máxima tiene lugar en cultivos en fase exponencial tardía o estacionaria de crecimiento, en medios con un 5% de sales, en ausencia de glucosa y en presencia de almidón y elevada oxigenación (Coronado y col., 2000a; 2000b). Este gen, *amyH*, se expresó con éxito en *Halomonas elongata* y *Escherichia coli*. Es importante destacar que este fue el primer trabajo en el que se describe la clonación de un gen de una enzima extracelular producida por una bacteria halófila moderada y además su expresión en una bacteria no halófila. Otro resultado interesante de este estudio es la expresión heteróloga de una β -amilasa, *AmyA*, producida por *Bacillus licheniformis*, en dos bacterias halófilas moderadas, *Halomonas elongata* y *Halomonas meridiana* (Coronado y col., 2000a; 2000b).

Frillingos y colaboradores (2000) clonaron el gen que codifica una α -amilasa producida por la arquea hipertermófila *Pyrococcus woesei* y lo expresaron activamente en la bacteria halófila moderada *Halomonas elongata*.

El gen *amyA* que codifica una α -amilasa producida por la bacteria anaerobia *Halothermothrix orenii* ha sido clonado, caracterizado y expresado en *E. coli*. Este gen presenta un tamaño de 1.545 pb, lo que equivale a una proteína madura de 490 aminoácidos. La enzima recombinante presenta una actividad óptima a 65°C y 5% de sales por lo que se trata de una proteína termófila capaz de actuar en presencia de sales (Mijts y Patel 2002). Sin embargo, hay que destacar, que no se observó una proporción más elevada de aminoácidos ácidos en esta proteína, característica de otras enzimas halófilas. Esta enzima recombinante ha sido la primera enzima de estas características que ha sido cristalizada (Li y col., 2002). Posteriormente, también ha sido cristalizada otra α -amilasa, *amyB* con actividad óptima a concentraciones de 10% NaCl, producida por este mismo microorganismo (Tan y col., 2003).

Recientemente, se ha descrito una nueva especie *Halobacillus karajensis*, aislada de una salina de la región de Karaj (Irán) productora de una amilasa extracelular en medios que contenían almidón y un 15% de Na_2SO_4 ó 10% de NaCl. La máxima actividad enzimática se conseguía cuando el medio de cultivo contenía 5% de NaCl a pH 7,5-8,5 y 50°C (Amoozegar y col., 2003a; 2003b). Todavía no se conocen estudios sobre su purificación.

Nuestro grupo de investigación ha descrito la bacteria *Marinobacter lipolyticus* (Martín y col., 2003) capaz de secretar al medio una lipasa extracelular y actualmente se está trabajando en su purificación y la clonación del gen responsable de su síntesis (Martín y col., 2004).

Recientemente se ha purificado y caracterizado una serina proteasa producida por *Filobacillus* sp. RF2-5, una bacteria halófila moderada aislada en Tailandia. La enzima posee un peso molecular de 49 kDa y presenta su actividad óptima a 60°C, pH 10-11 y a una concentración del 10% de NaCl siendo estable incluso a concentraciones del 25% de NaCl (Hiraga y col., 2005).

Por último, debemos mencionar que se han descrito otras enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas aunque no se han estudiado con detalle hasta el momento, como es el caso de dos enzimas agarolíticas producidas por *Alterococcus agaroliticus* y *Pseudomonas* sp. W7, respectivamente (Shieh y Jean 1998; Ha y col., 1997).

En la Tabla 1 se muestra una selección de enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas y la concentración óptima de NaCl para su actividad.

Tabla 1. Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas

Enzima	Microorganismo	Concentración óptima de NaCl (%)	Referencia
Amilasa	<i>Nesterenkonia halobia</i>	3-11	Onishi (1972); Onishi y Sodona (1979)
Nucleasa H	<i>Micrococcus varians subsp. halophilus</i>	16	Kamekura y Onishi (1974a, 1978a)
Proteasa	<i>Bacillus sp.</i>	3	Kamekura y Onishi (1974b)
Amilasa	<i>Acinetobacter sp.</i>	1-3	Onishi y Hidaka (1978)
Proteasa	<i>Pseudomonas sp.</i>	18	Van Qua y col. (1981)
Nucleasa	<i>Bacillus halophilus</i>	11-17	Onishi y col. (1983)
5'-nucleotidasa	<i>Micrococcus varians subsp. halophilus</i>	12	Onishi y col. (1984)
Amilasa	<i>Micrococcus varians subsp. halophilus</i>	4,5-6	Kobayahi y col. (1986)
Amilasa	<i>Micrococcus sp.</i>	6	Khire (1994)
Amilasa H	<i>Halomonas meridiana</i>	10	Coronado y col. (2000a, 2000b)
Amilasa A	<i>Halothermothrix orenii</i>	5	Mijts y Patel (2002)
Amilasa	<i>Halobacillus karajensis</i>	5	Amoozegar y col. (2003a)
Proteasa	<i>Filobacillus sp.</i> RF2-5	10	Hiraga y col. (2005)

I.3.2. Enzimas extracelulares producidas por haloarqueas

Se han descrito muchas enzimas extracelulares producidas por arqueas no halófilas, sin embargo, debido a que muchos de los métodos comúnmente utilizados en la purificación de proteínas no son efectivos a elevadas concentraciones de sal, no hay muchas enzimas extracelulares producidas por haloarqueas que hayan sido purificadas y caracterizadas. Estas enzimas son activas a elevadas concentraciones de sal y en la mayoría de los casos se ha descrito una pérdida de funcionalidad a bajas concentraciones salinas (Madern y col., 2000). Kamekura (1995) ha descrito diversos métodos de purificación de proteasas producidas por haloarqueas.

Los primeros estudios de enzimas extracelulares producidos por arqueas halófilas extremas, al igual que los de bacterias halófilas moderadas, datan de principios de los años 70, en el que se mencionó la presencia de microorganismos halófilos extremos capaces de secretar al medio lipasas, proteasas y amilasas, aunque no se realizó ninguna caracterización de las mismas (Norberg y Hofsten, 1969; Good y Hartman, 1970; González y Gutiérrez, 1970).

No es hasta 1983 cuando se estudia la primera hidrolasa extracelular producida por una haloarquea. Se trataba de una serina proteasa producida por *Halobacterium salinarum* (*halobium*). Esta enzima fue purificada, presentaba un peso molecular de 41 kDa y perdía drásticamente e irreversiblemente su actividad a concentraciones inferiores a 2 M de NaCl (Izotova y col. 1983).

Otro estudio pionero en enzimas extracelulares de arqueas fue realizado por Oren (1983a), quien describió una amiloglucosidasa extracelular, la cual hidroliza el almidón a glucosa, producida por *Halorubrum sodomense* (anteriormente *Halobacterium sodomense*), una arquea aislada del Mar Muerto. Esta enzima requiere al menos 0,5 M de NaCl para su actividad y es capaz de actuar hasta 4 M de NaCl (Oren, 1983a). Posteriormente, esta enzima fue purificada y se determinó que es un dímero constituido por dos subunidades de 72 y 82 kDa, respectivamente (Chaga y Porath, 1993).

De las tres proteasas extracelulares producidas por *Natrialba asiatica* (anteriormente designada cepa 172 P1), una de ellas, una serina proteasa denominada halolisina 172P1, fue purificada y estudiada en detalle. Esta enzima mostraba su máxima actividad a 75-80°C, con un 25% de NaCl y a un valor de pH de 10,7 por lo que se trata de una enzima capaz de actuar en condiciones extremas de temperatura, salinidad y pH (Kamekura y Seno 1990). Estudios posteriores permitieron la clonación del gen *hly*, que codifica esta halolisina 172 P1 y su expresión en otra arquea, *Haloferax volcanii* (Kamekura y col., 1992).

Las arqueas de los géneros *Natronococcus* y *Natronobacterium* son haloalcalófilas, por lo que requieren elevadas concentraciones de sal y valores alcalinos de pH para su crecimiento. Yu (1991) purificó una proteasa producida por *Natronobacterium* sp. A2, la cual presenta su máxima actividad a pH 9, 50°C y en presencia de 1 M de NaCl. Otra enzima producida por una haloarquea es una α -amilasa secretada por *Natronococcus* sp. Ah-36 (recientemente denominada *Natronococcus amylolyticus*). Esta enzima mostraba un máximo de actividad a 55°C en presencia de 2,5 M de NaCl y perdía su actividad a concentraciones inferiores a 1 M de NaCl. Es notable la alta presencia de aminoácidos ácidos, como glutámico o aspártico, en su superficie, lo que hace que la enzima sea estable en estas condiciones tan extremas de salinidad (Kobayashi y col., 1992). El gen que codifica esta proteína ha sido clonado y presenta un tamaño de 1.512 pb. Al igual que el gen *hly* anteriormente descrito, que codifica la halolisina 172 P1 (Kamekura y col., 1992), este gen también se ha expresado en *Haloferax volcanii* (Kobayashi y col., 1994).

En 1992, Stepanov y colaboradores describieron que *Haloferax mediterranei* (anteriormente denominada *Halobacterium mediterranei*) produce una serina proteasa extracelular cuya actividad aumenta linealmente con la concentración de NaCl entre el rango 2 y 5 M. La enzima posee un peso molecular de 41 kDa y su secuencia N-terminal revela que pertenece a la familia de las subtilisinas. Asimismo, también se ha descrito que *Haloferax mediterranei* produce otra enzima extracelular, la halolisina R4, cuyo gen ha sido caracterizado y expresado en *Haloferax volcanii* (Kamekura y col., 1996).

También ha sido descrita y parcialmente purificada otra proteasa extracelular producida por *Halobacterium salinarum* (*halobium*). Esta enzima presenta una alta dependencia de sal, perdiendo drásticamente su actividad en ausencia de NaCl (Ryu y col., 1994).

Los estudios de expresión de genes en haloarqueas presentaban el inconveniente de que los genes informadores convencionales no eran activos a las altas concentraciones de sales presentes en el citoplasma de estos microorganismos. Un primer paso en la solución de este problema ha sido la purificación de una β -galactosidasa de *Haloferax lucentense* (anteriormente denominada "*Haloferax alicantei*") y la clonación del gen responsable de su síntesis (Holmes y col., 1997). Esta enzima es óptimamente activa a 4 M de NaCl. El gen, *bgatH*, que codifica esta enzima ha sido clonado y expresado en *Halobacterium salinarum* (Holmes y col., 2000; Patenge y col., 2000; Gregor y Pfeifer 2001).

En 1997, se detectó que *Natronococcus occultus*, microorganismo haloalcalófilo capaz de vivir en ambientes con 3-4 M de NaCl y valores de pH de 10-11, producía una proteasa extracelular (Studdert y col., 1997), pero no fue hasta 2001 cuando fue purificada y caracterizada. Esta proteína, denominada EP, presenta su máxima actividad a 1 M de NaCl o KCl. Estudios de estabilidad de esta enzima frente a diferentes concentraciones de sales revelan que EP es capaz de retener hasta el 100% de su actividad durante 7 días en concentraciones 3 M de NaCl o KCl, y su actividad es nula en ausencia de sal (Studdert y col., 2001; Elsztein y col., 2001).

Natrialba magadii secreta una serina proteasa al final de su fase exponencial de crecimiento que ha sido purificada por Giménez y colaboradores (2000). Esta enzima, al igual que todas las descritas hasta el momento, presenta una alta dependencia de sal para su actividad siendo en este caso la concentración óptima a 1,5 M de NaCl o KCl. No existe información referente al gen responsable de su síntesis.

Además de la serina proteasa anteriormente descrita (Stepanov y col., 1992), *Haloferax mediterranei* produce una α -amilasa cuando el medio es enriquecido con almidón. Esta enzima que ha sido purificada y caracterizada presenta su máxima actividad a 3 M de NaCl y pierde totalmente su actividad en ausencia de NaCl (Pérez-Pomares y col., 2003).

Se han descrito dos enzimas, una β -xilanasas y una β -xilosidasas producidas por *Halorhabdus utahensis*. Ambas enzimas son activas en un rango de salinidad muy amplio,

desde 0,05 hasta 27% de NaCl presentando un máximo de actividad entre 5-15% de NaCl para la actividad xilanolítica y un 5% para la enzima β -xilosidasa (Waino y Ingvorsen 2003).

Por último, *Haloarcula* sp. cepa S-1, produce una α -amilasa de 70 kDa cuya actividad óptima tiene lugar a 50°C, 25% de NaCl y pH 7. Esta enzima presenta la característica de ser activa y estable en varios disolventes orgánicos como benceno, tolueno y cloroformo (Fukushima y col., 2005).

En la Tabla 2 se muestra una selección de enzimas extracelulares producidas por haloarqueas y la concentración de NaCl óptima requerida para su actividad.

Tabla 2. Enzimas extracelulares producidas por haloarqueas

Enzima	Microorganismo	Concentración óptima de NaCl (%)	Referencia
Amilasa	<i>Halobacterium salinarum</i>	1	Good y Hartman (1970)
Serina proteasa	<i>Halobacterium salinarum</i>	ND	Izotova y col. (1983)
Amiloglucosidasa	<i>Halorubrum sodomense</i>	7,5	Oren (1983a); Chaga y Porath (1993)
Serina proteasa	<i>Natrialba asiatica</i>	10-15	Kamekura y Seno (1990); Kamekura y col. (1992)
Proteasa	<i>Natronobacterium</i> sp.	5,5	Yu (1991)
Amilasa	<i>Natronococcus amylolyticus</i>	15	Kobayashi y col. (1992, 1994)
Proteasa	<i>Haloferax mediterranei</i>	ND	Stepanov y col. (1992)
Proteasa	<i>Halobacterium salinarum</i>	23	Ryu y col. (1994)
β -galactosidasa	<i>Haloferax lucentense</i>	23	Holmes y col. (1997)
Serina proteasa	<i>Natrialba magadii</i>	6-9	Giménez y col. (2000)
Serina proteasa	<i>Natronococcus occultus</i>	6	Studdert y col. (2001)
α -amilasa	<i>Haloferax mediterranei</i>	18	Pérez-Pomares y col. (2003)
β -xilanasa	<i>Halorhabdus utahensis</i>	5-15	Waino y Ingvorsen (2003)
β -xilosidasa	<i>Halorhabdus utahensis</i>	5	Waino y Ingvorsen (2003)
α -amilasa	<i>Haloarcula</i> sp.	25	Fukushima y col. (2005)

ND, no determinado

I.3.3. Adaptación de las enzimas a los ambientes salinos

Las altas concentraciones de sal afectan a la conformación de las proteínas, es por ello que las enzimas halófilas presentan unos mecanismos específicos para ser estables a estas concentraciones salinas. Estos mecanismos de adaptación implican tanto mecanismos de interacción con el solvente como cambios en la estructura tridimensional de las proteínas (Madern y col., 2000). El mantenimiento de la estructura de las proteínas se debe a un cúmulo de interacciones débiles en el interior de la cadena polipeptídica y de las interacciones de la proteína con el disolvente (Cordone y col., 1999).

Hay que diferenciar los mecanismos de adaptación a la sal que presentan las enzimas de los microorganismos halófilos extremos y los que presentan las bacterias halófilas moderadas. Las enzimas de microorganismos halófilos extremos tienen que soportar elevadas concentraciones de sal tanto dentro (citoplasma) como en el medio extracelular. No ocurre lo mismo con las enzimas de bacterias halófilas moderadas, ya que en el interior de estas bacterias la concentración de sal no es elevada, sin embargo la concentración salina aumenta en el medio extracelular, por lo que la enzima se tiene que adaptar a este cambio de salinidad.

Los microorganismos halófilos extremos acumulan iones Na^+ y K^+ en su citoplasma para mantener el equilibrio osmótico con el exterior; las proteínas se protegen de esta alta concentración de iones intracelulares exponiendo cargas negativas en su superficie. En general, las proteínas de haloarqueas necesitan altas concentraciones salinas para mantener su actividad; estas concentraciones pueden alcanzar valores de 2-4 M de Na^+ o K^+ , aunque existen algunas excepciones. Para poder ser solubles, estables y activas a tan altas concentraciones salinas, las proteínas han desarrollado mecanismos específicos que consisten fundamentalmente en la modificación de la composición de aminoácidos (Madern y col., 2000; Joo y Kim, 2005). Así, los estudios cristalográficos de la estructura de varias proteínas halófilas han mostrado una serie de características estructurales comunes que se pueden considerar como estrategias adaptativas a altas concentraciones salinas (Frolow y col., 1996; Yamada y col., 2002). Estas proteínas se caracterizan por presentar un aumento de residuos ácidos en su superficie que contribuyen a la solubilidad de la enzima (Lanyi, 1974; Madigan y Oren, 1999; Madern y col., 2000; Mevarech y col., 2000), un incremento del contenido en serinas y treoninas y una disminución de los residuos hidrofóbicos y alifáticos (Madern y col., 1995). El carácter hidrofóbico de la superficie proteica se reduce mediante una disminución de los residuos de lisina expuestos en la superficie (Britton y col., 1998). Estas proteínas no son sólo funcionales a altas concentraciones salinas, sino que generalmente requieren estas altas concentraciones para mantener su estabilidad. Por todo esto, la mayoría de las proteínas de las haloarqueas se desnaturalizan cuando se resuspenden en soluciones con un contenido menor de 1-2 M de NaCl, hecho por otra parte lógico, ya que estas enzimas nunca están sometidas a

concentraciones tan bajas de sal, porque las arqueas no suelen vivir en condiciones de baja salinidad. Estas proteínas presentan una elevada proporción de glutámico ya que este aminoácido posee una alta capacidad de ser hidratado. Además, a diferencia de las proteínas no halófilas, estas proteínas presentan sitios de unión a aniones en su superficie. La elevada carga negativa de la superficie de estas proteínas sirve para mantener una capa de hidratación en la forma de cationes K^+ y Na^+ hidratados. Por otro lado, es evidente que no sólo es importante la densidad de carga, sino que la hidratación y, por tanto, la solubilidad, alivia la interacción de estas cargas en el espacio tridimensional.

Una de las características más interesantes de las proteínas es el hecho de haber conservado en su secuencia de aminoácidos una considerable memoria sobre su historia evolutiva. Así, se han diseñado modelos evolutivos que intentan explicar la evolución sufrida por estas proteínas que les permite ser activas a estos altos valores de sal (Dennis y col., 1997).

Esta estrategia de acumular altas concentraciones de iones Na^+ y K^+ en el medio intracelular para mantener el equilibrio osmótico se ha descrito fundamentalmente en haloarqueas y en un grupo especializado de bacterias halófilas anaerobias del orden Halanaerobiales (Lanyi, 1974; Oren 1986; Oren y col., 2002). El análisis proteico del genoma de *Halobacterium* NRC-1, recientemente secuenciado, un representante por excelencia de las arqueas halófilas extremas, confirma las características anteriormente mencionadas (Ng y col., 2000). Además, estas características se han encontrado en otras proteínas caracterizadas de haloarqueas (Fukuchi y col., 2003). Ejemplos de estas proteínas son, entre otras, una dihidrofolato reductasa y una isocitrato deshidrogenasa producidas por *Haloferax volcanii* (Pieper y col., 1998), una malato deshidrogenasa (fue la primera enzima halófila que se purificó) y una 2Fe-2S ferredoxina producida por *Haloarcula marismortui* (Holmes y Halovorson, 1965; Zaccai y col., 1989; Mevarech y col., 2000) y una glutamato deshidrogenasa producida por *Halobacterium salinarum* (Britton y col., 1998).

Salinibacter ruber (Antón y col., 2002) es una bacteria halófila extrema y al igual que ocurre en las haloarqueas, acumula iones K^+ y Cl^- en su citoplasma para mantener el equilibrio osmótico con el exterior. Las enzimas purificadas de esta bacteria presentan diferentes comportamientos respecto a la sal. Así, se han descrito enzimas como una isocitrato deshidrogenasa (Oren y Mana, 2002), una ácido graso sintetasa (Oren y col., 2003) y una glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Oren y Mana, 2003) que se comportan como enzimas halófilas, siendo altamente dependientes de sal para su actividad. Otras enzimas de *S. ruber* pueden ejercer su función tanto en ausencia como en presencia de sal, son las enzimas isocitrato deshidrogenasa (Oren y Mana, 2002) y una glicerol kinasa (Sher y col., 2004). Y por último, han sido descritas dos enzimas, una malato deshidrogenasa (Oren y Mana 2002) y una hexokinasa (Oren y Mana, 2003) que presentan las

características de ser estables y activas en ausencia de sal, perdiendo actividad a altas concentraciones salinas. Por lo tanto, las proteínas de *S. ruber* presentan comportamientos individuales distintos ante la presencia de sal. No debemos, sin embargo, excluir que las propiedades no halófilas de la malato deshidrogenasa y de la hexoquinasa de esta bacteria puedan ser debidas a un proceso de transferencia genética horizontal durante el proceso de evolución a partir de otro microorganismo (Madern y Zaccai, 2004).

Como estrategia para mantener el equilibrio osmótico, las bacterias halófilas moderadas acumulan solutos compatibles, por lo que no es necesario que mantengan altas concentraciones iónicas en su interior. En las proteínas aisladas de estas bacterias la proporción de aminoácidos ácidos no es tan elevada como en haloarqueas, aunque algunos autores han observado un ligero aumento de aminoácidos ácidos en las proteínas de estos microorganismos (Gandghir y col., 1995; Coronado y col., 2000b).

Oren y colaboradores (2005), en base a la secuencia casi completa del genoma (<http://genome.jpi-psf.org/microbial/index.html>) de la bacteria *Chromohalobacter salexigens*, han realizado un análisis comparativo de varias proteínas de distintos compartimentos celulares en base a su punto isoeléctrico (pI), que proporciona una indicación de la naturaleza acídica de las mismas. Estos autores han comparado estas proteínas con sus correspondientes ortólogas tanto de bacterias no halófilas, concretamente *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, como con proteínas de la haloarquea *Halobacterium* sp. NRC-1, utilizando para ellos sus genomas disponibles en las bases de datos (Tabla 3).

Así, se ha comparado los valores de pI tanto de proteínas citoplasmáticas, como de proteínas del metabolismo central, proteínas ribosómicas y proteínas asociadas a la membrana interna del sistema de transporte ABC, observándose un ligero carácter más ácido en las proteínas de *C. salexigens* que en las proteínas no halófilas de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Las proteínas de *Halobacterium* sp. NRC-1 presentan claramente, un carácter marcadamente ácido. También han comparado proteínas embebidas en la membrana interna, concretamente permeasas del sistema de transporte ABC con sus correspondientes ortólogos; en este caso no se observan diferencias entre *C. salexigens* y las proteínas no halófilas. Esto puede ser debido a que estas proteínas están protegida por la membrana citoplasmática y están más influenciadas por las propiedades de ésta que por el ambiente citoplasmático o periplásmico. Igualmente las proteínas de *Halobacterium* sp. NRC-1 presentan un marcado carácter ácido. Sin embargo, al hacer esta misma comparación con proteínas periplásmicas del sistema de transporte ABC, se observa un claro aumento del carácter ácido en las proteínas de *C. salexigens* con respecto a sus ortólogos no halófilos. Los autores atribuyen estos resultados al hecho de que la membrana externa de las bacterias Gram-negativas es permeable a los iones. En todos los casos las proteínas de *V.*

cholerae presentaban una acidez intermedia entre las proteínas no halófilas y las proteínas de *Halobacterium* sp. NRC-1.

Tabla 3. Valores de pl de proteínas de diversos microorganismos (Oren y col., 2005)

Gen	<i>C. salexigens</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Halobacterium</i> sp.
Proteínas del metabolismo central ^a	5,10 ± 0,34 (12)	5,66 ± 0,49 (12)	5,80 ± 0,55 (12)	5,54 ± 0,44 (12)	4,22±0,14 (6)
Proteínas estructurales de ribosomas ^a	10,10 ± 2,15 (53)	10,41 ± 1,67 (53)	10,37 ± 1,81 (53)	10,28 ± 1,88 (53)	5,81 ± 2,56 (55)
ATPasas asociadas al sistema de transporte ABC ^a	6,67 ± 1,47 (50)	6,93 ± 1,63 (73)	7,06 ± 1,62 (62)	6,90 ± 1,41 (54)	4,42 ± 1,10 (26)
Permeasas de membrana asociadas al sistema de transporte ABC ^b	9,19 ± 1,56 (68)	9,18 ± 1,44 (77)	9,24 ± 1,49 (60)	8,65 ± 1,75 (53)	6,68 ± 2,46 (27)
Proteínas periplásmicas asociadas al sistema de transporte ABC ^c	4,54 ± 1,13 (55)	6,81 ± 1,56 (59)	7,28 ± 1,33 (44)	5,68 ± 1,03 (39)	4,11 ± 0,14 (6)

^aProteínas del citoplasma

^bProteínas asociadas a la membrana interna

^cProteínas periplásmicas

Los datos de la tabla presentan la desviación estándar y entre paréntesis se indica el número de proteínas utilizadas para calcular cada valor

Los microorganismos utilizados en esta comparación son: *Chromohalobacter salexigens*, *Escherichia coli* K-12, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Vibrio cholerae* 01 El Tor N16961, *Halobacterium* sp. NRC-1

1.3.4. Proteasas microbianas

Como hemos descrito anteriormente, son muy diversas las enzimas hidrolíticas producidas por microorganismos halófilos moderados y extremos. Por ello, a partir de este momento, vamos a centrar nuestra descripción en las proteasas, las cuales ocuparán el estudio central de este trabajo.

1.3.4.1. Definición

Las proteasas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total de proteínas. También son llamadas peptidasas, indicando así que son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos. Constituyen uno de los grupos funcionales más extensos de proteínas, con más de 560 miembros descritos (Barret y col., 1998; Supuran y col., 2002). Estas enzimas proteolíticas se encuentran en todos los seres vivos, desde virus, bacterias y arqueas, protozoos, metazoos, hongos a plantas y animales. Las proteasas juegan un importante papel en todas las funciones orgánicas, son necesarias para el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en procesos como el recambio de proteínas, la maduración de enzimas y hormonas, la coagulación de la sangre y la lisis de coágulos de fibrina, entre

otros muchos. También poseen un importante papel en la secreción de compuestos a través de las membranas celulares. Muchas de ellas son sintetizadas como zimógenos y en contacto con el sustrato al que van a hidrolizar se activan, gracias a la intervención de otras proteasas (Rao y col., 1998).

Las proteasas han sido utilizadas industrialmente desde hace décadas y constituyen las proteínas más importantes en el mercado industrial; se estima que el 40% del total de ventas de enzimas son proteasas. Tienen numerosas aplicaciones; son utilizadas en la industria de detergentes, alimentos, industria textil, fabricación de cueros, industria farmacéutica, tratamiento de aguas residuales, etc. (Rao y col., 1998; Gupta y col., 2002).

Las proteasas microbianas pueden proceder de tres orígenes distintos: (i) proteasas bacterianas, son muy diversas y abundantes. Aunque son muchas las bacterias capaces de producir proteasas, las más conocidas y estudiadas son las producidas por diferentes especies del género *Bacillus*. Además, distintas especies de este género producen proteasas alcalófilas con variadas aplicaciones industriales, principalmente como aditivos de detergentes; (ii) proteasas producidas por levaduras y hongos. Generalmente son capaces de actuar en un amplio rango de valores de pH (4 a 11) y además actúan sobre una gran diversidad de sustratos, aunque son menos termorresistentes que las proteasas bacterianas. Son especialmente interesantes para la industria alimentaria, concretamente para la elaboración de quesos, y (iii) las proteasas de origen vírico han adquirido mucha importancia en los últimos años debido a que están involucradas en la enfermedad del SIDA (Rawlings y Barrett, 1993).

Las proteasas microbianas han sido revisadas en numerosas publicaciones (Rao y col., 1998; Gupta y col., 2002; Sánchez-Porro y col., 2003; Jankiewicz y Bielawski, 2003; Watanabe, 2004; Pontempa y Pike, 2005). Algunas de las últimas proteasas que se han purificado, caracterizado y clonado han sido una dipeptidil peptidasa producida por *Streptococcus suis* (Jobin y col., 2005) y una metaloproteasa producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (García-González y col., 2004).

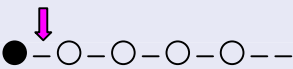
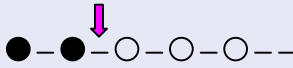

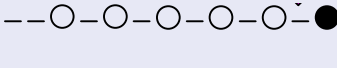
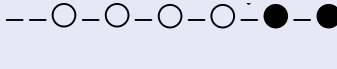
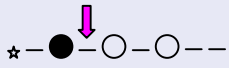
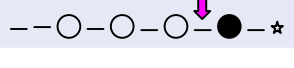
1.3.4.2. Clasificación

Debido a que las proteasas muestran una gran diversidad de mecanismos de acción y estructuras es difícil establecer una clasificación general y es por ello por lo que se han propuesto varias clasificaciones.

De acuerdo con la "International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (1992), las proteasas pertenecen al grupo 3 (hidrolasas) y dentro de éste al subgrupo 4 (peptidasas) (Tabla 4). Según este criterio, las proteasas se clasifican en **exopeptidasas** cuando hidrolizan un enlace peptídico no sustituido próximo al extremo amino o carboxi terminal del sustrato, denominándose aminopeptidasas o carboxipeptidasas, respectivamente. A su vez las carboxipeptidasas se clasifican según la naturaleza de su centro activo en: serina

(EC.3.4.16.-), metal (EC.3.4.17.-) y cisteína (EC.3.4.18.-) carboxipeptidasas. Existe un pequeño grupo dentro de las exopeptidasas que hidrolizan extremos sustituidos: son las omega peptidasas (EC.3.4.19.-). Las **endopeptidasas** se caracterizan por hidrolizar las cadenas peptídicas en las regiones internas alejadas de los extremos carboxi y amino terminal. Se dividen en 4 grupos según la naturaleza de su centro activo: serina endopeptidasas (EC.3.4.21.), cisteína endopeptidasas (EC.3.4.22.), aspartato endopeptidasas (EC.3.4.23.) y metalo endopeptidasas (EC. 3.4.24.). También existe un quinto grupo en el que se incluyen aquellas endopeptidasas cuyo mecanismo de acción no es conocido (Kenny, 1999).

Tabla 4. Tipos de peptidasas descritas en “Enzyme Nomenclature List of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (1992)

Peptidasa	Número E.C.	Modo de acción	Acción
EXOPEPTIDASAS			
			Hidrolizan el extremo amino terminal insustituido liberando un solo aminoácido, un dipéptido o un tripéptido
			Hidrolizan el extremo amino terminal insustituido liberando dipéptidos
			Hidrolizan el extremo amino terminal insustituido liberando tripéptidos
	3.4.16		Hidrolizan el extremo carboxi terminal insustituido
Carboxipeptidasas (metal)	3.4.17		
Carboxipeptidasas (cisteína)			
	3.4.13		Hidrolizan el extremo carboxi terminal insustituido liberando un dipéptido
	3.4.19	 	Sólo actúan hidrolizando péptidos de dos residuos (dipéptidos) Hidrolizan extremos carboxi o amino terminales sustituidos

Peptidasa	Número E.C.	Modo de acción	Acción
<u>ENDOPEPTIDASAS</u>	3.4.21-4.34		
Serina endopeptidasa	3.4.21		
Cisteína endopeptidasa	3.4.22		
Aspártico endopeptidasa	3.4.23		
Metalo endopeptidasa	3.4.24		
Endopeptidasa de mecanismos catalíticos desconocidos	3.4.99		

Los círculos en blanco representan residuos de aminoácidos en la cadena peptídica. Los círculos negros el aminoácido terminal, y la estrella representa un extremo sustituido. Las flechas indican el sitio de acción de la enzima.

Como se ha mencionado, las proteasas se pueden clasificar según la naturaleza de su centro activo (Rao y col., 1998) en 5 grupos: serina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas y metalo proteasas y un quinto grupo que incluiría aquellas proteasas cuyo mecanismo de acción no es conocido. Vamos a describir con más detalle cada uno de estos grupos.

Serina proteasas

Las serina proteasas se caracterizan por la presencia de residuos de serina en su sitio activo. El mecanismo catalítico de estas enzimas requiere además del residuo de serina otros residuos como histidina, aspártico o lisina para su actuación (Supuran y col., 2002). Otra característica de las serina proteasas es la presencia de una región conservada de residuos de glicina (**GXYG**) cerca del sitio activo (Brenner, 1988). Son activas, generalmente, a valores de pH neutros o alcalinos y suelen tener pesos moleculares relativamente bajos (18-35 kDa), aunque se han descrito algunas excepciones en enzimas bacterianas como la serina proteasa de *Bacillus subtilis*, la cual presenta un peso molecular de 90 kDa (Kato y col., 1992).

Estas enzimas son inhibidas irreversiblemente por diferentes compuestos tales como 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamida (4-guanidina) butano (E-64), di-isopropil fluorofosfato (DFP o DipF), fenimetilsulfonilfluoruro (PMSF) y tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) (Rao y col., 1998).

Incluyen dos grandes grupos, serina proteasas alcalinas y subtilisinas. Las **serina proteasas alcalinas** se caracterizan porque se inhiben por DFP pero no por tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) o TLCK. Sus pesos moleculares oscilan entre 15 y 45 kDa (Saeki y col., 2002). Estas proteasas son activas a pH alcalinos, siendo su pH óptimo

10. Son producidas por una gran cantidad de microorganismos pero sin duda, las más importantes son las producidas por especies del género *Bacillus* (Mane y col., 2001; Huang y col., 2003). Las **subtilisin**as son secretadas por un gran número de microorganismos, aunque al igual que las serina proteasas alcalinas, las más importantes son las producidas por especies del género *Bacillus*. Las subtilisin

as se caracterizan por poseer una conformación de su sitio activo similar a la tripsina y quimotripsina. Dentro de este grupo las más conocidas y estudiadas son la subtilisina Carlsberg y la subtilisina Novo o la proteasa bacteriana Nagase (BPN'); estas proteasas son producidas por *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivamente y son activas en condiciones extremas de pH (pH 10) y temperatura (60°C). La subtilisina Carlsberg es muy utilizada en detergentes (Rao y col., 1998).

Otra clasificación de las serina proteasas bastante útil es la que se basa en la naturaleza del sustrato al que hidrolizan. Así, destacamos las **análogas a tripsina** que se caracterizan por hidrolizar inmediatamente detrás de residuos cargados positivamente, **análogas a quimotripsina**, que se caracterizan por cortar la cadena peptídica después de una larga cadena hidrofóbica y las **análogas a elastasa** que cortan después de cortas cadenas hidrofóbicas.

Aspartato proteasas

La actividad de estas proteasas depende de la presencia de un grupo carboxílico, un ácido aspártico, en su sitio activo. Son también conocidas como proteasas ácidas ya que son activas en un rango de valores de pH de 2 a 6. Sus pesos moleculares oscilan alrededor de 40 kDa (Rao y col., 1998).

Estas proteasas no se inhiben por la presencia de agentes como DFP u otros bloqueantes de los residuos SH-, pero son fuertemente inhibidas por peptatina (Fitzgerald y col., 1990) y presentan también una alta sensibilidad a compuestos diazocetónicos como diazocetil-DL-norleucina metil ester (DAN) y 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano (EPNP) (Rao y col., 1998).

Cisteína proteasas

Estas proteasas se caracterizan por poseer en su sitio activo los aminoácidos cisteína e histidina. Son activas generalmente a pH neutro y son sensibles a p-cloromercuriobenzoato (PCMB) pero son insensibles a di-isopropilfosfofluoridato (DFP) y quelantes de metales (Rao y col., 1998).

Generalmente, las cisteína proteasas son activas solamente en presencia de agentes reductores como HCN. En base en la especificidad de la cadena peptídica que hidrolizan se clasifican en 4 grupos: (i) análogas de papaína, que son las más conocidas; (ii) análogas de tripsina con preferencia por hidrolizar residuos de arginina; (iii) cisteína proteasas que

hidrolizan específicamente ácido glutámico; y (iv) otras cisteína proteasas (Rao y col., 1998).

Metaloproteasas

Las metaloproteasas se caracterizan porque necesitan un ión divalente para su actividad. El Zn^{2+} es el metal más frecuente aunque también se ha descrito la presencia de Co^{2+} o Mn^{2+} (Barrett y col., 1998). Se pueden dividir en dos grandes grupos dependiendo de si necesitan uno ó más metales para catalizar la reacción, si bien, la mayoría de las metaloproteasas sólo requieren un metal (Supuran y col., 2002).

Un motivo muy común en las metaloproteasas lo conforman His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) que ha sido caracterizado mediante difracción de rayos X; los dos residuos de histidina son los que actúan como primer y segundo ligando del metal, generalmente el Zn^{2+} (Supuran y col., 2002).

Son inhibidas por quelantes de metales como el etilendiaminetetracético (EDTA), por el ácido etilen bis (oxietilenonitrilo) tetraacético (EGTA), fosforamidón [N-(α -rhamnospiranosiloxihidroxifosfanil)Leu-Trp], Zincov [2-(N-hidroxicarboxiamido)-4-metilpentanoil-L-Ala-Gly-NH₂], 1,10-fenantrolina, tetraetilen pentamina, y también son inactivadas mediante diálisis (Supuran y col., 2002).

La clasificación de las metaloproteasas es bastante compleja, existiendo una gran cantidad de familias y clanes. Basándonos en el pH requerido para su actividad podemos destacar las metaloproteasas neutras y las alcalinas.

➤ Neutras

Las termolisinas constituyen las proteasas más importantes de este grupo. Muestran especificidad por aminoácidos hidrofóbicos. *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus thermoproteolyticus* producen termolisinas, ambas enzimas son termoestables y presentan un peso molecular de 34 kDa (Matthews, 1988). Otras importantes metaloproteasas de este grupo son la elastasa producida por *Pseudomonas aeruginosa* y las metaloproteasas producidas por *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio vulnificus* (Kon y col., 1999; Woessner, 1998). El análisis tridimensional de la estructura de la termolisina producida por *B. thermoproteolyticus* muestra la existencia en su sitio activo formado por tres aminoácidos y una molécula de agua ligada al Zn^{2+} . Presentan el motivo característico de las metaloproteasas, HEXXH en el que la molécula de glutámico (E) actúa como tercer ligando del metal (Matthews, 1988).

Entre los inhibidores de esta familia se encuentran quelantes de metales como el fosforamidón, Zincov, EDTA, EGTA, 1,10-fenantrolina y tetraetilen pentamina (Kessler y Ohman, 1998).

➤ Alcalinas

Estas proteasas presentan un amplio rango de especificidad. Dos representantes de este grupo son las metaloproteasas producidas por *Serratia marcescens* (serralisina) y *Pseudomonas aeruginosa* (aeruginolisinas). Estas metaloproteasas presentan el motivo HEXXHXXGXXH, en el cual el tercer residuo de histidina y una molécula de agua actúan como tercer y cuarto ligando del Zn^{2+} , respectivamente. Son activas en un rango de pH de 7 a 9 y presentan pesos moleculares comprendidos entre 48 y 60 kDa (Matsumoto y col., 1984; Shibuya y col., 1991; Barret y col., 1998).

La actividad de estas metaloproteasas está inhibida por EDTA, 1,10-fenantrolina y tetrametilenpentamina pero no es inhibida por fosforamidón o Zincov (Baumann, 1998; Morihara, 1998).

Por último, también se ha descrito una clasificación de proteasas de acuerdo a su relación evolutiva (Rawlings y Barret, 1993; Rawlings y col., 2004). Este criterio clasifica las proteasas en diferentes familias y clanes. Cada familia tiene asignada una letra para cada tipo de catálisis: S, C, A, M, o U para serina, cisteína, aspartato, metaloproteasas o desconocido (unknown), respectivamente. Recientemente se ha creado la base de datos MEROPS, la cual incluye información muy detallada sobre todas las proteasas (<http://merops.sanger.ac.uk>).

En resumen, las proteasas se clasifican en primer lugar como endo o exo peptidasas, basándose en el sitio de acción sobre el sustrato. Además, según la naturaleza de su centro activo se clasifican como serina, aspartato, cisteína o metaloproteasas, y también se incluyen en diferentes familias y clanes dependiendo de la relación evolutiva de sus secuencias. Basándonos en el pH requerido para su actividad óptima se clasifican en proteasas ácidas, neutras o alcalinas. Hay que resaltar que estas clasificaciones no son excluyentes entre sí, pudiéndose clasificar una misma proteasa según varias de ellas.

I.3.5. Proteasas producidas por microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos están acaparando la atención de los investigadores en los últimos tiempos debido a su potencial biotecnológico. Son capaces de producir un gran número de enzimas extracelulares que presentan la característica de poseer valores óptimos de actividad en las condiciones extremas en las que se desarrollan; pudiéndose utilizar en múltiples aplicaciones en las que otras enzimas no son activas. Hay que destacar que también existen enzimas que aunque no son producidas por microorganismos extremófilos presentan la característica de ser activas en condiciones extremas. Las proteasas son uno de los grupos más importantes de enzimas producidos por estos microorganismos extremófilos.

Dentro de los microorganismos extremófilos distinguimos varios grupos: además de los halófilos ya descritos, destacamos los microorganismos termófilos e hipertermófilos (son

capaces de vivir a altas temperaturas), acidófilos (se desarrollan en ambientes con valores de pH ácidos), alcalófilos (sobreviven en condiciones alcalinas), psicrófilos (están adaptados a vivir a bajas temperaturas) y barófilos (soportan altas presiones atmosféricas). Otros grupos más reducidos lo constituyen los microorganismos resistentes a altas concentraciones de metales, los resistentes a altos niveles de radiación o los microaerófilos, que toleran una pequeña cantidad de oxígeno (Demirjian y col., 2001; Van den Burg, 2003).



Figura 7. Lodos contaminados de Aznalcóllar (Sevilla)

En las siguientes tablas se resumen las características de las proteasas producidas por microorganismos extremófilos descritas hasta el momento. También se incluyen las proteasas producidas por microorganismos que aunque no son extremófilos, presentan actividad óptima en condiciones extremas (Figura 7).

Los microorganismos termófilos requieren elevadas temperaturas para su crecimiento. Diferenciamos microorganismos termófilos, que crecen óptimamente a 70-80°C e hipertermófilos, que crecen óptimamente a 85-100°C. Las proteasas producidas por estos microorganismos además de ser activas a temperaturas elevadas, también son estables a dichas temperaturas durante largos periodos de tiempo, por lo que son muy interesantes en procesos industriales en las cuales se requieren altas temperaturas (Kim y col., 2002; Bruins y col., 2001).

En la Tabla 5 se muestran algunas de las proteasas extracelulares más interesantes que presentan una actividad óptima a elevadas temperaturas.

Tabla 5. Selección de proteasas microbianas extracelulares con actividad óptima a elevada temperatura

Proteasa	Organismo	Temperatura óptima (°C)	Peso molecular (kDa)	Referencia
Serina proteasa	<i>Thermus caldophilus</i>	90	ND	Taguchi y col. (1983)
Serina proteasa	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	95	52	Cowan y col. (1987)
Aminopeptidasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	85	60	Pavlova y col. (1989)
Proteasa acida	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	90	32	Fusek y col. (1990); Lin y Tang (1990)
Metalocarboxipeptidasa	<i>Thermus aquaticus</i>	80	56	Lee y col. (1992); (1994)
Proteasa	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	70	25	Tsuchiya y col. (1992)
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	60-70	36,9	Peek y col. (1993)
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	85	28-30	Fujiwara y col. (1993)

Proteasa	Organismo	Temperatura óptima (°C)	Peso molecular (kDa)	Referencia
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	75	41	Maciver y col. (1994)
Tiol proteasa	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	110	44-45	Morikawa y col. (1994)
Serina proteasa	<i>Thermococcus stetteri</i>	85	68	Klingeberg y col. (1995)
Serina proteasa	<i>Thermus</i> sp.	70	ND	Munro y col. (1995)
Aspartato proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	60	ND	Prescott y col. (1995)
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	70	28	Kim y col. (1996)
Serina proteasa	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	85	31	Lee y col. (1996)
Serina proteasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	95	150	Voorhorst y col. (1996)
Serina proteasa	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	80	130	Friedrich y Antranikian (1996)
Serina proteasa	<i>Thermoactinomyces candidus</i>	70	30	Ignatova y col. (1999)
Metalocarboxipeptidasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	90	58-59	Cheng y col. (1999); Arndt y col. (2002)
Metaloproteasa	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70	27	Sun y col. (1999)
Metaloproteasa S	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70	36	Sookkheo y col. (2000)
Metaloproteasa N		85	53	
Metaloproteasa B		90	71	
Serina proteasa	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	80	43	Kannan y col. (2001)
Carboxipeptidasa	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	95	43	Ishikawa y col. (2001)
Serina proteasa	<i>Thermoanaerobacter keratinophilus</i>	85	135	Riessen y Antranikian (2001)
Serina proteasa	<i>Natronococcus occultus</i>	60	130	Studdert y col. (2001)
Serina proteasa	<i>Thermoanaerobacter yonseiensis</i>	92,5	32	Jang y col. (2002a; 2002b)
Serina proteasa	<i>Fervidobacterium slandicum</i>	70	97	Nam y col. (2002)
Serina protease	<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	60	57	Tsuruoka y col. (2003)
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	85	42	Wu y col. (2004)

ND, no determinado

Los microorganismos alcalófilos constituyen un grupo diverso de organismos adaptados a vivir en ambientes con valores de pH alcalinos, alrededor de 10. Estos microorganismos constituyen una fuente importante de enzimas alcalinas, destacando por su importancia las proteasas. La principal aplicación de estas proteasas alcalinas es en la industria de los detergentes y en el procesado del cuero (Ito y col., 1998; Gupta y col., 2002).

En la Tabla 6 se muestran algunas de las proteasas alcalinas que han sido estudiadas hasta el momento; algunas de ellas están producidas por microorganismos alcalófilos, aunque la mayor fuente de proteasas alcalinas la proporcionan diversas especies del género *Bacillus* (Kumar y Takagi, 1999).

Tabla 6. Selección de proteasas microbianas extracelulares alcalinas

Proteasa	Organismo	pH óptimo	Peso molecular (kDa)	Referencia
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	11,5	30	Horikoshi (1971)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	9-12	ND	Aunstrup y col. (1972)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	9-12	ND	Aunstrup y col. (1972)
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	11	25	Tsai y col. (1983; 1984; 1986; 1988)
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	11	25	Tsai y col. (1983; 1984; 1986; 1988)
Proteasa HS	<i>Bacillus</i> sp.	8-12	36	Durham y col. (1987)
Proteasa AS		8-12	27,5	
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	10-12	ND	Takami y col. (1989; 1990; 1992a; 1992b)
Serina proteasa I	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	10-12	21	Tsujiyo y col. (1990)
Serina proteasa II		10,5	36	
Serina proteasa	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	11,5-13	25	Tsuchiya y col. (1991); (1992)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	12-13	28-30	Fujiwara y col. (1993)
Serina proteasa	<i>Streptomyces</i> sp.	11,5	19	Yum y col. (1994)
Serina proteasa	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	9	20-33	Rahman y col. (1994)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	12,3	28	Kobayashi y col. (1995; 1996)
Serina proteasa	<i>Streptomyces pactum</i>	7-10	30	Bockle y col. (1995)
Proteasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	8,5-11,5	31,4	Cheng y col. (1995)
Proteasa	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	11	31	Lee y col. (1996)
Serina proteasa	<i>Brevibacterium linens</i>	8,5	126	Ratray y col. (1997)
Proteasa	<i>Pimelobacter</i> sp.	9	23	Oyama y col. (1997)
Metaloproteasa	<i>Streptomyces diastaticus</i> sp.	8	11	Chaphalkar y Dey (1998)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	9,2	ND	Sumandeep y col. (1999)
Proteasa	<i>Oligotropha carboxydovorans</i>	9	23	Kang y col. (1999)
Proteasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,5	38	Ogino y col. (1999)
Proteasa	<i>Streptomyces cyaneus</i>	9	120	Petinate y col. (1999)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	9	42	Hutadilok-Towatana y col. (1999)
Proteasa	<i>Bacillus brevis</i>	10,5	ND	Banerjee y col. (1999)
Serina proteasa	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	9	53-55	Smacchi y col. (1999)
Serina proteasa		9,5	70-72	
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	11	28	Kumar y col. (1999)
Proteasa		12	29	
Proteasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	32	Bayoudh y col. (2000)
Proteasa	<i>Serratia marcescens</i>	9,5	66,5	Romero y col. (2001)
Serina proteasa A	<i>Bacillus sphaericus</i>	10,5	28,7	Singh y col. (2001)

Proteasa	Organismo	pH óptimo	Peso molecular (kDa)	Referencia
Serina proteasa B		10,5	68	
Serina proteasa	<i>Bacillus subtilis</i>	8	20	Mane y Bapat (2001)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	11,5	ND	Muderrizade y col. (2001)
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	11	29	Johnvesly y Naik (2001); Johnvesly y col. (2002)
Proteasa	<i>Bacillus pumilus</i>	11,5	28	Kumar (2002)
Proteasa	<i>Bacillus mojavensis</i>	10,5	30	Gupta y col. (1999); Beg y col. (2002)
Proteasa	<i>Alcaligenes faecalis</i>	9	67	Thangam y Rajkumar (2002)
Serina proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	11	45	Saeki y col. (2002)
Metaloproteasa	<i>Alteromonas</i> sp.	10	56	Miyamoto y col. (2002)
Serina proteasa	<i>Alcaligenes faecalis</i>	9	67	Thangam y col. (2002)
Metaloproteasa	<i>Bacillus thuringiensis</i>	10-11	ND	Tyagi y col. (2002)
Serina proteasa	<i>Bacillus alcalophilus</i>	12	ND	Kanekar y col. (2002)
Serina proteasa	<i>Arthrobacter ramosus</i>	12	ND	Kanekar y col. (2002)
Serina proteasa	<i>Xanthomonas maltophila</i>	9	36	De Toni y col. (2002)
Serina proteasa	<i>Bacillus pumilus</i>	10	32	Huang y col. (2003)
Proteasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	10	25	Zeng y col. (2003)
Proteasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	11	ND	Tang y col. (2004)

ND, no determinado

En cuanto a las proteasas producidas por microorganismos halófilos moderados, ya han sido revisadas en mayor detalle en el apartado I.3.1. de este trabajo. En la Tabla 7 se muestra un resumen de las proteasas producidas por microorganismos halófilos moderados y extremos.

Tabla 7. Selección de proteasas extracelulares producidas por microorganismos halófilos

Proteasa	Organismo	Concentración óptima de NaCl (%)	Peso molecular (kDa)	Referencia
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	3	ND	Kamekura y Onishi (1974b)
Proteasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	18	12	Van Qua y col. (1981)
Serina proteasa	<i>Halobacterium salinarum</i>	ND	ND	Izotova y col. (1983)
Proteasa	<i>Haloferax mediterranei</i>	ND	41	Stepanov y col. (1992)
Serina proteasa	<i>Halobacterium salinarum</i>	23	ND	Ryu y col. (1994)
Serina proteasa	<i>Halobacterium mediterranei</i>	10-25	41	Stepanov y col. (1992)
Serina proteasa	<i>Natrialba asiatica</i>	10-15	41,9	Kamekura y Seno (1990); Kamekura y col. (1992)
Serina proteasa	<i>Natronococcus occultus</i>	6	130	Studdert y col. (2001)
Serina proteasa	<i>Natrialba magadii</i>	6-9	45	Giménez y col. (2000)

ND, no determinado

Además de los microorganismos termófilos, alcalófilos y halófilos, otros microorganismos extremófilos pueden ser usados como fuente de enzimas proteolíticas. Con respecto a los microorganismos acidófilos se han descrito arqueas y bacterias productoras de enzimas amilolíticas capaces de actuar a valores de pH ácidos pero no hay muchos datos de microorganismos productores de proteasas capaces de actuar a estos valores de pH (Serour



Figura 8. Hábitat de microorganismos psicrófilos

y Antranikian, 2002; Bertoldo y Antranikian, 2002).

Los microorganismos psicrófilos están adaptados a vivir a temperaturas entre 0 y 5°C. Sus hábitats naturales son la Antártida, las profundidades marinas, altas montañas o los glaciares (Figura 8). Normalmente las enzimas producidas por estos microorganismos son activas entre 0°C y 20-30°C, y se desnaturalizan a temperaturas superiores a éstas. Existen estudios acerca de

enzimas producidas por microorganismos psicrófilos, como amilasas, pero la información sobre las proteasas de psicrófilos es muy escasa. Un ejemplo de una proteasa psicrófila es la producida por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de la Antártida, que ha sido purificada y cristalizada (Villeret y col., 1997). También se ha descrito la purificación y posterior clonación de los genes que codifican dos serina proteasas producidas por *Bacillus* sp. TA41 y *Bacillus* sp. TA39 (Davail y col., 1992; 1994; Narinx y col., 1992; 1997). En un estudio más reciente, Denner y colaboradores (2001) describieron la producción de una metaloproteasa por la especie *Psychrobacter proteolyticus* aislada también de la Antártida. La última proteasa extracelular descrita hasta la fecha es la producida por la bacteria psicrófila *Pseudoalteromonas* sp. DY-A. Esta proteasa sólo se secreta a temperaturas inferiores a 20°C (Zeng y col., 2003).

Los microorganismos barófilos o piezófilos son aquellos que están adaptados a vivir en ambientes con elevada presión atmosférica, como por ejemplo en las profundidades marinas, donde también la temperatura es baja (1-3°C) (Kato y Takai, 2000; Abe y Horikoshi, 2001). Aunque no hay muchos estudios relativos a estos ambientes, han sido estudiadas y caracterizadas algunas hidrolasas, como la α -maltotetrahidrolasa producida por *Pseudomonas* sp. MS300 (Kobayashi y col., 1998). Sin embargo, no se ha descrito ninguna proteasa producida por un microorganismo barófilo.

1.3.6. Aplicaciones industriales de las proteasas microbianas

El uso de enzimas microbianas a nivel industrial constituye uno de los logros biotecnológicos más importantes de los últimos tiempos. En la actualidad son más de 500 los procesos industriales que utilizan enzimas. Estos procesos abarcan casi todos los

campos, desde industria alimenticia, textil, papelera etc... (Cherry y Fidantsef, 2003). La venta mundial de enzimas microbianas generó en el año 2000 un total de aproximadamente 1.500 millones de dólares (McCoy, 2000). Las aplicaciones de estas enzimas se dividen en tres grandes grupos: enzimas utilizadas en la industria de detergentes, textil, cuero y papel; que constituye el grupo principal y abarca un 65% del total, un segundo grupo que constituye un 25% del total de las ventas formado por enzimas que se utilizan en la fabricación de productos lácteos, vinos, zumos, cerveza y en la industria pastelera; finalmente, el tercer grupo, que representa el 10% del total de ventas, está constituido por enzimas que se utilizan en la fabricación de alimentos para animales (Figura 9). La utilización de estas enzimas aporta además, la ventaja de contribuir al mantenimiento del medio ambiente. Ejemplo de ello lo encontramos en la sustitución en los detergente de los fosfatos por enzimas microbianas como amilasas o celulasas; en la fabricación de pan, productos emulsificantes químicos son sustituidos por lipasas o en la industria textil el hidróxido sódico es sustituido por amilasas y peptidasas (Cherry y Fidantsef, 2003).

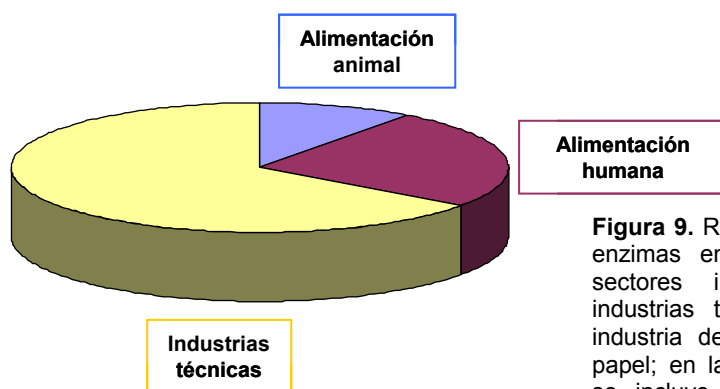


Figura 9. Representación del mercado de enzimas en el año 2000 en distintos sectores industriales. El sector de industrias técnicas (65%) incluye a la industria de detergentes, textil, cuero y papel; en la alimentación humana (25%) se incluye la fabricación de productos lácteos, cerveza, zumos y pastelería; la alimentación animal representa un 10% del total de la venta de enzimas (Kirk y col., 2002)

Las proteasas constituyen uno de los grupos enzimáticos más importantes producidos a escala industrial, ampliamente utilizados en una gran variedad de industrias, tales como la alimenticia, de bebidas, textil o papelera. Han adquirido una gran importancia en procesos de biorremediación de suelos y como alternativa a la utilización de productos químicos contaminantes en el procesamiento de los cueros (Rao y col., 1998; Kirk y col., 2002; Cherry y Fidantsef, 2003).

De las enzimas producidas industrialmente, el 75% son hidrolasas. Las proteasas representan uno de los tres grandes grupos de estas enzimas industriales y se estima que el 60% de las ventas de hidrolasas corresponden a proteasas (Rao y col., 1998).

El uso más extendido de las proteasas es en la fabricación de detergentes. El primer detergente con componentes enzimáticos, "Burnus", data de 1913; consistía en una mezcla

de carbonato cálcico con extracto pancreático. BIO-40 fue el primer detergente que contenía enzimas bacterianas y fue introducido en el mercado en 1956. Las subtilisinas son las proteasas más utilizadas en la industria de los detergentes; su misión es degradar manchas proteicas de diversos orígenes. Así, son capaces de eliminar manchas de sangre, huevo, leche, hierba y diversas salsas (Maurer, 2004). En los últimos 15 años se han realizado grandes esfuerzos para obtener proteasas más activas y específicas a partir de las aisladas de las diversas especies de *Bacillus*, que es el principal género microbiano productor de estas enzimas. Para ello, se han realizado sustituciones mediante mutagénesis dirigida en casi todos los aminoácidos de la subtilisina BPN (*Bacillus Proteasa Novo*, producida por *B. amyloliquefaciens*) y aquellos mutantes en los que se observaba una mejora de la actividad han sido patentados (Bryan, 2000; Maurer, 2004). La aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida no se limita solamente a las proteasas utilizadas en los detergentes sino a las numerosas enzimas utilizadas en distintos procesos industriales (Kirk y col., 2002; Maurer, 2004).

En la Tabla 8 se muestran distintas proteasas usadas en la actualidad como componentes de detergentes.

Tabla 8. Proteasas utilizadas en detergentes (Jones, 2003)

Enzima	Microorganismo	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Industria
Neutrasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6-7	50	Novozymes ^a
Maxatasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	8,5-9	60	Gist-Brocades ^d
Purafect	<i>Bacillus lentus</i>	10	55	Genencor Intl.
Esperasa	<i>Bacillus halodurans</i>	8,5-11	60	Novozymes
Properasa	<i>Bacillus clausii</i>	9-11	50	Genencor Intl.

^aAntes Novo Nordisk

^bActualmente forma parte de Genencor International

La mayoría de los componentes del pelo y de la piel, materias primas para el curtido del cuero son de origen proteico. El método convencional del procesado del cuero involucra el uso de numerosos compuestos químicos, muchos de los cuales originan residuos muy contaminantes para el medio ambiente. Actualmente se están empezando a usar proteasas de diferentes microorganismos como alternativa a estos compuestos con la ventaja de su inocuidad y facilidad de eliminación de residuos. Las proteasas hidrolizan selectivamente los constituyentes no colagenosos de la piel y eliminan las proteínas no fibrilares como albúminas y globulinas (Rao y col., 1998).

Otro uso muy interesante de las proteasas es en el reciclado de productos derivados de películas fotográficas o placas de rayos X. Estos residuos contienen entre un 1,5-2,0% de plata entre capas de gelatina. Es muy interesante recuperar esta plata ya que puede ser aplicada en otros procesos. Convencionalmente se recuperaba mediante quemado de las películas lo cual causaba una gran contaminación medioambiental. Además la base de estas películas, que está fabricada de poliéster, era eliminada en el proceso. Debido a que esta plata está unida a capas de gelatina es posible recuperarla mediante un tratamiento enzimático. La hidrólisis de la gelatina por parte de proteasas no sólo permite recuperar la plata sino también el poliéster con lo que constituye un proceso más rentable y menos perjudicial para el medio ambiente. Son varias las proteasas que se están utilizando con este propósito (Kumar y Tanaki, 1999; Gupta y col., 2002).

El uso de proteasas en la industria de la alimentación data de la antigüedad y así, han sido utilizadas rutinariamente en la elaboración de quesos, hidrolizados de soja y en la elaboración del pan (Perea y col., 1993; Rao y col., 1998). Las proteasas más usadas pertenecen a la familia de las aspartato proteasas. Actualmente se producen proteínas recombinantes mejor adaptadas a las necesidades concretas en la elaboración de quesos (Rao y col., 1998). Por otro lado, las proteasas son ampliamente utilizadas en la fabricación del pan ya que hidrolizan el gluten del trigo consiguiendo masas más esponjosas y amasables (Rao y col., 1998). Las proteasas también son utilizadas en la fabricación de productos derivados de la soja, ya que el uso de las mismas aumenta las propiedades funcionales de la soja (Rao y col., 1998).

Destacamos también que los hidrolizados proteicos, producidos por la actuación de diversas proteasas, son ampliamente utilizados para la elaboración de alimentos para bebés, productos dietéticos y en la alimentación hospitalaria (Ward, 1985; Rao y col., 1998; Neklyudov y col., 2000). Así, existen hidrolizados proteicos comerciales de caseína (Miprodan; MD Foods, Alemania), de suero (Lacprodan; MD Foods) o de soja (Proud; Novo Nordisk, Dinamarca) (Gupta y Lorenz, 2002).

Además, las proteasas juegan un papel muy importante en la síntesis enzimática de péptidos que presenta amplias ventajas respecto a la síntesis química. Así, son utilizadas con éxito en la síntesis de dipéptidos (Barros y col., 1999) y tripéptidos (So y col., 2000). El aspartamo es un dipéptido compuesto por ácido L-aspartico y metil éster de L-fenilalanina, el cual es ampliamente utilizado como edulcorante no calórico. La configuración L de los dos aminoácidos es la responsable del sabor dulce de este compuesto. El mantenimiento de la estereoespecificidad es crucial para el mantenimiento de su sabor dulce, pero el coste de producción química es muy elevado; por lo tanto, se ha recurrido a su producción enzimática utilizando para ello proteasas inmovilizadas. Toya Soda (Japón) y DSM (Holanda) son las principales industrias productoras de aspartamo mediante un proceso enzimático.

Es importante también el uso de las proteasas en la industria farmacéutica (Figura 10). Las proteasas producidas por distintos microorganismos se usan por vía oral para la corrección de ciertos síndromes de deficiencias enzimáticas. Colagenasas y subtilisinasa son usadas junto con antibióticos de amplio espectro en heridas y quemaduras. Del mismo modo, una asparraginasa de origen bacteriano se utiliza para eliminar la asparragina del torrente sanguíneo en algunas formas de la leucemia linfocítica (Kundrya y Simonenko, 1994; Rao y col., 1998).

Un uso muy importante de las proteasas es en el tratamiento de aguas residuales tanto domésticas como industriales ya que hidrolizan los componentes proteicos de las mismas. Una formulación que contiene enzimas proteolíticas procedentes de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *Streptomyces* sp. se ha comercializado y patentado por la empresa Genex (Jacobson y col., 1985).



Figura 10. Industria farmacéutica

Otro uso de proteasas que está siendo actualmente desarrollado, es su aplicación en la industria de obtención de seda. La sericina es un componente proteico que constituye alrededor del 25% del peso total de la seda salvaje, cubriendo la periferia de las fibras de seda para proporcionarle textura; el proceso actual mediante el cual esta sericina es eliminada es muy caro. Se ha propuesto el uso de proteasas para la eliminación de esta proteína, existiendo una patente al respecto (Kanehisa, 2000).

Por otra parte es interesante señalar que más del 90% de las enzimas que se utilizan industrialmente son enzimas recombinantes. La expresión de estas enzimas recombinantes se lleva a cabo en hongos o bacterias que a su vez han sido modificados genéticamente para optimizar la producción de la misma, llegando incluso a niveles de producción de 40 g/l (Cherry y Fidantsef, 2003).

Se ha descrito que con las técnicas de screening habitualmente utilizadas para la búsqueda de nuevas enzimas, sólo se han obtenido el 1% del total de enzimas con potencial biotecnológico. Así, actualmente, en la búsqueda de enzimas con nuevas actividades enzimáticas, está adquiriendo especial importancia la clonación directa de ADN ambiental, lo que se denomina "metagenoma" (Lorenz y col., 2002). Este método consiste en aislar ADN de muestras ambientales, digerirlo y clonarlo en vectores de expresión; posteriormente se caracterizan cada uno de los clones generados en busca de la actividad hidrolítica deseada. Esto permite obtener el ADN de todas las bacterias cultivables y no cultivables presentes en el ambiente (Lorenz y col., 2002).

I.4. SECRECIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES

Las bacterias halófilas moderadas no sólo constituyen una fuente potencial muy importante de enzimas extracelulares, sino que además son excelentes modelos biológicos para la elucidación de las bases moleculares de los mecanismos de procesamiento, transporte y secreción de enzimas halófilas. Hasta el momento no se han realizado estudios sobre la secreción de enzimas extracelulares en estas bacterias, si bien este es un proceso bastante bien estudiado en otros grupos bacterianos.

Se han descrito cinco tipos distintos de sistemas de secreción (Figura 11): el tipo I está mediado por un complejo enzimático compuesto por tres proteínas. Las proteínas que utilizan este sistema de secreción conservan la región C-terminal unida a su secuencia (Binet y col., 1997); el tipo III se encuentra fundamentalmente en bacterias patógenas, como *Yersinia* o *Shigella* (Lee, 1997); también se ha descrito un sistema particular para la secreción de la toxina pertusis en *Bordetella pertussis* denominado tipo IV (Weiss y col., 1993); el tipo V ha sido recientemente descrito y también se conoce como sistema autotransporte. Finalmente, el sistema más frecuente para la secreción de proteínas en bacteria Gram-negativas es el denominado sistema de secreción de tipo II.

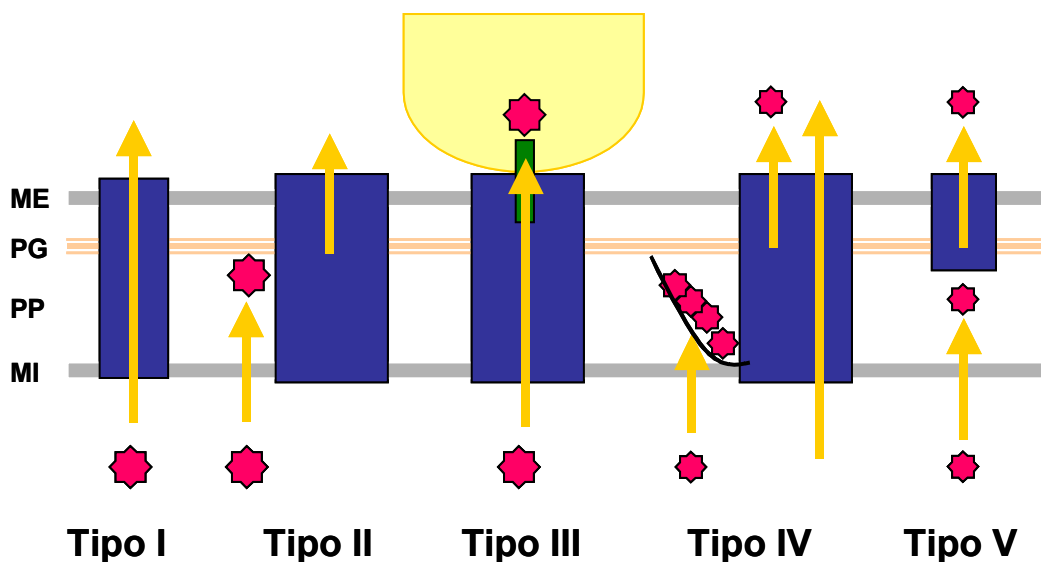


Figura 11. Esquema general de los mecanismos de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas. ME, membrana externa; PG, péptidoglicano; PP, periplasma; MI, membrana interna

I.4.1. Sistema de secreción de tipo I

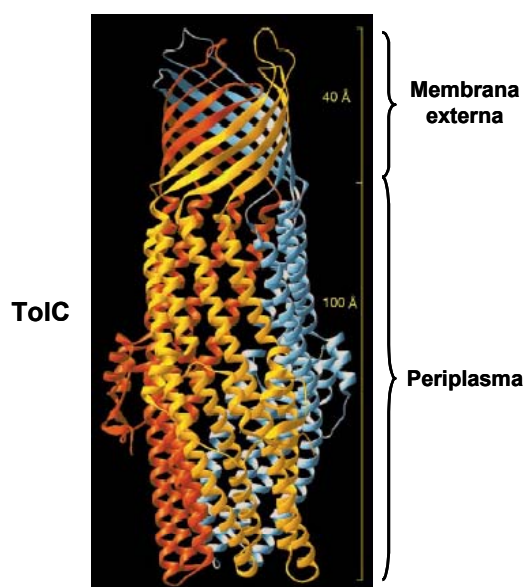


Figura 12. Estructura de la proteína TolC (Henderson y col., 2004)

El sistema de secreción de tipo I o TOSS (Type One Secretion System) en bacterias Gram-negativas permite la secreción de proteínas de varios tamaños y funciones desde el citoplasma hasta el medio extracelular en un solo paso, sin intermediarios citoplasmáticos estables. La función de las proteínas secretadas por este mecanismo varía desde hidrolasas (proteasas, fosfatasa, glucanasas, nucleasas, lipasas) a toxinas (Delepelaire, 2004).

Una característica que presentan la mayoría de las proteínas secretadas por este mecanismo es la presencia de regiones ricas en glicina (GGXGXDXXX) que unen específicamente iones Ca^{2+} .

Además de estas repeticiones de glicina, la mayoría de las proteínas presentan unas pequeñas repeticiones con alta homología a moléculas de adhesión y suelen poseer muy pocos o ningún residuo de cisteína. La señal de secreción se localiza en la proteína secretada en el extremo C-terminal y no es eliminada en el proceso.

La maquinaria de secreción de tipo I consta de tres proteínas que son indispensables para la secreción. La primera es una proteína localizada en la membrana citoplasmática que presenta un sitio de unión a ATP denominada ABC (ATP-binding cassette); es la encargada de reconocer el sustrato gracias a una señal de secreción (no necesitan péptido señal) localizada en el extremo C-terminal de la proteína secretada. Esta proteína es la responsable de la especificidad y también de proporcionar la energía necesaria para el proceso mediante la hidrólisis de ATP. Otra proteína es la denominada proteína de fusión de membrana, MFP (membrane fusion protein) o adaptador, que contiene un pequeño dominio citoplasmático localizado en su extremo N-terminal y un gran dominio periplásmico; esta proteína parece ser la responsable de establecer el contacto entre la membrana externa y la membrana citoplasmática. Y por último, la proteína OMP (outer membrane protein), se trata de un trímero que forma un gran canal a través de la membrana externa y del periplasma y que permite el paso de la proteína al exterior (Higgins, 1992; Delepelaire, 2004).

Estas proteínas están representadas en *E. coli* por las proteínas TolC (OMP), HlyD (MFP) y HlyB (ABC). La proteína TolC ha sido resuelta cristalográficamente (Figura 12). Se trata de un trímero en el que una parte está acoplada a la membrana externa (estructuras terciarias de tipo β) y el resto de la proteína (α hélices) se extienden hacia el periplasma formando un canal (140 Å) (Koronakis y col., 2000).

La secreción se produce por la interacción de la señal localizada en el extremo C-terminal con la proteína ABC que desencadena el ensamblaje secuencial de la maquinaria de secreción mediante sucesivas interacciones entre ABC, MFP y OMP. La proteína ABC asegura que sólo sean reconocidos sustratos específicos (Jarchau y col., 1994).

La primera proteína estudiada que presentó este tipo de secreción fue una α -hemolisina (HlyA) producida por una cepa patógena de *E. coli* (Goebel y Hedgpeth, 1982). También presentan este mecanismo de secreción una leucotoxina producida por *Pasteurella haemolytica* (Narayanan y col., 2002) y una adenilato ciclasa secretada por *Bordetella pertussis* (Ladant y Ullmann, 1999). Respecto a proteasas, se ha descrito que la metaloproteasa producida por *Erwinia chrysanthemi* utiliza el mecanismo de secreción de tipo I para ser exportada al exterior (Guzzo y col., 1991; Delepelaire y Wandersman, 1990; Delepelaire, 1994).

I.4.2. Sistema General de Secreción (GSP): Sistema de secreción de tipo II

Para alcanzar el exterior, las proteínas secretadas por las bacterias Gram-negativas tienen que atravesar dos membranas hidrofóbicas, la membrana interna o citoplasmática y la membrana externa. El sistema general de secreción o GSP (**G**eneral **S**ecretion **P**athway) es un mecanismo de translocación mediante el cual las proteínas atraviesan sucesivamente, en dos pasos consecutivos, ambas membranas (Sandkvist, 2001a; Filloux y col., 1998; Filloux, 2004). Para atravesar la membrana interna la proteína utiliza generalmente el sistema Sec, aunque recientemente también se ha descrito la utilización del sistema Tat (**t**win-**a**rginine **t**ranslocation) (Voulhoux y col., 2001). Para la translocación a través de la membrana externa la proteína requiere otra maquinaria. Se han descrito varios mecanismos de terminación del sistema GSP de los cuales el principal es el MTB (**M**ain **T**erminal **B**ranch) o mecanismo de secreción de tipo II. Además del sistema de secreción de tipo II existen otros mecanismos alternativos de terminación del GSP. Destacamos el mecanismo de la chaperona PapC, el mecanismo de secreción tipo ShIA y el mecanismo de agregación fimbriar (Stathopoulos y col., 2000).

Mecanismo de la chaperona PapC

Este mecanismo es el que presentan algunas cepas de *E. coli* uropatógenas para exportar al exterior y ensamblar el pili que utilizan en la colonización de su hospedador (Kuehn y col., 1992; Roberts y col., 1994). Este pili está compuesto de varias estructuras

finas y flexibles conectadas a una base rígida helicoidal. Las distintas subunidades del pili (PapA, E, F, G, H, K) son sintetizadas en el citoplasma y atraviesan la membrana interna mediante el sistema Sec. Una vez en el periplasma interactúan con la proteína chaperona PapD, también requieren la presencia de la proteína DsbA para formar los apropiados puentes disulfuros (Jacob-Dubuisson y col., 1994). La chaperona PapD es requerida para prevenir la prematura unión de las subunidades del pili en el periplasma y que se formen agregados. El complejo periplásmico subunidad-PapD es dirigido hacia la membrana externa, concretamente hacia la proteína PapC. La interacción de ambas desencadena que las subunidades del pili se liberen, se internen dentro del poro formado por la misma proteína PapD y se produzca su ensamblaje (Thanassi y col., 1998).

Secreción tipo ShIA

La hemolisina ShIA producida por *Serratia marcescens* es secretada mediante este mecanismo. El precursor de esta hemolisina es sintetizado en el citoplasma y secretado hacia el periplasma mediante el sistema Sec, perdiendo el péptido señal. La translocación a través de la membrana externa y la activación de ShIA requiere la presencia de otra proteína denominada ShIB. Esta proteína ShIB también contiene un péptido señal. Se ha propuesto que esta proteína ShIB es la que forma un poro en la membrana externa doblándose en forma de barril \square a través del cual la proteína ShIA sale al exterior (Konninger y col., 1999). Además de esta proteína ShIA, otras proteínas implicadas en la virulencia de bacterias se secretan por un mecanismo análogo, como las adhesinas HMW1 y HMW2 de *Haemophilus influenzae*, la hemolisina Hpma de *Proteus mirabilis* y la hemoaglutinina FHA de *Bordetella pertussis* (St Geme y Grass, 1998; Jacob-Dubuisson y col., 1997).

Mecanismo de nucleación/precipitación

Numerosas cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella* producen unas delgadas, irregulares, flexibles y agregables fibras llamadas "curli", que les permiten adherirse a numerosas superficies. Estos orgánulos se distinguen de otros tipos de pili tanto por su morfología como por su mecanismo de ensamblaje (Soto y col., 1999). Las bacterias que los sintetizan, los exportan al exterior y tienden a agregarse, pudiendo actuar en la formación de biofilms. En *E. coli* se requieren dos operones para la biogénesis del "curli". El operón *cgsDEFG* y el operón *csgBA*. En *Salmonella* se han descrito también dos operones similares a los de *E. coli* (Romling y col., 1998; Collinson y col., 1996). Dos de los componentes del "curli" las proteínas CsgA y CsgB presentan una alta similitud entre ellas y ambas contienen un péptido señal que es reconocido por el sistema Sec. La proteína CsgC es una lipoproteína y también contiene un péptido señal que se pierde al atravesar la membrana interna. La proteína CsgG se localiza en el periplasma unida a la membrana externa y es necesaria para transportar las proteínas CsgA y CsgB. No se sabe con exactitud si esta proteína CsgG actúa como canal a través de la membrana o bien como chaperona previniendo la

proteolisis de las subunidades en el periplasma. La función de las proteínas CsgE y CsgF parece ser la de actuar como chaperonas. La proteína CsgB es requerida bien para la polimerización de la proteínas CsgA en el exterior o bien puede servir como base para que se forme el "curli" (Bian y Normark, 1997).

I.4.2.1. Sistema de secreción de tipo II

El mecanismo de secreción de tipo II está ampliamente distribuido en proteobacterias, en las cuales es el principal responsable de la secreción de toxinas y enzimas hidrolíticas generalmente implicadas en patogénesis de plantas y animales.

El aparato de secreción de tipo II está compuesto por 12-16 genes diferentes (dependiendo de las especies) que forman un complejo multiproteico localizado en el espacio periplásmico y que es esencial para la translocación a través de la membrana externa. Este sistema de secreción tiene muchos aspectos en común con la secreción de tipo IV, entre ellos la implicación de una estructura parecida al pili que se forma en la secreción de tipo IV.

Como ya se ha mencionado, el GSP es un mecanismo de secreción que tiene lugar en dos pasos consecutivos, diferenciados tanto genética como bioquímicamente. Las proteínas que se secretan por este mecanismo son sintetizadas en el citoplasma como preproteínas que poseen un péptido señal en su extremo N-terminal. Esto permite la translocación a través de la membrana citoplasmática gracias al complejo Sec. En este primer paso se pierde el péptido señal y la proteína todavía en forma de pre-proteína pasa al espacio periplásmico. En este compartimiento la proteína puede sufrir sucesivas modificaciones como la formación de puentes disulfuro o el ensamblaje de subunidades (participan las proteínas chaperonas DsbA y DsbD) antes de ser translocada a través de la membrana externa mediada por el sistema de secreción de tipo II. Es importante resaltar que el intermediario periplásmico puede existir sólo un corto período de tiempo, o incluso no existir, ya que ambos pasos están estrechamente interconectados (Filloux, 2004). Para la translocación a través de la membrana externa la proteína requiere la maquinaria de secreción de tipo II (Figura 13) (Sandkvist, 2001a).

Por otro lado, se ha descrito recientemente que la maquinaria de secreción de tipo II también puede reconocer sustratos que han atravesado la membrana citoplasmática por otro mecanismo distinto al Sec, mediado por el sistema Tat (Voulhoux y col., 2001). Este sistema transloca proteínas a través de la membrana citoplasmática y reconoce proteínas que poseen un péptido señal característico (Palmer y Berks, 2003).

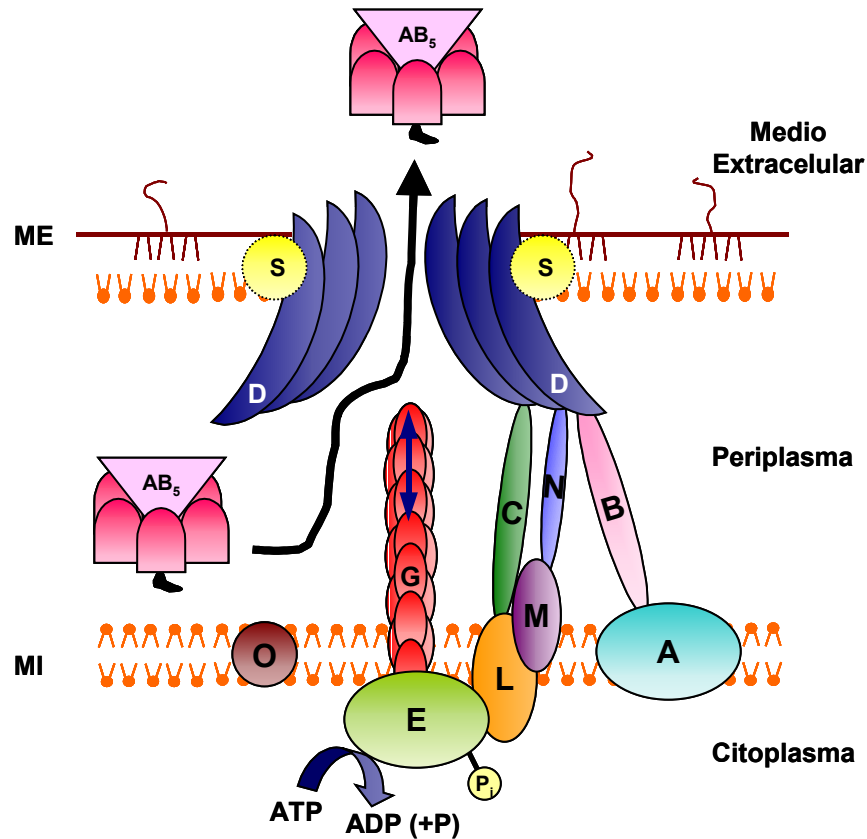


Figura 13. Esquema del sistema de secreción de tipo II. La función concreta de cada una de las proteínas se detalla en el texto (Sandkvist, 2001)

D'Enfert y colaboradores (1987) fueron los primeros en describir el sistema de secreción de tipo II en *Klebsiella oxytoca* y la identificación de este mismo sistema en *Pseudomonas aeruginosa*, demostró que se encuentra bastante conservado entre las bacterias Gram-negativas (Filloux y col., 1990; Hales y Shuman, 1999). Parece ser importante como factor de virulencia y ha sido identificado en bacterias patógenas como *Legionella pneumophila* o *Yersinia enterocolitica* (Hales y Shuman, 1999; Iwobi y col., 2003).

Respecto a la nomenclatura, los genes homólogos se han designado con las letras A-O y S, con algunas excepciones, como por ejemplo en *Pseudomonas*, donde se han usado las letras P-Z y A, aunque para simplificar la nomenclatura se les ha añadido un subíndice alusivo a la nomenclatura primitiva: P_{C-Z_M} y A_O (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución y localización celular de las proteínas que forman parte del sistema de secreción de tipo II (Sandkvist, 2001)

Especie ^a	Proteínas involucradas en la secreción de tipo II y su localización celular																
<i>Vibrio cholerae eps</i>		A ^b	B ^b	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	VcpD _o ^c	
<i>Aeromonas hydrophila exe</i>		A ^b	B ^b	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	TapD _o ^c	
<i>Escherichia coli gsp</i>		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O	
<i>Klebsiella oxytoca pul</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
<i>Erwinia chrysanthemi out</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O	
<i>Erwinia carotovora out</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
<i>Pseudomonas aeruginosa xcp</i>				P _c	Q _b	R _e	S _f	T _g	U _h	V _i	W _j	X _k	Y _l	Z _m	N	A _o /PilD _o ^c	
<i>Xanthomonas campestris xps</i>					D ^d	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	PilD _o ^c	
Localización^e	ME	MC	MC	MC/ME	ME	C ^f	MC	MC/ME ^g	MC/ME	MC/ME	MC/ME	MC/ME	MC/ME	MC	MC	MC	MC

^aEspecies bacterianas y nombres de los genes que participan en la secreción de tipo II

^bLos genes de secreción A y B de *V. cholerae* y *A. hydrophila* están adyacentes en el cromosoma, pero separados del resto de los genes.

^cEstos genes no están unidos a los genes de secreción de tipo II y también se requieren para la formación del pili en la secreción de tipo IV

^dEl gen *XpsD* está localizado corriente abajo del gen *XpsN* en *X. campestris*

^eMembrana citoplasmática (MC); membrana externa (ME); citoplasma (C)

^fLa proteína E está asociada a la membrana citoplasmática pero está localizada en el citoplasma

^gLas proteínas G, H, I, J y K están asociadas a ambas membranas

La **proteína D** es una de las proteínas más importante en este tipo de secreción, se trata de un oligómero de unas 12-15 subunidades. Es la encargada de formar el poro en la membrana externa (Kazmierczak y col., 1994; Hardie y col., 1996a; Lindeberg y col., 1996; Linderoth y col., 1997; Bitter y col., 1998; Bitter, 2003). Pertenece a una gran familia de proteínas homólogas llamadas secretinas. Esta familia también incluye componentes que son requeridos en la secreción de tipo IV en el proceso de formación del pili y en la secreción de tipo III (Genin y Boucher, 1994). A diferencia de las secretinas propiamente dichas, las cuales son muy inespecíficas respecto a su sustrato, la proteína D sólo reconoce a su sustrato específico y no permite el paso a través de la membrana externa

de otras proteínas periplásmicas o citoplasmáticas. Esta diferencia entre las proteínas D y las secretinas se extiende a su estructura primaria, ya que las proteínas D no poseen un residuo de Phe conservado en el extremo C-terminal, muy característico de las proteínas que se insertan en la membrana externa (Struyve y col., 1991). Este residuo de Phe es esencial para que las secretinas se inserten en la membrana y se ensamblen. La ausencia de este residuo de Phe en las proteínas D muestra que estas se deben de unir a la membrana siguiendo otro mecanismo distinto. Así, parece ser que para insertarse en la membrana las proteínas D requieren otro componente del sistema de secreción de tipo II, la proteína S. Esta proteína S es la única junto a la proteína D que está asociada a la membrana externa (Hardie y col., 1996a). El dominio C-terminal está conservado en la mayoría de las secretinas (a excepción del residuo de Phe) y es a través de él como se inserta en la membrana externa, mientras que el dominio N-terminal es variable y está expuesto al periplasma donde interacciona con otros componentes del aparato de secreción. Las subunidades que conforman la proteína D son muy estables, requiriéndose detergentes, calor y en algunos casos hasta la adición de fenol para su disociación (Hardie y col., 1996a; Linderoth y col., 1996; Shevchik y col., 1997; Koebnik y col., 2000). Análisis de microscopía electrónica de proteínas D purificadas, concretamente las proteínas PulD (*K. oxytoca*) y XcpQ_D (*P. aeruginosa*) muestran una estructura anular de 76 y 95 Å de diámetro, respectivamente y también revelan una densa carga de electrones en su interior. Este tamaño de poro es lo suficientemente grande para exportar proteínas plegadas al exterior (Linderoth y col., 1997; Bitter y col., 1998; Brok y col., 1999). Un ejemplo lo constituye la elastasa producida por *P. aeruginosa* que presenta un tamaño de 60 Å cuando está en su conformación madura (Thayer y col., 1991). La presencia de un poro tan grande en la membrana externa puede causar la muerte bacteriana por lo que su apertura debe de estar específicamente controlada. Una posibilidad es que el extremo N-terminal de la proteína D se doble hacia el poro formado en la membrana externa por el extremo C-terminal (Nouwen y col., 2000) y/o la interacción con otras proteínas sea la que controle la apertura del canal. Otro mecanismo conocido de apertura de canales es el que realizan los sideróforos, la vitamina B₁₂ y los receptores de colicina. Estos mecanismos involucran unos cambios de conformación en el receptor y la energía es proporcionada por la fuerza protomotriz.

Diversos estudios parecen indicar que la energía requerida para la translocación a través de la membrana externa en el sistema de secreción de tipo II es proporcionada por la fuerza protomotriz (Possot y col., 1997; Letellier y col., 1997), aunque también se ha descrito un sistema en el que está involucrada una proteína de la membrana citoplasmática, denominada TonB. Esta proteína TonB tiene un gran dominio periplásmico y cuando está activado interacciona con su receptor en la membrana externa. A su vez, algunas evidencias indican que las proteínas de la membrana citoplasmática pueden ejercer una función similar a TonB; las proteínas C, N o B son las principales candidatas (Filloux, 2004).

Parece que es la interacción entre el dominio N-terminal de la proteína D con otros componentes del aparato de secreción lo que induce el cambio de conformación en el extremo C-terminal y esto conlleva a la apertura del poro. Mediante comparaciones de secuencias se ha demostrado que la región C-terminal de las proteínas D está muy conservada, si bien no ocurre lo mismo con la región N-terminal (Genin y Boucher, 1994), en la cual se localiza también el péptido señal. La región conservada del extremo C-terminal abarca unos 200-300 residuos, de los cuales unos 60 son glicinas y prolinas que se ha demostrado que participan en la funcionalidad de la proteína (Russel, 1994). Se han descrito cuatro regiones muy conservadas, la más importante presenta el motivo (V/I)PXL(S/G)XIPXXGLF (Genin y Boucher, 1994). El extremo C-terminal de las secretinas es resistente a la hidrólisis por proteasas (Brok y col., 1999; Nouwen y col., 2000).

La **proteína S** es una pequeña lipoproteína localizada en la membrana externa que estabiliza y protege de la proteólisis a la proteína D. También se ha descrito que en algunas especies esta proteína promueve el ensamblaje de la proteína D a la membrana externa (Hardie y col., 1996a; 1996b; Shevchik y col., 1997; Shevchik y Condemine, 1998). La proteína S se une a los 65 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína D (Daefler y col., 1997). El requerimiento de esta proteína sólo se ha descrito para los sistemas de secreción Pul y Out de *Klebsiella* y *Erwinia*, aunque se han encontrado marcos abiertos de lectura (ORFs) de posibles proteínas S en el plásmido PO157 de *E. coli* O157:H7 y *Yersinia pestis* (Schmidt y col., 1997; Sandkvist, 2001a).

La **proteína B**, aunque sólo ha sido identificada en alguno de los sistemas de secreción de tipo II descritos, es otro de los componentes del sistema que interacciona con la proteína D. Algunos estudios demuestran que OutB y OutD (*Erwinia carotovora*) se estabilizan mutuamente y un defecto en la secreción observada en mutantes defectivos en OutB puede ser complementada con una superproducción de OutD (Condemine y Shevchik, 2000). Otro estudio describe que ExeB (*Aeromonas hydrophila*) parece ser un regulador de la secreción suministrando energía para que se produzca la apertura del poro en *A. hydrophila* (Howard y col., 1996). Además la **proteína A** de *A. hydrophila*, denominada ExeA, que es una proteína asociada a la membrana interna, forma un complejo estable con ExeB, presentando un motivo de unión a ATP (Schoenhofen y col., 1998). Asimismo, la proteína B presenta una estructura similar a la proteína TonB. Las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas afectan a la secreción en *A. hydrophila*. Se ha sugerido que es éste complejo el que transmite energía procedente de la hidrólisis de ATP; si esto fuera así, tendría un papel crucial en este tipo de secreción, pero hay sistemas en los que no están presentes estas proteínas y por lo tanto la función de proporcionar energía para la translocación sería llevada a cabo por otras proteínas. En *A. hydrophila* para la secreción de proteínas al periplasma se requiere ATP y también la energía proporcionada por la fuerza protomotriz (Letellier y col., 1997), mientras que *K. oxytoca* sólo requiere la energía

de la fuerza protomotriz (Possot y col., 1997), lo cual explicaría el papel de las proteínas A y B en *A. hydrophila*.

Otra proteína que parece interactuar con la proteína D, a través de su extremo C-terminal, es la **proteína N**, aunque tampoco se ha descrito en todos los sistemas de secreción de tipo II. La interacción entre estas proteínas se ha demostrado mediante estudios de inmunoprecipitación realizados en *Xanthomonas campestris* donde se ha precipitado la proteína XpsD con anti-XpsN y viceversa, la proteína XpsN se ha precipitado con anticuerpos anti-XpsD (Lee y col., 2000).

La **proteína C** también parece interactuar con la proteína D aunque la función concreta no es conocida. Su topología es similar a la proteína TonB, así, se ha postulado que pueda estar implicada en procesos de generación de energía (Blevess y col., 1996). La proteína C parece interactuar a su vez con las **proteínas L y M** que son proteínas integrales de la membrana citoplasmática. Esta hipótesis está basada en estudios realizados por Possot y colaboradores (2000) que observaron un descenso en la detección de Pull cuando se inactivaba PulC en *Klebsiella oxytoca*. Las proteínas M y L forman un complejo que se estabiliza mutuamente y se ha inmunoprecipitado en *V. cholerae* (Michel y col., 1998; Sandkvist y col., 1999; 2000). Recientemente, se ha propuesto que en *X. campestris*, la proteína N participa en la formación del complejo entre las proteínas L y M (Lee y col., 2001; Tsai y col., 2002). La proteína L está unida a su vez a la **proteína E**. Dicha proteína E interactúa con la membrana citoplasmática y es altamente dependiente de la proteína L (Sandkvist y col., 1995; Ball y col., 1999; Py y col., 1999; Possot y col., 2000). Normalmente esta proteína permanece en el citoplasma asociada a la membrana citoplasmática y en ausencia de la proteína L es sensible a la proteólisis. Se ha descrito que la proteína E se trata de una quinasa que regula el proceso de secreción y controla el poro mediado por las proteínas L y M (Sandkvist y col., 1995). Alternativamente se ha postulado que la proteína E tendría una función ATPasa encargada de proporcionar energía para que se abra el poro de secreción o bien para que se ensamble toda la maquinaria. Una última hipótesis es que la proteína E proporciona la energía necesaria para el ensamblaje de la maquinaria de secreción después de ser metilada por la proteína O (Kagami y col., 1998); en resumen, no está clara la función de esta proteína en el proceso de secreción de tipo II.

No se ha descrito ninguna interacción de la proteína D con la **proteína F**. Estudios de OutF de *E. carotovora* revelan que se trata de una proteína integral de la membrana citoplasmática formada por tres dominios transmembrana (Thomas y col., 1997; Delepelaire y Wadersman, 1991).

Las **proteínas G, H, I, J y K** poseen un extremo N-terminal muy parecido al de las subunidades que conforman el pili del sistema de secreción de tipo IV; por ello se les conoce como pseudopilinas; estas proteínas son producidas como precursores que sufren

modificaciones en su extremo N-terminal, para posteriormente ser metiladas por la **proteína O** (Nunn y Lory, 1993; Pugsley y Dupuy, 1992).

Una de las grandes incógnitas que quedan por resolver en el sistema de secreción de tipo II es el mecanismo específico de reconocimiento del sustrato que se va a exportar al exterior. En la actualidad se están realizando estudios encaminados a dilucidar los mecanismos que determinan la apertura específica de la proteína D sólo cuando reconoce determinados sustratos y que no permite que otras proteínas periplásmicas o citoplasmáticas salgan al exterior (Pugsley y col., 1997). Parece ser que la proteína S, puede actuar también en este reconocimiento específico del sustrato (Hardie y col., 1996a).

La mayoría de los genes que codifican estas proteínas están muy conservados entre las distintas especies bacterianas y se transcriben en un sólo operón, aunque existen algunas excepciones (Sandkvist 2001a; 2001b; Thanassi, 2002). En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes* los genes que codifican las proteínas C y D están localizados en un operón diferente (de Groot y col., 2001). Las mutaciones en alguno de estos genes producen como resultado una inhibición de la secreción, acumulándose la proteína en el periplasma (Filloux, 2004) (Figura 14).

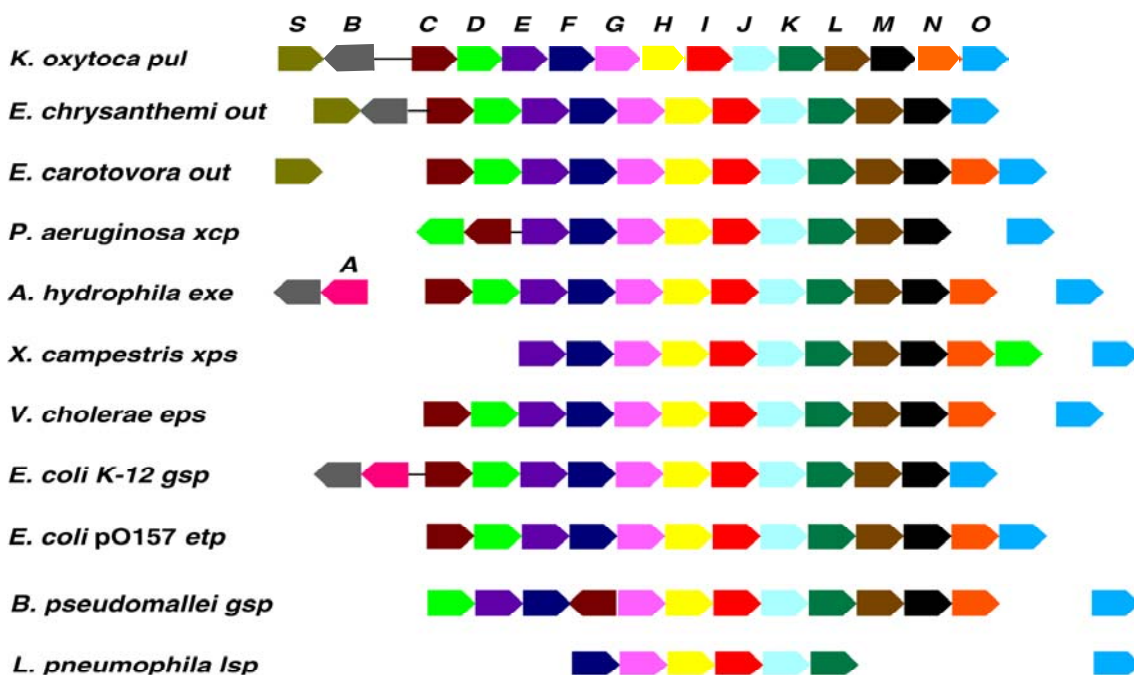


Figura 14. Organización de los genes involucrados en el sistema de secreción de tipo II en diversas especies bacterianas Gram-negativas (Pugsley y col., 1997)

I.4.2.1.1. Maquinaria Sec

Todas las proteínas que se secretan mediante el sistema Sec son sintetizadas en el citoplasma como pre-proteínas con un péptido señal en su extremo N-terminal. Este péptido señal tiene una longitud de unos 24 aminoácidos y comprende tres regiones bien definidas: una región N-terminal cargada positivamente (región n), otra región hidrofóbica constituida por una hélice α (región h) y un dominio C-terminal que reconoce la peptidasa señal (Cristóbal y col., 1999).

Este péptido señal es reconocido por la maquinaria Sec (Pugsley, 1993; Economou, 2002; Kim y Kendall, 2000; van Wely y col., 2001; Mori e Ito, 2001; de Keyzer y col., 2003). El complejo Sec está formado por la proteína SecA con actividad ATPasa, la proteína SecB, una chaperona citoplasmática y un complejo proteico integral de la membrana citoplasmática formado por al menos varias subunidades proteicas distintas (SecD, SecE, SecF, SecG y SecY). Las proteínas Y, E y G forman un complejo denominado Sec YEG esencial para el proceso de translocación (Economou, 1999; Kerr y Matthews, 2000). SecD y SecF son subunidades de la translocasa no esenciales que podrían actuar como proteínas auxiliares (Eichler, 2003). SecB reconoce la proteína y la mantiene en una conformación no plegada; y la dirige al complejo SecYEG (Driessen, 2001). La proteína SecA se une al complejo SecYEG para formar la translocasa funcional y a su vez una peptidasa señal reconoce e hidroliza el péptido señal y transfiere el resto de la proteína hacia el periplasma. Una vez en el periplasma con la ayuda de varias chaperonas, entre ellas destacamos la proteína DsbA (una disulfito isomerasa) la proteína adquiere su conformación madura (Thanassi, 2002) (Figura 15).

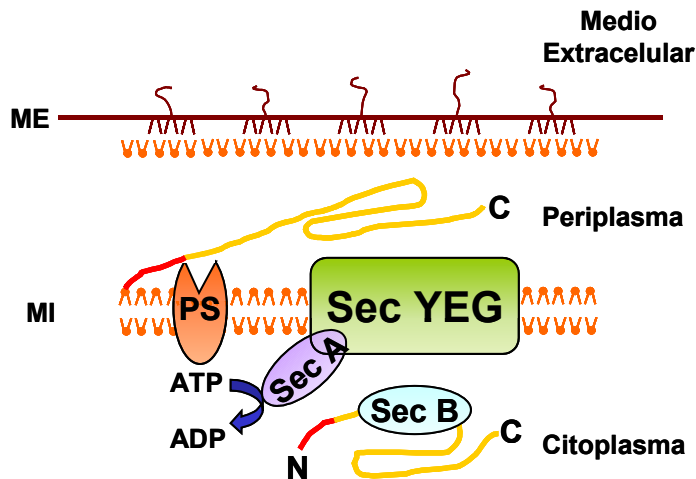


Figura 15. Maquinaria Sec. ME, membrana externa; MI, membrana interna; PS, peptidasa señal. La función concreta de cada proteína se explica detalladamente en el texto

I.4.2.1.2. Maquinaria Tat

El sistema Tat (twin arginine translocation) de transporte de proteínas está localizado en la membrana citoplasmática. Mientras que el sistema Sec sólo es capaz de transportar proteínas en una conformación no plegada, este sistema Tat es capaz de translocar a través de la membrana interna proteínas ya plegadas de diferentes tamaños (Sargel y col., 1998; Berks y col., 2000a; Palmer y Berks, 2003).

En la mayoría de los casos las proteínas que utilizan el sistema Tat son proteínas que necesitan cofactores, aunque también se han descrito casos de proteínas que no los necesitan y son transportadas por este mecanismo (Brüser y col., 1998). Suelen ser proteínas que están implicadas en cadenas de transporte de electrones de tipo respiratorio y fotosintético (Voulhoux y col., 2001); otras proteínas están involucradas en la adaptación de las bacterias a determinados hábitats inhóspitos (Wu y col., 2000). También se ha descrito en *E. coli* como el sistema responsable de exportar la proteína informadora GFP (green fluorescent protein) que no es exportada por el sistema Sec, debido a que la proteína adquiere su conformación madura de manera muy rápida (Santini y col., 2001).

El péptido señal de estas proteínas, al igual que el del sistema Sec, también está compuesto por las tres regiones características, aunque con algunas diferencias. La más notable es que posee una región muy conservada que presenta el motivo (S/T)RRXFLK en el límite de las regiones n y h. En este motivo, las dos argininas (RR) consecutivas son invariables y el resto de los componentes aparece con una frecuencia mayor al 50% en proteínas que utilizan esta maquinaria de secreción (Berks, 1996). Estas dos unidades de arginina consecutivas son esenciales para que las proteínas sean secretadas por el sistema Tat. Rose y colaboradores (2002) han construido un mutante incapaz de secretar la α -amilasa extracelular de *Natronococcus* sp. cepa Ah36 (Kobayashi y col., 1994) por sustitución de los dos residuos de arginina (RR) por dos residuos de lisina (KK). La región c del sistema Tat es muy rica en aminoácidos básicos (Cristóbal, 1999). Este péptido señal es notablemente mayor (alrededor de 14 aminoácidos) que el péptido señal que reconoce la maquinaria Sec (Cristóbal, 1999), asimismo la región h es menos hidrofóbica debido a que posee más residuos de glicinas y treoninas y menos residuos de leucinas.

Estudios en *E. coli* han identificado los genes involucrados en el sistema Tat (Bogsch y col., 1998; Weiner y col., 1998). Los genes *tatA*, *tatB* y *tatC* forman un operón (*Tat ABCD*), mientras que el gen *tatE* se transcribe independientemente (Weiner y col., 1998).

El proceso detallado de actuación de este mecanismo es todavía incierto (Figura 16). Parece ser que inicialmente el péptido señal es reconocido por el sistema Tat mediante el complejo TatBC (Berks y col., 2000a; 2000b; Cline y Mori, 2001). Una vez unida la

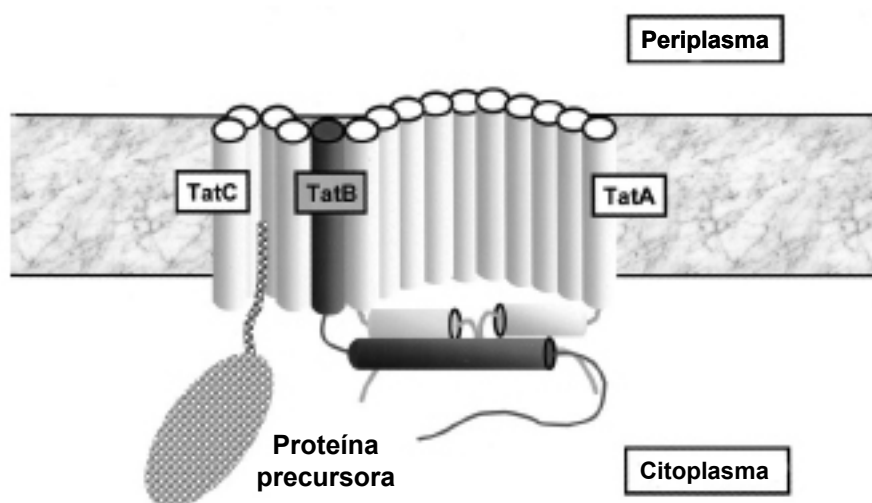


Figura 16. Modelo de la organización estructural del sistema Tat. La función de cada proteína se explica en el texto (Berks y col., 2000b)

proteína, atraviesa la membrana mediada por la proteína A que es capaz de formar un poro de un diámetro de hasta 70 Å (Sargent y col., 2002). La energía necesaria para este mecanismo es proporcionada exclusivamente por la fuerza protomotriz (Alami y col., 2002).

Hasta hace poco tiempo se pensaba que el mecanismo de secreción de tipo II sólo reconocía y translocaba sustratos a través de la membrana externa que habían llegado hasta el periplasma vía maquinaria Sec. En la actualidad se sabe que el sistema de secreción de tipo II es capaz también de reconocer y translocar proteínas que han utilizado el sistema Tat para atravesar la membrana interna (Voulhoux y col., 2001). Esto provoca una controversia en la nomenclatura ya que hay autores que denominan específicamente sistema GSP al sistema que implica la utilización del Sec y otros que opinan que se debe incluir en este término también los que utilizan la maquinaria Tat. En la Figura 17 se muestra un ejemplo de dos proteínas, la exoproteína ETA y la fosfolipasa Plc's producidas por *Pseudomonas aeruginosa* que atraviesan la membrana interna por los mecanismos Sec y Tat, respectivamente y que posteriormente, ambas son reconocidas por el sistema de secreción de tipo II.

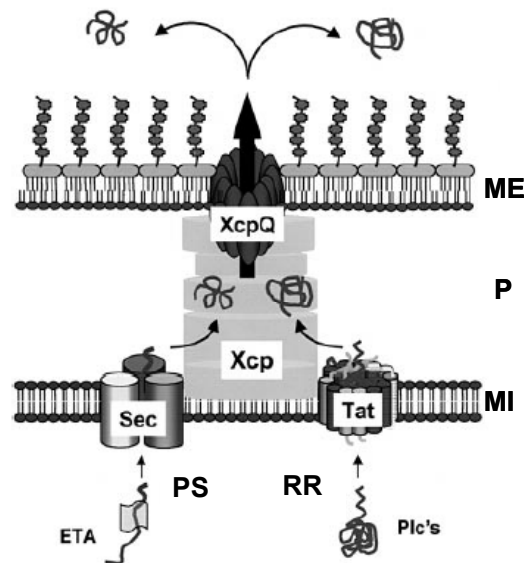


Figura 17. Convergencia en el sistema de secreción de tipo II de proteínas secretadas por los sistemas Sec y Tat. La exoproteína A (ETA) y la fosfolipasa C (Plc's) son transportadas a través de la membrana interna mediante los sistemas Sec y Tat, respectivamente. Una vez en el citoplasma, ambas proteínas son reconocidas por la maquinaria Xcp de *Pseudomonas aeruginosa* (Voulhoux y col., 2001). ME, membrana externa; MI, membrana interna; P, periplasma; PS, péptido señal; RR, dos unidades de arginina

I.4.3. Sistema de secreción de tipo III

El sistema de secreción de tipo III, también denominado sistema TTSS (Type Three Secretion System) lo utilizan fundamentalmente bacterias Gram-negativas patógenas de animales como *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* enteropatógena y enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella* spp., *Chlamydia* spp. y patógenos de plantas entre los que destacamos *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* y *Ralstonia solanacearum* (Ghosh, 2004; Espinosa y Alfaro, 2004). En alguna de ellas como *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Yersinia pestis* y *Y. enterocolitica* se han descrito más de uno de estos sistemas TTSS (Shea y col., 1996; Haller y col., 2000; Foulter y col., 2003).

Mediante el sistema TTSS se exportan proteínas que carecen de péptido señal y que requieren chaperonas específicas para su secreción (Gophna y col., 2003). Este sistema de secreción TTSS conduce proteínas desde la bacteria donadora al interior del citosol de las células del organismo receptor. Esta translocación es originada por un mecanismo que se activa cuando la bacteria entra en contacto con la célula receptora y parece ser que depende de señales externas que provienen, generalmente, de estas células (Tampakaki y col., 2004; Rosqvist y col., 1994).

El sistema de secreción TTSS está compuesto por dos complejos muy bien definidos, una estructura llamada “aguja” o en patógenos de plantas, pili. Estas “agujas” o pili son estructuras rígidas y huecas y que son las encargadas de penetrar en el hospedador. En *Yersinia*, *Salmonella* o *Shigella* esta estructura es una pequeña proteína de 9 kDa, denominada YscF, PrgI ó MxiH, respectivamente. El diámetro exterior de estas estructuras oscila entre 60-130 Å, mientras que el interior es sólo de 20 Å (Blocker y col., 2001; Hoiczky y Blobel, 2001). Gracias a ella se produce la unión a la membrana de la célula receptora y la translocación de la proteína desde la célula donadora. En cepas patógenas de *E. coli* aparece además un filamento en la parte distal de la “aguja” formado por la proteína EspA. El segundo complejo está compuesto por una base cilíndrica similar a la parte basal del flagelo, la cual cruza las dos membranas bacterianas y estabiliza toda la estructura; son dos anillos concéntricos encajados el más grande en la membrana interna, y el más pequeño en la externa. Son varias las proteínas que forman parte de estos anillos (Tabla 10). Destacan también las proteínas integrales de membrana que forman parte de la membrana citoplasmática y asociadas a ellas se encuentran también ATPasas que son esenciales para el funcionamiento de esta maquinaria de secreción.

Tabla 10. Proteínas que forman parte del TTSS. Dichas proteínas se comparan con las proteínas flagelares descritas (Ghosh, 2004)

Estructura	Proteínas del sistema TTSS	Proteínas flagelares
Aguja	<i>Yersinia</i> YscF, <i>Shigella</i> MxiH, <i>Salmonella</i> PrgI, <i>E. coli</i> EscF	FliC
Determinantes del crecimiento de la aguja	<i>Yersinia</i> YscP, <i>Shigella</i> Spa32, <i>Salmonella</i> InvJ	FliK
Filamento	<i>E. coli</i> EspA	
Pili	<i>P. syringae</i> HrpA	
Proteínas integrales de la membrana citoplasmática	<i>Yersinia</i> YscV, <i>Salmonella</i> InvA, <i>E. coli</i> EscV, <i>P. syringae</i> HrcV	FliH
	<i>Yersinia</i> YscU, <i>Salmonella</i> SpaS, <i>E. coli</i> EscU, <i>P. syringae</i> HrcU	FliB
	<i>Yersinia</i> YscR, <i>Salmonella</i> SpaP, <i>E. coli</i> EscR, <i>P. syringae</i> HrcR	FliP
	<i>Yersinia</i> YscS, <i>Salmonella</i> SpaQ, <i>E. coli</i> EscS, <i>P. syringae</i> HrcS	FliQ
	<i>Yersinia</i> YscT, <i>Salmonella</i> SpaR, <i>E. coli</i> EscT, <i>P. syringae</i> HrcT	FliR
ATPasa	<i>Yersinia</i> YscN, <i>Salmonella</i> SpaC, <i>E. coli</i> EscN, <i>P. syringae</i> HrcN	FliI

está formado por 11 genes denominados *virB1-virB11* y codifican las llamadas proteínas de apareamiento Mpf (**M**ating **p**air **f**ormation), que conforman tanto la estructura requerida para la transferencia como el filamento extracelular denominado pilus T (esta estructura es la que entra en contacto con la célula receptora) (Lai y col., 2000). El operón *virD* está formado por cinco genes (*virD1-virD5*) (Figura 19). Las proteínas *virD1* y *virD2* están implicadas en el procesamiento del ADN en el citoplasma bacteriano y se les conoce como proteínas Dtr (**D**NA **t**ransfer and **r**eplication) (Pansegrau y Lanka, 1996). *VirD3* y *virD5* codifican proteínas que no son esenciales para el proceso de secreción y *virD4* codifica una proteína de acoplamiento (CP), que actúa junto a las proteínas Mpf para conducir los sustratos a través de las membranas celulares (Christie, 1997; Zhu y col., 2000; Hamilton y col., 2000). Las proteínas *VirB4* y *VirB11* (proteínas de membrana interna) y *VirD4* (proteína citoplasmática) poseen actividad ATPasa.

Como hemos indicado anteriormente mediante este sistema se secretan tanto ADN como proteínas; el ADN es procesado por las proteínas Dtr (*VirD1*, *VirD2* y *VirC1*), formando un complejo intermediario. Este complejo es reconocido por la proteína CP (*VirD4*) a través de su extremo C-terminal cargado positivamente y lo dirige hacia el complejo formado por las proteínas Mpf (*VirB*), que lo dirige al exterior. La translocación de proteínas tiene lugar de forma parecida en tres pasos consecutivos; primero tiene lugar el procesamiento de las proteínas en el citoplasma de la célula. Este proceso puede ser dependiente o no de chaperonas que ayudan a mantener la proteína sin agregarse; posteriormente, la proteína CP (*VirD4*) se une al sustrato gracias a las cargas positivas de su extremo carboxi terminal y tiene lugar la translocación a través del canal formado por las proteínas Mpf (*VirB*). Sin embargo, la translocación de las toxinas producidas por *B. pertussis* ocurre en dos pasos, la toxina atraviesa primero la membrana interna mediada por el complejo Sec y después atraviesa la membrana externa con ayuda de la proteína CP y del canal formado por las proteínas Mpf (Burns, 1999; 2003).

I.4.5. Sistema de secreción de tipo V

Las proteínas que utilizan este tipo de secreción de tipo V son translocadas a través de la membrana externa gracias a un poro transmembrana que forma la misma proteína. Poseen estructuras primarias parecidas y contienen la información necesaria para su translocación. Dentro de este mecanismo se incluyen tres grupos: (i) sistema de autotransporte o Tipo V_a ; (ii) tipo V_b y (iii) tipo V_c (Henderson y col., 2004; Desvaux y col., 2004) (Figura 20).

El paso a través de la membrana citoplasmática tiene lugar mediante el sistema Sec. Este sistema utiliza la proteína SecB como chaperona, que reconoce al péptido señal de la proteína que va a translocar. Se ha descrito la posibilidad de que las proteínas que utilizan el sistema de secreción de tipo V utilicen otro mecanismo de reconocimiento del sistema Sec, denominado sistema SRP (Signal recognition particle) (de Gier y col., 1997). Se ha descrito que las proteínas que se secretan mediante el sistema de secreción de tipo V

presentan un péptido señal más largo (de hasta 50 aminoácidos) que los típicos que son reconocidos por la maquinaria Sec (Henderson y col., 1998; 2004). Estos péptidos señal atípicos presentan una extensión N-terminal adicional a las tres regiones típicas del péptido señal (regiones n, h y c). Estudios de genomas completos de bacterias han determinado al menos 80 proteínas que presentan esta extensión. Parece interesante resaltar que todas estas proteínas presentan un tamaño superior a 100 kDa. Esta región adicional presenta dos zonas claramente diferenciadas, una región denominada n2 muy conservada y rica en aminoácidos aromáticos y otra región h2 rica en residuos de glutámico. Se ha propuesto que esta región adicional puede servir, como señal para el sistema SRP. Parece que es la región hidrofóbica la que es reconocida por este sistema. Análisis de la estructura cristalográfica de la proteína SRP muestra una zona que podría unirse a este dominio hidrofóbico (Batey y col., 2000). Se ha descrito que la serina proteasa Hbp de *E. coli* se secreta mediante el mecanismo V_b de secreción y para atravesar la membrana interna utiliza el sistema SRP. Este sistema consta de un receptor específico, la proteína FtsY, que tiene gran afinidad por residuos hidrofóbicos. Este constituye el primer ejemplo de la utilización del sistema SRP para excretar proteínas extracelulares ya que hasta la fecha sólo se había descrito este sistema para las proteínas integrales de la membrana interna en procariotas (Sijbrandi y col., 2003). Debemos indicar que no hay nada claro al respecto. Recientemente Szabady y colaboradores (2005) han demostrado mediante delección de esta región adicional del péptido señal en la proteína EspP de *E. coli* O157:H7, que esta proteína atraviesa la membrana interna mediante el sistema Sec (aunque más lentamente) pero que no es capaz de plegarse correctamente en el periplasma y atravesar la membrana externa, acumulándose en el periplasma.

Jose y colaboradores (1995) han descrito la presencia de cuatro dominios característicos denominados péptido señal, dominio α , región de unión y dominio β en la estructura primaria de una proteína que se secreta por el sistema de tipo V.

Sistema de autotransporte o tipo V_a

El péptido señal se encuentra en el extremo N-terminal y permite dirigir la proteína hacia la membrana interna para su posterior transporte al periplasma (Henderson y col., 1998). El siguiente dominio se conoce como dominio α y es el que confiere la función de la proteína. El último dominio está localizado en el extremo C-terminal y es conocido como dominio autotransportador o dominio β , ya que adopta una estructura terciaria en forma de barriles β formando un poro que facilita el paso de la proteína a través de la membrana externa al exterior (Maurer y col., 1999). Este dominio está muy conservado en todas las proteínas que se secretan por este mecanismo.

El paso a través de la membrana interna ocurre gracias a la participación del sistema Sec. El péptido señal es reconocido por el sistema Sec y favorece el tránsito hacia el espacio periplásmico. Es la proteína Sec B la que actúa como chaperona en este proceso (Brandon y col., 2003). Una vez atravesada la membrana interna la proteína existe en el periplasma

como un intermediario. No está claro si es aquí donde el dominio α se pliega y adquiere su estructura terciaria o es una vez que ha alcanzado la superficie de la bacteria cuando adquiere su conformación funcional (Oliver y col., 2003). Algunos estudios revelan que el plegamiento de la proteína tiene lugar en el periplasma antes o al menos simultáneamente al paso de la misma a través de la membrana externa (Veiga y col., 1999), pero parece a su vez poco probable que una proteína de gran tamaño pueda salir al exterior por un poro de 2 nm ya plegada. Otro punto de controversia es cómo estas proteínas pueden permanecer desplegadas o parcialmente plegadas y resistir a la hidrólisis de las proteasas del periplasma; tampoco está claro cómo influyen las proteínas formadoras de puentes disulfuros (DsbA) en este tipo de secreción (Brandon y Goldberg, 2001) ni de dónde obtienen la energía para ser autotransportadas ya que en el periplasma no ocurren reacciones de hidrólisis de ATP o ADP.

Todas las proteínas que se han descrito que utilizan este mecanismo de secreción están implicadas en virulencia. Se han caracterizado hidrolasas (proteasas, lipasas y esterases), adhesinas, toxinas e inmunotoxinas (Coutte y col., 2001). Este tipo de transporte está presente solamente en el dominio Bacteria, concretamente se ha descrito en proteobacterias y también en la familia *Chlamydiae*, en los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila* (Henderson y Lam, 2001).

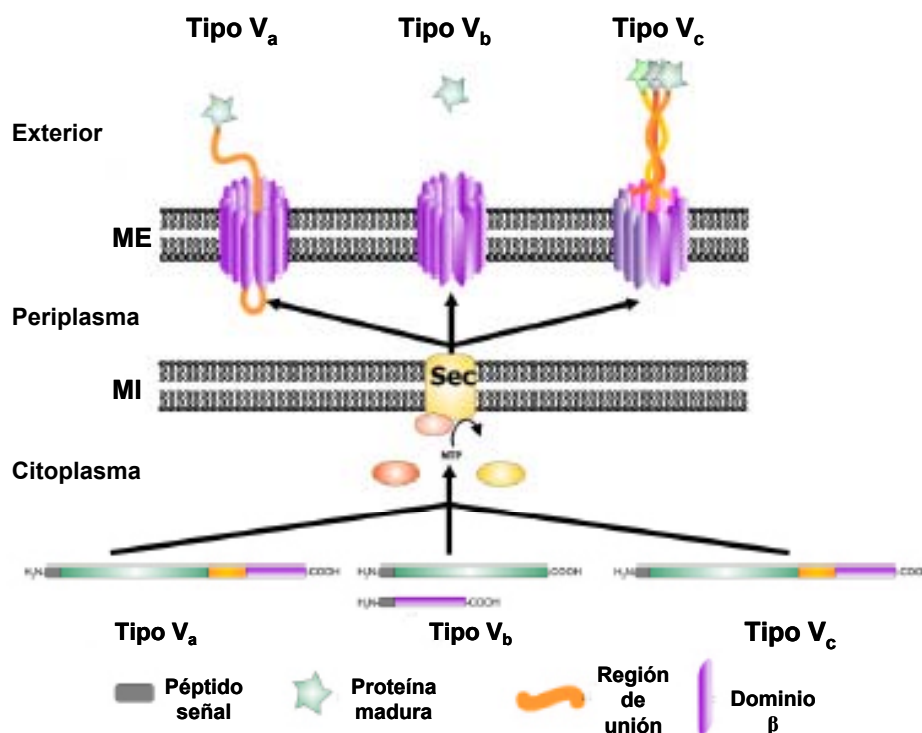


Figura 20. Esquema del sistema de secreción de tipo V. A la izquierda se representa el sistema de secreción tipo V_a, en el centro el tipo V_b y a la derecha el tipo V_c (Henderson y col., 2004)

Sistema tipo V_b

Las proteínas que utilizan la secreción de tipo V_b (también denominada Two-Partner Secretion pathway, TPS) al igual que las que utilizan el tipo V_a poseen un péptido señal que dirige la translocación de la proteína a través de la membrana citoplasmática (Henderson y col., 2000). Llegado al periplasma (gracias al sistema Sec) el dominio α se inserta en el poro formado por el dominio β en la membrana externa y una vez en la superficie de la bacteria la proteína es modificada proteolíticamente hasta alcanzar su conformación activa (Jacob-Dubuisson y col., 2001), pero a diferencia del tipo V_a en el cual la proteína es sintetizada como una única cadena polipeptídica, el dominio α también llamado exoproteína y el dominio β (dominio transportador) son traducidos como dos proteínas diferentes, que han sido denominadas familias TpsA y TpsB, respectivamente (Jacob-Dubuisson y col., 2001).

La topología del poro formado por el dominio β también es diferente a la del autotransporte y además la proteína TpsB parece estar involucrada en la maduración del dominio α . Se ha sugerido que la proteína permanece sin plegarse en el periplasma y el plegamiento se produce cuando es exportada al exterior con la ayuda del dominio transportador (Guedin y col., 1998). Los genes que codifican ambas proteínas forman, generalmente, parte de un operón (Jacob-Dubuisson y col., 2001). Una región conservada de la proteína TpsA, denominada dominio TSP, es la que interactúa específicamente con la proteína TpsB para iniciar la translocación a través de la membrana externa (Grass y St Geme, 2000). Al igual que el tipo V_a este tipo de secreción secreta proteínas de gran tamaño, generalmente mayores de 100 kDa (Jacob-Dubuisson y col., 2001).

Sistema de tipo V_c

Recientemente, los miembros de la familia Oca (Oligomeric coiled-coil adhesins) han sido descritos como integrantes del sistema de secreción de tipo V_c. El ejemplo característico de este tipo de secreción lo constituye la adhesina YadA producida por *Yersinia pestis* (Nummelin y col., 2004). YadA posee seis dominios diferentes con un péptido señal en la región N-terminal. La región C-terminal es la encargada de formar el poro por el que se secretará la proteína al exterior (Hoiczky y col., 2000). La proteína atraviesa la membrana interna mediada por el complejo Sec; a continuación se produce una trimerización seguida de la formación del poro y de la translocación del trímero hacia el exterior. También se ha demostrado que la adhesina Hia producida por *Haemophilus influenzae* es una proteína trimérica secretada asimismo por este sistema (St Geme y Cutter, 2000).

En la Figura 21 se muestra un esquema que resume los tipos de secreción I, II, III y IV.

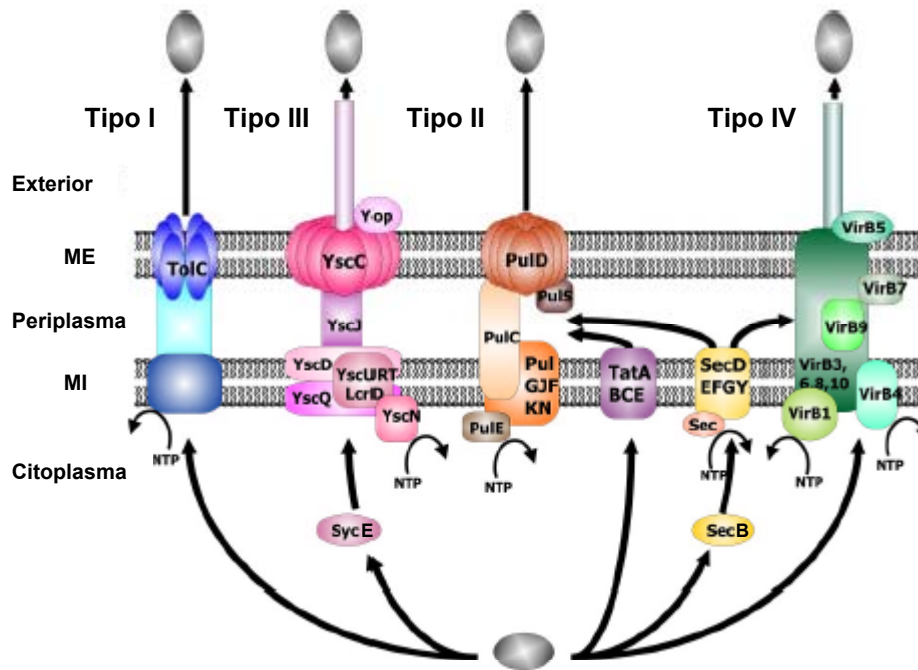


Figura 21. Esquema representando los sistemas de secreción de tipo I, II, III y IV. El tipo I de secreción está ejemplificado por la hemolisina A de *E. coli*; el tipo III de secreción está representado por la proteína Yop de *Yersinia pestis*; el tipo II está ejemplificado por la secreción de la pululanasa de *Klebsiella oxytoca* y el tipo IV está ejemplificado por el sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens*. También están representadas las chaperonas SycE y SecB (Henderson y col., 2004)

I.5. SECRECIÓN EN MICROORGANISMOS HALÓFILOS

Aunque algunas de las proteínas secretadas por las haloarqueas utilizan la maquinaria Sec, el mecanismo más utilizado por estos microorganismos para secretar proteínas al exterior es el sistema Tat (Rose y col., 2002; Ring y Eichler, 2004). El uso preferente de las haloarqueas del sistema Tat para secretar proteínas al exterior puede responder a una adaptación evolutiva. Para mantener el equilibrio osmótico con el exterior las haloarqueas acumulan en su interior altas concentraciones de iones K^+ (Madern y col., 2000); así, sus proteínas para prevenir agregaciones y ser estables en estas condiciones intracitoplasmáticas de elevada salinidad (Madern y col., 2000), sufren un plegamiento y adquieren rápidamente una conformación estructural determinada, principalmente exponiendo los residuos de aminoácidos ácidos hacia el exterior. Una vez plegadas, estas proteínas tienen que ser exportadas al exterior. El sistema Sec (ampliamente utilizado por otras arqueas) sólo puede transportar proteínas que no han adquirido ninguna conformación estructural (Driessen y col., 1998). Sin embargo el sistema Tat de secreción es

capaz de translocar a través de la membrana interna proteínas ya plegadas de diferentes tamaños (Palmer y Berks, 2003).

Rose y colaboradores (2002) comprobaron que el sistema Tat es el más extendido en la secreción de proteínas en haloarqueas. Mediante herramientas informáticas muy precisas identificaron en el genoma de *Halobacterium* sp. NRC-1 (Ng y col., 2000) 64 proteínas que son potencialmente secretadas por este sistema Tat. Se aplicó el mismo análisis informático al genoma de tres arqueas no halófilas *Archaeoglobus fulgidus*, *Sulfolobus solfataricus* y *Aeropyrum pernix*, encontrando sólo 8 proteínas en *A. fulgidus* y 10 en *S. solfataricus* y *A. pernix* susceptibles de ser secretadas por este mecanismo.

Hasta la fecha no hay descrito ningún trabajo acerca de los mecanismos de secreción que utilizan las bacterias halófilas moderadas para secretar sus proteínas extracelulares al medio.

II. OBJETIVOS

Durante las dos últimas décadas, nuestro equipo de investigación se ha centrado en el estudio de los microorganismos halófilos, tanto extremos como moderados. Las bacterias halófilas moderadas, que crecen óptimamente en medios que contienen un 3-15% de sal, han sido objeto de un gran número de estudios taxonómicos, fisiológicos y ecológicos (Kushner y Kamekura, 1988; Rodríguez-Valera, 1991; Vreeland y Hochstein, 1993; Ventosa y col., 1998c). Así, en nuestro laboratorio se han descrito un total de 20 especies y 5 géneros que incluyen bacterias halófilas moderadas (García y col., 1987; Ventosa y col., 1989a; 1989b; 1990; 1992; Márquez y col., 1990; Spring y col., 1996; Mellado y col., 1996; Garabito y col., 1997; Arahál y col., 1999; 2001b; 2002a; Mormile y col., 1999; Duckworth y col., 2000; Zhang y col., 2002a; 2002b; Martín y col., 2003; Kaye y col., 2004; García y col., 2004; 2005). Por otra parte, se han realizado importantes aportaciones en cuanto a sus relaciones taxonómicas y filogenéticas (Ventosa y col., 1982; 1992, 1993; Márquez y col., 1987; 1992; Mellado y col., 1995a; Mota y col., 1997; Arahál y col., 2000; 2001a; 2002).

Del mismo modo, nuestro grupo realizó los primeros estudios genéticos en bacterias halófilas moderadas, que nos han permitido obtener las herramientas necesarias para la manipulación genética de dichos microorganismos. Además, al ser capaces de crecer en un rango de concentraciones salinas muy amplio, son consideradas unos excelentes modelos biológicos para la elucidación de las bases moleculares de los procesos de osmorregulación en procariontes. La mayoría de las bacterias halófilas moderadas acumulan una variedad de compuestos orgánicos como solutos compatibles que presentan un gran número de aplicaciones en tecnología enzimática y en la industria farmacéutica y cosmética (Galinski, 1993; Ventosa y col., 1998c; Margensin y Schinner, 2001; Mellado y Ventosa, 2003). A este respecto, debemos destacar los estudios desarrollados en nuestro laboratorio sobre los mecanismos de osmoadaptación que presenta la bacteria halófila moderada *Chromohalobacter salexigens* (Cánovas y col., 1996; 1997a; 1997b; 1998; Calderón y col., 2004).

Por otro lado, en los últimos años las bacterias halófilas moderadas han adquirido una gran importancia desde un punto de vista biotecnológico (Ventosa y Nieto, 1995; Ventosa y col., 1998c; Mellado y Ventosa, 2003; Mellado y col., 2003). Así, muchas producen exoenzimas tales como amilasas, nucleasas y proteasas de enorme interés industrial (Kamekura, 1986; Ventosa y col., 2005). En la actualidad, son escasas las enzimas que se han aislado a partir de bacterias halófilas moderadas. Los primeros estudios al respecto fueron los realizados por Onishi (1972), que caracterizó una amilasa extracelular producida por una bacteria halófila moderada perteneciente al género *Nesterenkonia*. Estudios posteriores pusieron de manifiesto la producción de otras enzimas por dichos microorganismos, muchas de ellas de gran interés biotecnológico, tales como amilasas, proteasas o nucleasas (Kamekura y Onishi, 1974a; 1974b; Onishi y Hidaka, 1978; Van

Qua y col., 1981; Onishi y col., 1983; Kobayashi y col., 1986; Khire, 1994; Amoozegar y col., 2003a).

Desde hace una década nuestro grupo de investigación viene realizando estudios sobre la producción de enzimas extracelulares por bacterias halófilas moderadas. Inicialmente se seleccionó una α -amilasa extracelular producida por la bacteria *Halomonas meridiana* DSM 5425. Dicha enzima se caracterizó a nivel bioquímico, determinándose las condiciones óptimas de actividad, así como sus principales productos de reacción. Asimismo, se clonó el gen responsable de su síntesis. La principal característica de la α -amilasa estudiada es su óptima actividad en condiciones de elevada salinidad (hasta el 20% de sales) y temperatura (Coronado, 1998; Coronado y col., 2000a; 2000b). Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha estudiado en colaboración con el Dr. Drainas (Univ. Ioannina, Grecia) la bacteria halófila moderada *Chromohalobacter salexigens* como hospedador para la expresión heteróloga del gen que codifica una α -amilasa de la arquea hipertermófila *Pyrococcus woesei* (Frillingos y col., 2000).

En la presente Tesis Doctoral se ha iniciado el estudio de enzimas extracelulares con actividad proteolítica producidas por bacterias halófilas moderadas. Las enzimas de este tipo descritas hasta la fecha son tres proteasas producidas por *Bacillus* sp. 21-1 (Kamekura y Onishi, 1974b), *Pseudomonas* sp. (Van Qua y col., 1981) y recientemente *Filobacillus* sp. RF2-5 (Hiraga y col., 2005). Los estudios realizados en estas enzimas abarcan su caracterización bioquímica y en el caso de la proteasa producida por *Filobacillus* sp. RF2-5 se describe su purificación.

Las proteasas constituyen uno de los grupos de enzimas más importantes producidos a nivel industrial, ampliamente utilizados en una gran variedad de industrias, tales como la de los alimentos, de bebidas, textil o papelera (Rao y col., 1998). La posibilidad de utilizar proteasas producidas por bacterias halófilas moderadas en estos procesos industriales aporta la ventaja de disponer de actividades enzimáticas óptimas a valores extremos de salinidad, así como de pH y temperatura.

En base a dichos estudios previos, en el presente proyecto de Tesis Doctoral se pretende realizar en primer lugar, un amplio muestreo que permita el aislamiento de bacterias halófilas moderadas con capacidad para producir proteasas y seleccionar aquellas que presenten una óptima actividad en condiciones extremas de salinidad. Por otro lado, pretendemos realizar un estudio bioquímico y de caracterización molecular de los genes implicados en la producción de dichas enzimas, para disponer de esta manera de información acerca de los mecanismos moleculares que poseen los microorganismos productores de este particular grupo de enzimas con actividades óptimas en condiciones extremas.

Asimismo, consideramos que el conocimiento de los mecanismos de secreción y procesamiento de enzimas extracelulares en este grupo bacteriano es de enorme

importancia pese a que hasta la fecha este aspecto no ha sido objeto de ningún estudio. Es por ello, que en la presente Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de los mecanismos de secreción de proteasas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas.

Los objetivos concretos del presente trabajo han sido los siguientes:

1. En primer lugar, el estudio de las actividades hidrolíticas extracelulares presentes en cepas halófilas moderadas disponibles en colecciones de cultivo.
2. En segundo lugar, teniendo en cuenta la escasa actividad hidrolítica mostrada por las cepas de colección, la realización de un muestreo en diversas salinas del sur de España con el fin de aislar bacterias halófilas moderadas capaces de producir diversas enzimas extracelulares.
3. A partir de estos estudios previos, se procederá a la selección de una cepa halófila moderada que posea actividad proteolítica para estudios posteriores. Paralelamente se realizará un estudio taxonómico y filogenético de la cepa seleccionada para clasificarla dentro del grupo taxonómico correspondiente. Seguidamente, se determinarán las condiciones de cultivo óptimas para la máxima producción de dicha actividad proteolítica en la cepa seleccionada.
4. Una vez estandarizadas estas condiciones para la máxima producción de la proteasa, se procederá a la purificación de la misma y a su caracterización bioquímica con el fin de determinar las características de dicha proteasa. Así se estudiarán parámetros como temperatura, pH y concentración óptima de NaCl para su actuación. También se determinarán otros valores como el peso molecular, influencia de distintos reactivos en su actividad, parámetros cinéticos, etc.
5. Procederemos también a un estudio molecular de dicha enzima. Consideramos muy interesante este aspecto ya que hasta la fecha no hay ninguna proteasa producida por bacterias halófilas moderadas que haya sido estudiada a dicho nivel. Se procederá a la clonación del gen responsable de la síntesis de la proteasa así como a su caracterización.
6. Por último, para completar el trabajo, se iniciarán estudios de secreción de la enzima. Partiendo de la hipótesis de que el sistema de secreción más extendido en bacterias Gram-negativas es el denominado sistema de secreción de tipo II, se intentará demostrar si éste es también el sistema de secreción que utiliza la cepa seleccionada para excretar la proteasa al exterior y en caso afirmativo se procederá a la clonación de los genes implicados en la secreción.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL QUÍMICO Y BIOQUÍMICO

Para realizar este trabajo se han utilizado productos adquiridos en las siguientes casas comerciales:

	http://www5.amershambiosciences.com/
	http://www.bio-rad.com
	http://www.emdbiosciences.com/
	http://www.insulab.es/
	http://www.vgdusa.com/
	http://www.eppendorf.com/es/
	http://www.fermentas.com/
	http://www.sigmaaldrich.com/
	http://www.invitrogen.com/
	https://www.macherey-nagel.com/
	http://www.megazyme.com/
	http://www.merck.de/
	http://www.direct.com/
	http://www.millipore.com/
	http://www.neb.com/
	http://www.merckbiosciences.co.uk/
	http://www.oxid.com/
	http://www.panreac.es/
	http://www.promega.com/
	http://www1.qiagen.com/
	http://www.roche.com/
	http://www.serva.de/
	http://www.scharlau.com/



<http://eu.spectrapor.com/>



<http://www.sigmaaldrich.com/>



<http://www.stratagene.com/>



<http://www.whatman.com/>

III.2. MATERIAL BIOLÓGICO

III.2.1. Cepas aisladas

Durante el presente trabajo se han aislado un total de 9.848 bacterias halófilas, de las cuales 892 resultaron ser productoras de hidrolasas extracelulares. La cepa CP76 fue seleccionada para un estudio más detallado.

En la Tabla 11 se muestra la procedencia de las cepas halófilas con capacidad hidrolítica.

Tabla 11. Procedencia de las muestras con actividades hidrolíticas

Lugar de muestreo	Total cepas
Isla Bacuta (Huelva)	130
Río Tinto (Huelva)	38
Isla Cristina (Huelva)	118
Cabo de Gata (Almería)	17
San Vicente (Cádiz)	261
San Fernando (Cádiz)	328
Total	892

III.2.2. Cepas de colección

En la Tabla 12 se muestra la relación de bacterias halófilas y cepas de *Escherichia coli* que se han utilizado en el presente trabajo.

Tabla 12. Cepas bacterianas utilizadas

Cepa bacteriana	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> CP76	Productora haloproteasa CP1 y proteasa CP2	Aislada en este trabajo
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> LMG 19699 ^T	CEPA SILVESTRE	Ivanova y col. (2002b)
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> subsp. <i>haloplanktis</i> CECT 4188 ^T	Cepa silvestre	ZoBell y Upham (1944); Gauthier y col. (1995) Ivanova y col. (2001)
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> CECT 945 ^T	Cepa silvestre	Gauthier (1976b; 1982), Gauthier y col. (1995)
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> CP76 Rf ^R	Mutante espontáneo Rf ^R de <i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> CP76	Este trabajo
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> CP77 Rf ^R Sm ^R	Mutante (<i>wmpD::Ω</i>) con fenotipo proteasa negativo de <i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> CP76 por inserción del cassette <i>Ω</i>	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>lacZΔM15</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacZYA</i> arg F)	Hanahan (1983; 1985)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>HsdS</i> , <i>gal</i> (λ cl ^{ts857} <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7</i> gene 1)	Rosenberg y col. (1987)
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	F ⁻ , <i>mcrAΔ</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80/ <i>lacZΔM15</i> , Δ X74, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> .	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> XLI-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F ⁻ , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZΔM15</i> , T10(Tet ^t)	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> SM10	Thi thr leu tonA lac Y supE <i>recA</i> Mu _c ⁺ Km ^R , Tra ⁺	Simon y col. (1983)
<i>Bacillus halophilus</i> ATCC 49085 ^T	Cepa silvestre	Ventosa y col. (1989a)
<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T	Cepa silvestre	Huval y col. (1995); Arahal y col. (2001a)

<i>Chromohalobacter israelensis</i> ATCC 43985 ^T	Cepa silvestre	Huval y col. (1995); Arahal y col. (2001a)
<i>Chromohalobacter marismortui</i> ATCC 17056 ^T	Cepa silvestre	Ventosa y col. (1989b)
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043 ^T	Cepa silvestre	Arahal y col. (2001b)
<i>Halomonas halodurans</i> ATCC 29686 ^T	Cepa silvestre	Hebert y Vreeland (1987)
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662 ^T	Cepa silvestre	Quesada y col. (1984); Dobson y Franzmann (1996)
<i>Halomonas magadiensis</i> NCIMB 13595 ^T	Cepa silvestre	Duckworth y col. (2000)
<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	Cepa silvestre	James y col. (1990)
<i>Halomonas pantelleriensis</i> DSM 9661 ^T	Cepa silvestre	Romano y col. (1996)
<i>Halomonas salina</i> ATCC 49509 ^T	Cepa silvestre	Valderrama y col. (1991); Dobson y Franzmann (1996)
<i>Halomonas subglaciescola</i> UQM 2926 ^T	Cepa silvestre	Franzmann y col. (1987)
<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 ^T	Cepa silvestre	Fendrich (1988); Dobson y Franzmann (1996)
<i>Marinococcus albus</i> CCM 3317 ^T	Cepa silvestre	Hao y col. (1984)
<i>Marinococcus halophilus</i> DSM 20408 ^T	Cepa silvestre	Novitsky y Kushner (1976); Hao y col. (1984)
<i>Nesterenkonia halobia</i> ATCC 21727 ^T	Cepa silvestre	Onishi y Kamekura (1972); Stackebrandt y col. (1995); Mota y col. (1997)
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 701 ^T	Cepa silvestre	García y col. (1987); Mellado y col. (1996); Huang y col. (2000)
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortui</i> DSM 8285 ^T	Cepa silvestre	García y col. (1987); Mellado y col. (1996); Huang y col. (2000)
<i>Salinicoccus roseus</i> DSM 5351 ^T	Cepa silvestre	Ventosa y col. (1990; 1993)
<i>Virgibacillus marismortui</i> DSM 12325 ^T	Cepa silvestre	Arahal y col. (1999; 2000); Heyrman y col. (2003)
<i>Virgibacillus salexigens</i> ATCC 700290 ^T	Cepa silvestre	Garabito y col. (1997); Waino y col. (1999); Heyrman y col. (2003)

III.2.3. Plásmidos utilizados

En la Tabla 13 se presentan los plásmidos utilizados en la presente Tesis Doctoral.

Tabla 13. Plásmidos utilizados

Plásmidos	Cepa hospedadora de <i>E. coli</i>	Características relevantes	Fuente o referencia
pCR2.1-TOPO	DH5 α	Amp ^R , Kan ^R , <i>plac-lacZ'</i> Promotores T7 y Sp6	Invitrogen
pBlueScript KS(+)	DH5 α	Vector de 2.958 pb derivado de pUC19, <i>lacZ</i> , Amp ^R	Stratagene
pBC KS(+)	DH5 α	Vector de 3,4 kb derivado de pUC19, <i>lacZ</i> , Cm ^R	Stratagene
pET22b(+)	DH5 α /BL2 (DE3)	Amp ^r , <i>lacI</i> , promotor θ 10 de T7. Vector para expresión de genes dirigida por la ARN polimerasa del fago T7. Se obtiene una proteína de fusión con 6 histidinas en C-terminal.	Novagen
pJQ200-SK	DH5 α	Gm ^R ; <i>sacB</i> ; vector suicida	Quandt y Hynes (1993)
pHP45	HB101	Derivado del pBR322 con el cassette Ω Ap ^R , Sm ^R	Prentki y Krish (1984)
pKR600	HB101	Cm ^r ; <i>ori</i> Col E1; Tra ⁺ ; "helper" o cooperador	Ditta y col. (1980)
pSUP102-Gm::Tn1732	S17-1	Gm ^R , Km ^R , vector para mutagénesis con transposones	Ubben y Schmitt (1986)

A continuación se detallan alguno de ellos:

pCR2.1-TOPO. El vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) de 3,9 kb presenta una timina (T) terminal en ambos extremos 3'. Estos extremos protuberantes sencillos 3'-T en el sitio de inserción incrementan enormemente la eficacia de la ligación de productos de PCR, debido a la adición al fragmento amplificado de una adenina (A) en los extremos 3', independiente del ADN molde, por parte de muchas ADN polimerasas termoestables. El vector pCR2.1-TOPO contiene el origen de replicación del fago f1, por lo que puede usarse para producir ADN de cadena sencilla. Como promotor presenta el de la ARN polimerasa T7. Posee también una región de clonaje múltiple (MCS) en la región del péptido α del enzima β -galactosidasa (*lacZ*). Ello posibilita una fácil selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permiten la complementación α (aquellas portadores de la delección *lacZ* Δ M15, como DH5 α y XL1-Blue). Aquellos clones que portan un plásmido con inserto forman colonias de color blanco, en contraposición al color azul de los clones sin inserto, en medio sólido LB suplementado con ampicilina, con 25 μ g/ml del sustrato cromogénico X-Gal y con 25 25 μ g/ml del inductor IPTG.

pBlueScript KS(+). Se trata de un vector de clonación derivado de PUC19 y comercializado por Stratagene. Posee un tamaño de 2,9 kb, e incluye un fragmento del gen *lacZ* que permite complementar la mutación existente en este gen en cepas como DH5 α y XL1-Blue. Posee un MCS para 21 enzimas que facilita la clonación de insertos, manifestada por la interrupción de la actividad β -galactosidasa. Permite seleccionar transformantes en

los que replica el plásmido sin inserto por la aparición de colonias de color azul al incubar en presencia de IPTG y Xgal y colonias en las que se ha insertado un fragmento dentro del MCS ya que provoca la pérdida de la actividad β -galactosidasa y por tanto del color azul. La designación KS indica que el MCS está orientado de forma que la transcripción del gen *lacZ* se efectúa desde el corte *KpnI* al *SacI*. La presencia del gen *amp^R*, que confiere resistencia al antibiótico ampicilina permite seleccionar aquellas cepas bacterianas que hayan incorporado el vector. Contiene además el origen de replicación del fago f1. Las versiones (+) ó (-) del vector indican la orientación del origen de replicación: en la versión (+) se recupera la cadena de ADN monocatenaria que codifica para el gen *lacZ*.

pBC KS(+). Este vector de clonación, también comercializado por Stratagene, posee características muy similares a las de pBlueScrip, si bien presenta un tamaño de 3,4 kb y confiere resistencia al cloranfenicol.

pET22b(+). La descripción detallada de este vector se encuentra en el apartado III.15

pJQ200-SK. El plásmido pJQ200 (4,8 kb) es un vector suicida muy versátil que permite la selección de genes por recombinación en bacterias Gram-negativas (Quandt y Hynes, 1993). Posee el origen de replicación P15A del plásmido pACYC184, cuya función está restringida a enterobacterias, así como el origen de transferencia RP4 que permite su movilización en bacterias Gram-negativas. Presenta un marcador de resistencia a gentamicina y el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* que actúa como marcador positivo para la pérdida del vector. El gen *sacB* codifica una levanosacarasa que cataliza la hidrólisis de la sacarosa así como la síntesis de levanos que, en bacterias Gram-negativas, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular cuando la concentración de sacarosa es mayor o igual al 5% (p/v).

III.2.4. Plásmidos construidos

Por último en la Tabla 14 se muestran los plásmidos construidos durante el desarrollo del presente trabajo.

Tabla 14. Plásmidos construidos en este trabajo

Plásmido	Cepa hospedadora de <i>E. coli</i>	Características relevantes
pCP1	TOP10	Derivado de pCR2.1 con un fragmento de 503 pb del gen <i>cp1</i> obtenido por PCR
pCP2	DH5 α	Derivado de pBC KS- Cm ^R con un fragmento de 2,6 kb del gen <i>cp1</i> y <i>cp2</i> obtenido por PCR inversa (<i>Sall</i>)
pCP3	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 3,8 kb del gen <i>cp1</i> obtenido por PCR inversa (<i>DraI</i>)
pCP4	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 2,3 kb de los genes <i>cp2</i> y <i>lipP</i> obtenido por PCR inversa (<i>SacI</i>)
pProt1	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 2,2 kb conteniendo el gen <i>cp1</i> obtenido por PCR con los puntos de corte <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i>
pEProt1	DH5 α /BL21	Derivado de pET22b(+)-Amp ^R con un fragmento de 2,2 kb conteniendo el gen <i>cp1</i> clonado en <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i>
pProt2	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 1,8 kb conteniendo el gen <i>cp2</i> obtenido por PCR con los puntos de corte <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i>
pEProt2	DH5 α /BL21	Derivado de pET22b(+)-Amp ^R con un fragmento de 1,8 kb conteniendo el gen <i>cp2</i> clonado en <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i>
pPD1	DH5 α	Derivado de PCR2.1 con un fragmento de 912 pb del gen <i>wmpD</i>
pPD2	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 1,7 kb obtenido por PCR inversa (<i>AclI</i>) corriente arriba del fragmento de 912 pb del clon pPD1
pPD3	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 1,7 kb obtenido por PCR inversa (<i>HinfI</i>) corriente arriba del fragmento de 912 pb del clon pPD1
pPD4	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 2,2 kb obtenido por PCR inversa (<i>EcoRV</i>) corriente abajo del fragmento de 912 pb del clon pPD1
pPD	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 2,2 kb conteniendo el gen <i>wmpD</i>
pPD Ω	DH5 α	Derivado de pBC KS-Cm ^R con un fragmento de 4,2 kb conteniendo el gen <i>wmpD</i> truncado en el sitio <i>HpaI</i> por el cassette Ω Sm
pPD Ω Q	DH5 α	Derivado de pJQSK200 con el fragmento de 4,2 kb de pPD Ω en los puntos de corte <i>PstI/XhoI</i>

III.3. MUESTREO, TRATAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS



Figura 22. Toma de muestras en Isla Cristina

Los lugares de muestreo (Figuras 22 y 23) han sido: Isla Bacuta (Huelva), Río Tinto (Huelva), Isla Cristina (Huelva), Cabo de Gata (Almería), San Vicente (Cádiz) y San Fernando (Cádiz).

La salinidad de las muestras de agua se determinó con un salinómetro (Extech).

Se recogieron muestras tanto de agua como de sedimento en frascos estériles y se conservaron en nevera hasta el momento de su inoculación, el cual se efectuó, siempre que fue posible, el mismo día del muestreo.

III.3.1. Toma de muestras

Los muestreos se realizaron a partir de estanques de distintas salinas localizados en Huelva, Cádiz y Almería, tomándose un total de 45 muestras en tres muestreos diferentes realizados en Octubre de 1999 (15 muestras), Noviembre de 2000 (18 muestras) y Julio de 2001 (12 muestras).



Figura 23. Toma de muestras en Isla Bacuta

III.3.2. Tratamiento de las muestras

Las muestras (Figura 24) se inocularon por triplicado en medio sólido, extendiéndose con una espátula. Las muestras de agua se sembraron directamente (100 μ l/placa) y se hicieron diluciones en solución salina estéril sembrando 100 μ l de la dilución 10^{-1} . Las muestras de sedimento se inocularon diluyendo 1 g de muestra en 10 ml solución salina estéril, agitando vigorosamente durante 5 minutos y posteriormente, se sembraron mediante diluciones seriadas al décimo sembrando 100 μ l de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .



Figura 24. Muestras de agua y sedimento

Los medios utilizados se describen detalladamente en el apartado III.4.3. Se seleccionaron: agar almidón, agar caseína, agar ADN, agar pululano, agar xilano y agar Tween 80. Todos estos medios contenían sales al 10% para asegurarnos el crecimiento de bacterias halófilas moderadas. Una vez

sembrados, los medios de aislamiento se incubaron durante 3-7 días a 37°C. Transcurrido este tiempo se procedió a su lectura como se describe en el apartado III.4.3.

Las colonias obtenidas se volvieron a sembrar en los mismos medios en que fueron aisladas, para asegurarnos que se trataba de cultivos puros y confirmar, asimismo, su actividad hidrolítica.

III.3.3. Conservación de las cepas

La conservación y mantenimiento de las cepas aisladas se realizó en tubos de agar inclinado, empleando para conservarlas el medio SW10 (Ventosa y col., 1982). Asimismo, todas aquellas cepas que se seleccionaron para un estudio más detallado se conservaron a -20°C y -80°C (en medio SW10 conteniendo glicerol al 20%).

El crecimiento de las bacterias en medio líquido se determinó calculando la turbidez del cultivo, valorándose la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin Elmer).

III.4. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se detalla la composición de los diversos medios de cultivo utilizados. El pH de todos ellos se ajustó a 7,2-7,4 con NaOH 1M y la esterilización se realizó en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. Para la preparación de los medios de cultivo sólidos se utilizó Bacto-Agar (Difco), a una concentración del 1,5% para medios de cultivo sin sales y un 2% para medios destinados al cultivo de bacterias halófilas.

III.4.1. Medios de cultivo para microorganismos halófilos

Medio SW: Todas las bacterias halófilas moderadas se han cultivado en un medio constituido por una solución de sales al 10% complementado con un 0,5% de extracto de levadura (Difco). A este medio le denominamos SW10. La solución de sales mantiene las proporciones relativas al agua del mar, con una ligera disminución en las concentraciones de CaCl₂ y NaHCO₃ para evitar la precipitación de las mismas (las cuales se añaden al final y por separado).

La composición que se detalla es para una solución al 30% (p/v) de sales:

NaCl.....	234,0 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	39,0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	61,0 g
KCl.....	6,0 g
NaBr	0,7 g
NaHCO ₃	0,2 g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	1,0 g
Agua destilada	csp 1000 ml

Cuando fue necesario se prepararon medios con diferentes concentraciones salinas finales (25%, 20%, 17,5%, 15%, 7,5%, 5%, 3%, 2%, 1% y 0,5%) a partir de una solución stock más concentrada (30%) (Subow, 1931), adicionados igualmente con un 0,5% de extracto de levadura. Los medios resultantes se denominaron SW25, SW20, SW17,5, SW15, SW7,5, SW5, SW3, SW2, SW1 y SW0,5 (Nieto y col., 1989).

Agar marino: Este medio se preparó bien sólido (Agar marino) o líquido (Caldo marino) para el crecimiento de las bacterias *Pseudoalteromonas ruthenica*, *Pseudoalteromonas haloplanktis subsp. haloplanktis* y *Pseudoalteromonas luteoviolacea*.

La composición del medio se detalla a continuación:

Peptona (Difco).....	5 g
Extracto de levadura (Difco)	1 g
Citrato férrico	0,1 g
NaCl.....	19,45 g
MgCl ₂ 6H ₂ O.....	8,8 g
Na ₂ SO ₄	3,24 g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	2,38 g
KCl.....	0,55 g
NaHCO ₃	0,16 g
KBr.....	80 mg
SrCl ₂ 6H ₂ O.....	57 mg
H ₃ BO ₃	22 mg
Na ₂ SiO ₃ 5H ₂ O.....	4 mg
NaF	2,4 mg
NH ₄ NO ₃	1,6 mg
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	20 mg
Agar	15 g
Agua destilada	csp 1000 ml

El pH se ajustó a 7,6.

III.4.2. Medios de cultivo para microorganismos no halófilos

Medio LB: Las cepas de *E. coli* se cultivaron en el medio de Luria-Bertani (LB). Este medio se utilizó como medio habitual de crecimiento adicionado de los correspondientes compuestos antimicrobianos (Miller, 1972).

Bacto triptona (Difco).....	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Panreac).....	10 g
Agua destilada	csp 1000 ml

Medio JLB: Este medio se utilizó para cultivar las células una vez transformadas.

Bacto triptona (Difco).....	12 g
Extracto de levadura (Difco)	24 g
Glicerol (Panreac).....	4 ml
Agua destilada	csp 1000 ml

Antes de su uso se complementa con un 1% de una solución de sales conteniendo un 2,31% de PO₄H₂K y 12,54% de PO₄HK₂, previamente esterilizada por separado.

III.4.3. Medios de cultivo para determinar las actividades enzimáticas

Para la detección de las distintas actividades enzimáticas en medio sólido de las cepas procedentes del muestreo, las placas se inocularon con las correspondientes diluciones de las muestras de manera que permitiesen el crecimiento de colonias aisladas. Todas las placas se incubaron a 37°C durante 2-7 días. Transcurrido este tiempo se procedió a su lectura añadiendo el reactivo correspondiente cuando fue necesario.

III.4.3.1. Amilasas: Agar almidón

Se utilizó el medio SW10 adicionado de agar almidón (Scharlau) ajustándose el pH a 7,2-7,4.

Las placas se incubaron a 37°C durante 7 días. La lectura se realizó añadiendo 10 ml de una solución de lugol (Microdur) sobre las placas. Esta solución reacciona con el

almidón del medio originándose un precipitado de un color violeta oscuro (Figura 25). Así, la prueba se consideró positiva cuando apareció un halo claro alrededor del crecimiento bacteriano (Cowan y Steel, 1982).

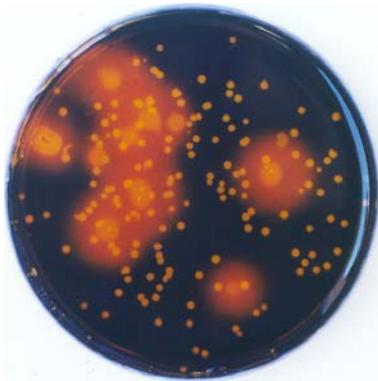


Figura 25. Colonias mostrando actividad amilasa

III.4.3.2. DNAsas: Agar DNA

En este caso se utilizó el medio agar DNAsa (Scharlau), adicionado de un 10% de sales. Las placas sembradas se incubaron a 37°C durante 7 días. Para la lectura se colocaron las placas sobre un fondo oscuro y se añadió una solución de HCl 1N. En estas condiciones el ADN sin hidrolizar precipita, oscureciendo ligeramente el medio (Figura 26). El resultado se consideró positivo cuando se observó un halo más claro alrededor del crecimiento bacteriano indicativo de la hidrólisis de ADN (Jeffries y col., 1957).



Figura 26. Cultivo mostrando actividad DNAsa

III.4.3.3. Lipasas: Tween 80

Para el estudio de la actividad lipolítica se utilizó el método descrito por Sierra en 1957. El medio se preparó añadiendo al medio SW10 Tween 80 a una concentración del 1%, el cual había sido esterilizado por separado. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 días.



Figura 27. Actividad lipolítica

La lectura es directa, si la cepa posee actividad lipolítica aparece alrededor de las colonias un precipitado como consecuencia de la reacción entre el CaCl_2 y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis del Tween 80 (Figura 27).

III.4.3.4. Pululanasa: AZCL-pululano

Para la detección de esta actividad enzimática se utilizó el sustrato cromogénico AZCL-pululano (Megazyme). Se trata de un sustrato insoluble en agua que se adicionó a una concentración del 0,1% al medio SW10. La lectura es directa, si el microorganismo posee la enzima pululanasa, hidroliza la molécula de AZCL-pululano que se solubiliza y produce un color azul a su alrededor (Figura 28).

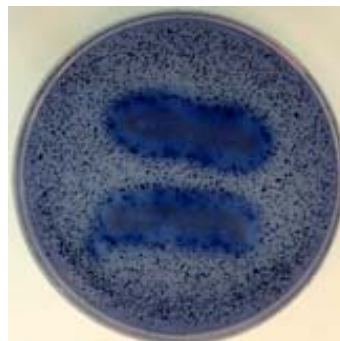


Figura 28. Cepas con actividad pululanasa

III.4.3.5. Proteasas: Agar caseína



Figura 29. Cepas con actividad proteolítica

En este caso se utilizó el medio de agar caseína modificado de Hastings (1903) que contiene leche desnatada y medio SW10 en las mismas proporciones. Para ello, preparamos por un lado la leche desnatada y por otro el medio SW10 doblemente concentrado al que se adicionó además de 0,5% de extracto de levadura, un 1% de proteosa peptona (Difco) y posteriormente se esterilizó. Para evitar su caramelización, la leche desnatada se esterilizó a 112°C, 30 minutos. Tras previo enfriamiento a 55-60°C, se mezclaron homogéneamente ambas soluciones distribuyéndose en placas de Petri. Las placas se incuban a 37°C durante 3 días.

Esta prueba es de lectura directa, observándose un halo transparente alrededor de la colonia que presenta actividad proteasa y que por tanto hidroliza la caseína del medio (Figura 29).

También se han preparado estas placas sustituyendo la leche desnatada por Skim Milk (Difco) a una concentración del 10%.

III.4.3.6. Xilanasas: AZCL-xilano

Para el estudio de las xilanasas, se usó el sustrato AZCL-Xilano (Megazyme). La preparación del medio se realizó de la misma manera que esta descrito para la detección de pululanases en el apartado III.4.3.4.

III.5. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS

Cuando fue necesario, se incluyeron en los medios de cultivo correspondientes los compuestos antimicrobianos que se indican en la Tabla 15, todos ellos proporcionados por Sigma. En ella se muestran los disolventes y la concentración de las soluciones de almacenamiento, así como la concentración habitual de uso de los mismos para *E. coli*.

Aquellas soluciones preparadas en agua destilada se esterilizaron por filtración, a través de filtros de membrana de 0,22 μm de diámetro (Millipore). Todas las soluciones se conservaron a -20°C .

Tabla 15. Compuestos antimicrobianos utilizados

Antimicrobiano	Disolvente	Concentración almacenamiento (mg/ml)	Concentración final para <i>E. coli</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina (Amp)	Agua destilada estéril y NaOH 5N	100	150
Cloranfenicol (Cm)	Etanol 96% (p/v)	50	30
Estreptomicina (Sm)	Agua destilada estéril	100	20
Gentamicina (Gm)	Agua destilada estéril	200	20
Kanamicina (Km)	Agua destilada estéril	100	50
Ácido nalidíxico (Nx)	Agua destilada estéril NaOH hasta pH 11	50	20
Rifampicina (Rf)	Metanol	25	25
Tetraciclina (Tc)	50% agua destilada estéril, 50% etanol 86% (p/v)	100	15

III.6. ACTIVIDAD PROTEASA EN LAS DISTINTAS FRACCIONES CELULARES

III.6.1. Preparación de las fracciones celulares

III.6.1.1. Sobrenadante

El sobrenadante del cultivo de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 se obtuvo a partir de 100 ml del mismo, en el medio SW7,5 y tras un periodo de 24 horas a 37°C en agitación; dicho periodo se calculó para obtener la máxima producción de la enzima proteolítica. El cultivo bacteriano se centrifugó dos veces, a 10.000 *g* durante 10 minutos, utilizando una centrífuga Evolution RC (Sorvall) y recogiendo posteriormente el sobrenadante libre de células. Cuando no se procedió inmediatamente al ensayo de actividad, las muestras de sobrenadante se conservaron a -20°C, previa adición de CaCl₂ a una concentración 1 mM, para asegurar la estabilidad de la enzima.

III.6.1.2. Fracción periplásmica

Con objeto de obtener la fracción periplásmica, el precipitado de células obtenido tras la centrifugación anterior se sometió a un choque osmótico siguiendo el método descrito por Harold y Heppel (1965). Para ello, el precipitado se resuspendió en 20 ml de una solución al 20% de sacarosa y 0,03 M TrisHCl a pH 8,0, incubándose posteriormente a temperatura ambiente durante 20 minutos en un agitador orbital (New Brunswick) con una agitación lenta (aprox. 180 *g*). A continuación, se centrifugó la solución a 7000 *g* durante 10 minutos a 4°C, y el nuevo precipitado se resuspendió rápida y vigorosamente en 20 ml de agua destilada estéril previamente enfriada en hielo. Esta suspensión se dejó 10 minutos en hielo con agitación, y se centrifugó (10.000 *g*, 10 minutos, 4°C), recogiendo el sobrenadante que contenía los componentes periplásmicos de las células.

Al igual que en el caso de las muestras de sobrenadante, las fracciones periplásmicas se conservaron a -20°C, adicionadas de CaCl₂ (1 mM).

III.6.1.3. Extracto celular

Los extractos celulares se obtuvieron mediante un tratamiento de las células con ultrasonidos, utilizando un sonicador Vibra-cell (Danbury). Para ello, las células obtenidas tras la recolección de la fracción periplásmica, se lavaron con 10 ml de la solución tampón Z, se centrifugaron (10.000 *g*, 10 minutos, 4°C) y se resuspendieron en 10 ml del mismo tampón Z, repartiéndose en alícuotas de 300 µl y procediéndose finalmente a su rotura mediante sonicación.

► **Tampón Z:** Na₂HPO₄ 7H₂O, 16,1 g; NaH₂PO₄ H₂O, 5,5 g; KCl, 0,75 g; MgSO₄ 7H₂O, 0,246 g; agua destilada csp 1000 ml

III.6.2. Ensayo de la actividad proteolítica

Para la detección de la actividad enzimática se han utilizado dos métodos:

Hide Powder Azure: El sustrato Hide Powder Azure (Sigma) (Riderknecht y col., 1968) es un sustrato proteico, insoluble en agua unido covalentemente al colorante Remazol Brilliant Blue R. Se utiliza para la detección de la actividad proteolítica. Cuando el sustrato es hidrolizado por una proteasa, se libera el colorante y tiñe de color azul el medio.

Ensayo

1. Se ponen en contacto 100 μ l de sobrenadante de la cepa a la cual se quiere determinar la actividad proteolítica con 900 μ l de Tampón TrisHCl 50 mM, pH 7,8 y se le añaden 8 mg del sustrato Hide Powder Azure. Como control sustituimos los 100 μ l de sobrenadante por agua destilada.
2. La mezcla de reacción se incuba a 37°C durante 30 minutos.
3. La reacción se detiene con hielo.
4. Se centrifuga durante 10 minutos a 13.000 g, se mide la absorbancia a 595 nm y se compara con el control.
5. Para realizar la curva patrón se utilizan diluciones de tripsina al 2,5%, se realiza el ensayo y se extrapolan en la curva patrón los valores de nuestras muestras.

Método de Kunitz: Otro método que se utilizó para la detección de la actividad proteolítica es el método descrito por Kunitz (1947) con algunas modificaciones.

Ensayo

1. Se ponen en contacto 100 μ l de sobrenadante de la cepa a la cual se quiere determinar la actividad proteolítica (ó 5 μ l (0,01 U) de la enzima pura más 95 μ l de agua) con 400 μ l de un tampón que contiene un 0,5% de caseína (Hammarsten, Merck) en TrisHCl 50 mM pH 8,5. Como control sustituimos los 100 μ l de muestra por agua destilada.
2. La mezcla de reacción se incuba a 37°C durante 30 minutos.
3. Se añaden 500 μ l de ácido tricloroacético al 10% para detener la reacción y se mantiene a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos.
4. Posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 13.000 g, se mide la absorbancia a 280 nm y se compara con el control.

III.6.3. Determinación del contenido en proteínas totales

Para la determinación de la concentración total de proteínas se utilizó el método descrito por Bradford (1976) utilizando el sistema de Bio-Rad, basado en el cambio del máximo de absorción de una solución ácida de azul brillante de Coomasie G-250 de 465 nm a 595 nm al unirse inespecíficamente a las proteínas.

Ensayo

1. En primer lugar se construye una curva patrón con BSA, para ello, se prepara una solución de BSA (100 µg/ml) en agua destilada.
2. A partir de esta solución se preparan distintas diluciones (1-100 µg) también en agua destilada.
3. Las muestras en estudio se diluyen asimismo a razón de 1-100 µl de muestra en agua destilada.
4. Seguidamente se mezclan las distintas diluciones de BSA y muestras con 800 µl de agua destilada y 200 µl de Bio-Rad Protein Assay (BioRad).
5. La reacción se mezcla con ayuda de un agitador y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10-60 minutos.
6. Transcurrido este tiempo medimos la absorbancia a 595 nm tanto de las muestras de ensayo como de las muestras de la curva patrón.
7. Construimos la curva patrón y extrapolamos en la misma los valores de las muestras en estudio.

III.7. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Previa a la purificación y caracterización bioquímica de la haloproteasa CP1, se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 para la producción de la enzima, así como las condiciones del ensayo para determinar la actividad enzimática. Para la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento se empleó el sobrenadante de los cultivos celulares.

III.7.1. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo para la producción de la haloproteasa CP1

III.7.1.1. Determinación de la concentración de sales óptima y del tiempo de incubación

En primer lugar se determinó la concentración de sales óptima del medio de cultivo para la máxima producción de la enzima y el tiempo de incubación necesario. Para ello *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 se cultivó en distintos medios: SW2, SW5, SW7,5, SW10, SW12,5, SW15, SW17,5 y SW20. Se usaron matraces de 250 ml conteniendo cada uno 100 ml de medio de cultivo. Se partió de un cultivo de 16 h de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76, se inocularon los distintos matraces con 50 µl de cultivo y se incubaron a 37°C. Se tomaron alícuotas de 2 ml cada hora y se midió la DO₆₀₀ para determinar el crecimiento. A partir de dichas alícuotas se centrifugó 1 ml a 8000 g en una centrífuga Eppendorf, y el sobrenadante libre de células se guardó a 4°C para realizar posteriormente el correspondiente ensayo enzimático utilizando el método del Hide

Powder Azure (Sigma) descrito en el apartado III.6.2. El pH del medio de cultivo se ajustó siempre a 7,2-7,4.

III.7.1.2. Determinación de la temperatura óptima

La temperatura óptima de producción de la enzima se determinó variándose, en este caso, la temperatura de incubación del cultivo. *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 se cultivó en medio SW7,5 (determinado como óptimo para la producción de la proteasa) y se incubó a 28°C y 37°C tomándose alícuotas (2 ml) cada tres horas hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Igualmente se centrifugó 1 ml de dichas alícuotas y el sobrenadante se conservó a 4°C hasta que se le realizó el ensayo enzimático según el método del Hide Powder Azure (Sigma).

III.7.1.3. Determinación de la composición del medio de cultivo

Una vez determinada la concentración de sales óptima, la temperatura y el tiempo de incubación para la máxima producción de proteasa, se procedió a estudiar la influencia de la composición del medio de cultivo tanto en el crecimiento de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 como en la producción de la haloproteasa CP1 por dicho microorganismo.

Se prepararon distintos medios de cultivo, usando SW7,5, como base y añadiendo en cada caso el nutriente correspondiente. Se utilizaron los siguientes nutrientes: lactosa, sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa (todos a concentración 50 mM), NH₄Cl 50 mM, glicerol (1% [p/v]), manitol (1% [p/v]), y casaminoácidos (1% [p/v]). También se usó peptona (1% [p/v]) y caldo nutritivo (1% [p/v]). En este caso, también se utilizaron matraces de 250 ml con 100 ml de medio cada uno. Estos medios se inocularon con 50 µl de un cultivo de *Pseudoalteromonas ruthenica* cepa CP76 de 16 horas. Se tomaron alícuotas de los mismos cada 3 horas y se midió la DO₆₀₀ para determinar el crecimiento. Posteriormente se realizó el ensayo enzimático utilizando el método Hide Powder Azure (Sigma).

III.7.2. Determinación de las condiciones óptimas del ensayo para determinar la actividad proteasa

Una vez determinada las condiciones óptimas para la máxima producción de la haloproteasa CP1 se procedió a determinar las condiciones óptimas del ensayo para determinar la actividad enzimática. Se utilizaron alícuotas del sobrenadante de la cepa *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 incubada en las condiciones óptimas (medio SW 7,5, 37°C durante 20-24 horas). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

III.7.2.1. Determinación del pH óptimo

Se procedió en primer lugar a determinar la actividad proteolítica mediante el método del Hide Powder Azure (Sigma), variando el pH de la solución tampón (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) utilizada durante la incubación de la mezcla de reacción. Una vez determinado el valor óptimo de pH, este se mantuvo fijo y se variaron el resto de los parámetros ensayados.

III.7.2.2. Determinación de la temperatura óptima

La temperatura óptima de actividad se determinó variándose, en este caso, la temperatura de incubación de la mezcla de reacción (25, 28, 37, 55, 65, 75, 85, 95°C). Cuando se ensayaron temperaturas altas se disminuyó el tiempo de reacción, a fin de evitar una posible degradación del enzima a las temperaturas elevadas. Se realizó el ensayo enzimático según el método del Hide Powder Azure (Sigma).

III.7.2.3. Determinación de la concentración de NaCl óptima

Por último se procedió a determinar la concentración de NaCl óptima para la máxima actividad enzimática. Para ello se añadió al tampón de reacción distintas concentraciones de NaCl (0%, 3%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25% y 30% ClNa). El ensayo enzimático al igual que en los casos anteriores se realizó según el método del Hide Podwer Azure (Sigma).

III.7.3. Dializado de las muestras

Una vez determinadas las condiciones de cultivo para la máxima producción de la haloproteasa CP1, *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 se cultivó en dichas condiciones. Señalaremos que, para obtener una óptima producción enzimática se requieren cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento (cultivos de al menos 20 horas), cultivados en medios con un 7,5% de sales, adicionados de sacarosa 50 mM y a un pH y temperatura de 7,4 y 37 °C respectivamente).

Inoculamos 2 litros de medio SW7,5 con *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 e incubamos a 37°C durante 24 horas en agitación. El cultivo se centrifuga y el sobrenadante libre de células se conservó a 4°C. Se procedió a su dializado para eliminar los restos de sales que podrían interferir en la purificación de la enzima. Para ello utilizamos bolsas de diálisis Servapor de 21 mm de diámetro.

Procedimiento

1. Se preparan 6 litros de TrisHCl 20 mM, pH 8,5.
2. Se cortan las bolsas de diálisis Servapor de un tamaño adecuado para introducir las en probetas de 2 litros de capacidad.
3. A continuación se procede al lavado de las bolsas con TrisHCl 20 mM pH 8,5 y se cierran con una pinza en la parte inferior.
4. Las bolsas se llenan con el sobrenadante y se cierran por la parte superior con otra pinza.
5. Las bolsas se introducen en las probetas conteniendo tampón TrisHCl 20 mM pH 8,5 y se mantienen 16 horas en agitación lenta a 4°C. El tampón se cambia dos veces durante este período.
6. El sobrenadante ya dializado se recupera y se conserva a 4°C.
7. Por último, para comprobar que no se ha perdido la actividad, se realiza el ensayo enzimático al sobrenadante antes y después del dializado.

III.7.4. Columna de intercambio iónico Sepharose Fast Flow



Figura 30. Columna de intercambio iónico Sepharose Fast Flow

Para la purificación de la haloproteasa CP1 se utilizó en primer lugar una columna de intercambio iónico, concretamente Q-Sepharose Fast Flow (2,5 x 20 cm, Amersham Pharmacia Biotech) (Figura 30). En primer lugar, para equilibrar la columna, se añadieron 100 ml del tampón TrisHCl 20 mM, pH 8,5, a una velocidad de 8-10 ml/min. Una vez equilibrada, se añadió el dializado obtenido en el apartado anterior a una velocidad de 10-15 ml/min. Seguidamente se procedió a eluir la columna, usando el tampón TrisHCl 20 mM, NaCl 1M, recogiendo las fracciones en tubos colectores de 5 ml de capacidad, a razón de 2,5 ml en cada uno de ellos. La unión de los iones Cl^- a la columna va liberando la proteasa unida a ella que se recoge en los tubos colectores. Seguidamente se realizó el ensayo enzimático descrito por Kunitz (1947) (apartado III.6.2) a cada una de las fracciones eluidas, seleccionando aquellas que presentaban actividad.



Figura 31. Sistema de filtración Amicón

Posteriormente las fracciones activas se concentraron a un menor volumen usando el sistema de filtración Amicon (Millipore) (Figura 31).

III.7.5. Columna de filtración en gel Superdex S-200

Una vez concentradas las fracciones activas, en un segundo y último paso de purificación se utilizó una columna de filtración en gel Superdex S-200 (1,5 x 96 cm, Amersham Pharmacia Biotech) (Figura 32), que separa las proteínas en función de su peso molecular. La columna se equilibró con tampón TrisHCl 20 mM, NaCl 0,5 M y se le adicionó el concentrado de las muestras obtenidas en la elución de la columna Q-Sepharose Fast Flow. Para eluir esta columna se utilizó el mismo tampón usado para el equilibrado de la misma y se recogieron las fracciones en tubos colectores. Se realizó el ensayo enzimático de Kunitz (1947) a las distintas fracciones y se seleccionaron aquellas que presentaban actividad. Las fracciones activas se concentraron a un menor volumen usando el sistema de filtración Amicon (Millipore).



Figura 32. Columna Superdex S-200 de filtración en gel

III.8. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

III.8.1. Gel SDS-poliacrilamida

La electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el método descrito en Laemmli (1970). Este método se basa en la utilización de dos geles, un gel separador en la parte inferior y un gel concentrador en la parte superior. Los dos geles presentan distintas características de porosidad, pH y fuerza iónica. Esta discontinuidad permite la reducción del volumen de las muestras, por lo que favorece la resolución de las bandas proteicas, según su peso molecular, en el gel separador.

Electroforesis

1. Se utilizó el sistema Mini Protean II (BioRad) para geles de 7 x 8 cm. La cubeta se montó siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 33).
2. Para un gel de poli(acrilamida) al 10% desnaturalizante se utilizaron las siguientes soluciones:

Componente	Gel concentrador	Gel separador
Agua destilada	2,7 ml	4 ml
TrisHCl 1,5 M, pH 8,8	-	2,5 ml
TrisHCl 1,5 M, pH 6,8	0,5 ml	-
Acilamida 30%	0,670 ml	3,3 ml
SDS 10%	0,04 ml	0,05 ml
APS 10%	0,04 ml	0,1 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml
Volumen final	4 ml	10 ml

3. En primer lugar se prepara el gel separador. Es importante tener en cuenta que los catalizadores de la polimerización (persulfato amónico y TEMED) deben añadirse en último lugar. Los distintos componentes se mezclan y la solución se aplica en los cristales previamente montados, hasta alcanzar la altura deseada. Se cubren inmediatamente con isopropanol para evitar el contacto con el aire y se deja polimerizar durante 30 minutos.
4. Una vez polimerizado el gel separador, se elimina el isopropanol con un papel de filtro, y se lava con agua destilada. Posteriormente se añade la mezcla del gel concentrador, se coloca el peine adecuado y se deja polimerizar durante 15 minutos.
5. Las muestras se preparan diluyéndolas al 50% en tampón de carga 2x sometiéndolas a un tratamiento de desnaturalización hirviéndolas durante 5 minutos.
6. Una vez ensamblada la cubeta, se añade el tampón de electroforesis y se cargan las muestras en los pocillos con ayuda de una jeringuilla Hamilton. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el kit de calibración de pesos moleculares para electroforesis "SDS Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis" (Amersham Pharmacia Biotech).
7. Los electrodos se conectan a una fuente continua y se mantiene a 100-150 V hasta que el colorante del tampón de carga comience a salirse del gel.
8. Una vez finalizada la electroforesis el gel se prepara para transferir (apartado III.8.7) o bien se tiñe con una solución de azul Coomassie (apartado III.8.4).



Figura 33. Sistema de electroforesis de proteínas

- ▶ **Tampón de carga desnaturalizante 2x:** TrisHCl 0,5 M pH 6,8, 2,5 ml; glicerol, 2 ml; SDS 10% (p/v), 4 ml; azul de bromofenol 0,1%, 0,5 ml; β-mercaptoetanol, 0,5 ml; agua destilada, csp 10 ml.
- ▶ **Tampón de electroforesis 10x:** Tris base, 29 g; glicina, 144 g; SDS 0,1% (p/v).
- ▶ **Persulfato amónico (APS):** 10% p/v en agua destilada.
- ▶ **SDS:** 10% p/v en agua destilada.

III.8.2. Zimograma

Para detectar la actividad proteolítica de la haloproteasa CP1 una vez purificada se realizó un gel de actividad (zimograma) tal y como describen Heussen y Dowdle (1980). Se utilizaron geles verticales con la siguiente composición:

Componente	Gel concentrador	Gel separador
Agua destilada	2,7 ml	2 ml
Gelatina 0,5%	-	2 ml
1,5 M TrisHCl pH 8,8	-	2,5 ml
1,5 M TrisHCl pH 6,8	0,5 ml	-
Acrilamida 30%	0,67 ml	3,3 ml
SDS 10%	0,04 ml	0,1 ml
APS 10%	0,04 ml	0,1 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml μ l
Volumen final	4 ml	10ml

La preparación del gel es igual a la descrita para los geles SDS acrilamida en el apartado anterior excepto la preparación de las muestras y el procesamiento del gel una vez terminada la electroforesis.

Para preparar la muestra se mezclan al 50% con tampón de carga (no se hierven) y se cargan en el gel que se introduce en la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis. Posteriormente se somete a una diferencia de potencial de 120 V durante al menos 3 horas. Una vez terminada la electroforesis el gel se sumerge durante 30 minutos en una solución al 0,25% (v/v) de Tritón X-100, para eliminar los restos de SDS y se incuba en las condiciones óptimas para la máxima actividad proteasa. Seguidamente el gel se tiñe con una solución al 0,6% (p/v) de negro amido (apartado III.8.5).

III.8.3. Geles nativos

Los geles nativos no desnaturalizantes se utilizaron cuando se requería mantener la proteína en su conformación activa. Se usaron geles preparados comercialmente PreCast Gel, 4-20% Glicine Gel 10nm x 10 wel (Novex), siguiendo las instrucciones del fabricante. La composición de los tampones utilizados se detalla a continuación.

- ▶ **Tampón de carga no desnaturalizante:** TrisHCl 0,5 M, pH 8,8, 4 ml; azul de bromofenol 0,1%, 0,5 ml; glicerol, 2 ml; agua destilada, csp 10 ml.
- ▶ **Tampón de electroforesis 10x:** Tris base, 29 g; glicina, 144 g, agua destilada, csp 1.000 ml.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (apartado III.8.4) o bien, cuando se quiso poner de manifiesto la actividad enzimática, se incubaron durante 1 hora en gelatina al 0,5% o azocaseína al 1,5%; seguidamente se mantuvieron durante 30 minutos en el tampón TrisHCl 50 mM pH 8,5 del ensayo enzimático de Kunitz (1947), procediéndose a continuación a su tinción con negro amido (apartado III.8.5).

III.8.4. Tinción con azul brillante de Coomassie

Una vez finalizada la electroforesis los geles de acrilamida se tiñeron con una Solución de Coomassie R-250 (Sigma) durante 1 hora y se destiñeron durante al menos 6 horas en una Solución de desteñido.

- ▶ **Solución de Coomassie:** Azul de Coomassie 0,1% (p/v); metanol 40% (p/v); ácido acético glacial 10% (v/v).
- ▶ **Solución de desteñido:** Metanol 20% (v/v); ácido acético glacial 7% (v/v).

III.8.5. Tinción con negro amido

Una vez terminada la electroforesis, los geles de actividad (zimograma) o los geles nativos cuando se quería determinar su actividad, se tiñeron con una solución de negro amido durante una hora y se introdujeron posteriormente en una solución de desteñido durante 2 horas.

- ▶ **Solución de negro amido:** Negro amido 0,6% (p/v) en agua: etanol 96%: ácido acético glacial (60:30:10).
- ▶ **Solución de desteñido:** Agua: etanol 96%: ácido acético glacial (60:30:10).

III.8.6. Secado de los geles y conservación

Para el secado de los geles se procedió a sumergir los mismos en primer lugar en agua destilada durante 5 minutos y a continuación en 35 ml de una Solución de secado. Seguidamente se cortaron dos papeles de celofán de tamaño ligeramente superior al gel y se sumergieron también en dicha Solución de secado. Finalmente el gel se ensambló en el desecador Dryease Mini-Gel Drying System (Novex) y se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas.

- ▶ **Solución de secado:** Etanol 96%, 50 ml; glicerina, 5,0 ml; agua destilada, csp 250 ml.

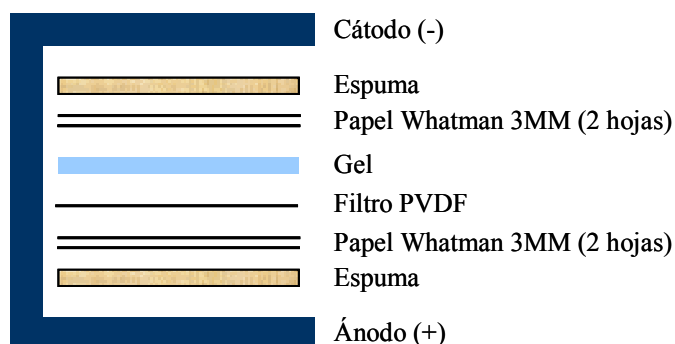
III.8.7. Western blot

Las proteínas resueltas en geles de SDS-PAGE se transfirieron a un soporte sólido, concretamente a una membrana Inmobilon P de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Millipore. La transferencia se realizó en tanque utilizando el sistema de BioRad. Se siguió el protocolo descrito por Matsudaira (1987).

Transferencia

1. Una vez separadas las proteínas en un gel de acrilamida, se retira el gel de los cristales y se mantiene durante 15 minutos en Tampón de transferencia, para eliminar los restos de SDS.
2. Se corta un trozo de filtro de PVDF del tamaño del gel y se humedece en metanol al 100% durante 15 segundos, posteriormente se lava con agua milliQ durante 2 minutos, teniendo cuidado de dejar ninguna zona seca. Finalmente, se mantiene en tampón de transferencia al menos durante 5 minutos.

- El "sándwich" se monta de la siguiente manera: sobre 2 papeles Whatman 3MM se coloca el filtro de PVDF e inmediatamente encima el gel. Sobre el gel se colocan 2 trozos de papel Whatman 3MM. Por encima y debajo de este bloque se coloca un trozo de espuma y todo ello se coloca en la cubeta. Durante el montaje no deben quedar burbujas de aire ya que pueden interferir en la transferencia; para ello, se humedecen los papeles Whatman y las espumas con Tampón de transferencia. Al final el "sandwich" debe tener este aspecto:



- Se monta la cubeta Novablot 2117-250 (LKB) y se conecta a una fuente de corriente y se mantiene a un amperaje de 0,8 mA/cm² durante 1 hora.
- Una vez finalizada la transferencia se desmonta el equipo y se recupera el filtro para realizar los tratamientos posteriores.

► **Tampón de transferencia:** Tris base 25 mM; glicina 192 mM; metanol 10% (v/v).

III.8.8. Secuenciación de proteínas

La secuenciación de las proteínas purificadas se realizó en un secuenciador Applied Biosystems 473A, mediante el empleo de ciclos sucesivos de la degradación de Edman (Edman y Begg, 1967).

III.9. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HALOPROTEASA CP1

Se ha realizado la caracterización bioquímica a partir del sobrenadante del cultivo bacteriano de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 (respecto a temperatura, pH y concentración de NaCl) y también la caracterización bioquímica de la haloproteasa CP1 una vez purificada.

Para la caracterización bioquímica del sobrenadante se ha utilizado el ensayo enzimático Hide Powed Azure y en el caso de la caracterización de la haloproteasa CP1 pura se ha realizado el ensayo enzimático según el método de Kunitz (1947) descrito en el apartado III.6.2., variando en cada caso el parámetro que se desea estudiar.

III.9.1. Determinación del pH óptimo de actividad

Para determinar el pH óptimo de actividad se realizó el ensayo enzimático variando el pH de las soluciones tampón utilizadas durante la incubación de la mezcla de reacción. Así se utilizó el tampón universal ajustado a distintos valores de pH (5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9,9,5 y 10).

► **Tampón universal:** H₃PO₄, 2,69 ml; CH₃COOH, 2,28 ml; H₃B0₃, 2,47 g; agua destilada, csp 1.000 ml.

III.9.2. Determinación de la temperatura óptima de actividad

Para calcular la temperatura óptima de actividad de la enzima, se utilizó el mismo método de valoración de la actividad proteolítica, variándose en este caso la temperatura de incubación de la mezcla de reacción. Se ensayaron las siguientes temperaturas: 25, 37, 45, 55, 65, 75, 85 y 95°C. Cuando se ensayaron temperaturas altas se disminuyó el tiempo de incubación, a fin de evitar una posible degradación del enzima a las temperaturas elevadas.

III.9.3. Determinación de la concentración de NaCl óptima de actividad

Para determinar la concentración salina óptima de actividad de la enzima, se utilizaron distintas concentraciones de NaCl en la mezcla de reacción del ensayo enzimático antes de la incubación de la misma. Así, se adicionó NaCl hasta obtener unas concentraciones finales en la mezcla de reacción de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 M. Paralelamente se realizó el ensayo sin añadir NaCl.

III.9.4. Estudio de la estabilidad de la haloproteasa CP1 en distintas concentraciones de NaCl

Para analizar la estabilidad del enzima a distintas concentraciones de NaCl (0,5 a 4 M NaCl) se determinó la actividad proteolítica después de una preincubación del enzima en tampón TrisHCl 50 mM, pH 8,5 a 4°C durante 24 horas, adicionado de las cantidades correspondientes de NaCl. El ensayo enzimático se realizó en las condiciones óptimas descritas previamente.

III.9.5. Estudios de termoestabilidad

Para analizar la termoestabilidad del enzima las muestras se incubaron durante 60, 120, 180 y 240 minutos en tampón TrisHCl 50 mM, pH 8,5 con una concentración 1 M de NaCl a las temperaturas de 50 y 55°C, y posteriormente se realizó el ensayo enzimático en las condiciones óptimas.

III.9.6. Determinación de los sustratos sobre los que actúa la proteasa

Para determinar los diferentes sustratos sobre los que la haloproteasa CP1 es capaz de actuar se procedió a realizar el ensayo enzimático utilizando en cada caso el sustrato correspondiente.

Los sustratos ensayados fueron: caseína, gelatina, azocaseína, seroalbúmina, ovoalbúmina y queratina. Dichos sustratos se disolvieron a una concentración del 0,5% en tampón TrisHCl 50 mM pH 8,5, realizándose el ensayo enzimático en las condiciones óptimas.

III.9.7. Influencia de metales pesados en la actividad enzimática

Para estudiar la influencia de los metales pesados en la actividad proteolítica se realizó el ensayo enzimático, añadiendo distintos metales al tampón de reacción (TrisHCl 50 mM pH 8,5). Las soluciones de metales utilizados (a una concentración de 5 y 10 mM) fueron los siguientes: NiCl₂, CuCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, CaCl₂, MnCl₂, BaCl₂, CoCl₂ y S₂Cl.

III.9.8. Efecto de distintos inhibidores sobre la haloproteasa CP1

Para clasificar a la haloproteasa CP1 dentro de algunos de los grupos de proteasas descritos, se procedió a realizar el ensayo enzimático de actividad añadiendo al tampón de reacción TrisHCl 50 mM, pH 8,5, distintos inhibidores de proteasas conocidos (Tabla 16). A la actividad proteasa obtenida cuando se realizó el ensayo enzimático sin añadir ningún inhibidor se le asignó el valor máximo de 100%.

Tabla 16. Inhibidores de proteasas

Inhibidor	Proteasas inhibidas
Antipaina dihidrocloruro (1 mM)	Papaínas y tripsinas
Bestatina (0,5 M)	Aminopeptidasas
Quimostatina (0,5 mM)	α - β - γ Quimotripsinas
E-64 (0,5 mM) ^a	Cisteína proteasas
Leupeptina (0,5 mM)	Cisteína proteasas
Peptatina (0,1 mM)	Aspartato proteasas
Fosforamidón (1 mM)	Metaloendopeptidasas
EDTA-Na ₂ (1,5 mM, 5 mM, 10 mM)	Metalo proteasas
Pefabloc (5 mM, 10 mM)	Serina proteasas
Parametil sulfonil fluoruro (PMSF) (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM)	Serina proteasas
Aprotinina (0,01 mM, 0,05 mM)	Serina proteasas

^aE-64: L-trans-epoxisuccinil-leucil-amido(4-guanidino)butano

III.9.9. Estudios cinéticos

III.9.9.1. Determinación de la Km y Vmax

Para determinar los parámetros cinéticos de la haloproteasa CP1 se procedió a realizar el ensayo enzimático disolviendo concentraciones crecientes de caseína (0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,75% y 1%) en el tampón TrisHCl 50 mM pH 8,5, con el fin de saturar la actividad proteolítica de la enzima.

Los parámetros cinéticos se deducen introduciendo los datos de actividad en la ecuación de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934).

III.9.10. Determinación del peso molecular

Para determinar el peso molecular de la haloproteasa CP1 se realizó una electroforesis en gel de SDS-PAGE como se describe en el apartado III.8.1., utilizando 5 μ l (0,01 U) de la haloproteasa CP1. Como marcador de pesos moleculares se utilizó "Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis" (Amersham Pharmacia Biotech). En la Tabla 17 se muestran los pesos moleculares de cada banda. Para determinar el peso molecular se midió la distancia entre el frente del gel y cada una de las bandas, tanto del marcador de pesos moleculares como de la proteasa purificada y por extrapolación se determinó el peso molecular exacto de la haloproteasa CP1.

Tabla 17. Marcadores de pesos moleculares de proteínas

Proteína	Peso molecular (kDa)
Fosforilasa B	97
Albúmina	66
Ovoalbúmina	
Anhidrasa carbónica	30
Tripsina	20
α -Lactoalbúmina	14

En otros casos se utilizó como marcador de pesos moleculares BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogene) cuyo patrón de bandas se muestra en la Figura 34.

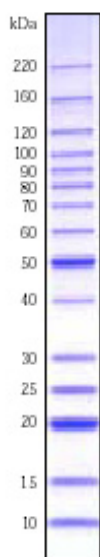


Figura 34 . Marcador de pesos moleculares de proteínas BenchMark™ Protein Ladder

III.10. OBTENCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A LA RIFAMPICINA

Para facilitar determinados aspectos experimentales se procedió a la obtención de mutantes resistentes a la rifampicina de *P. ruthenica* CP76.

Se prepararon placas de SW7,5 con concentraciones crecientes de rifampicina (desde 4 μ g/ml a 30 μ g/ml) y se sembraron con 100 μ l de un cultivo de 12 horas de *P. ruthenica* CP76. Las placas se incubaron a 37°C. Las colonias que crecieron en alguna de las placas se consideraron mutantes espontáneos a la rifampicina.

III.11. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO

III.11.1. Conjugación

La transferencia de plásmidos movilizables, aunque no autotransmisibles, desde cepas de *E. coli* a la bacteria halófila *P. ruthenica* CP76, se llevó a cabo según el modelo de conjugación triparental, utilizando el plásmido pRK600 (que contiene la región *tra* del plásmido RK2) como plásmido movilizador en *trans*, también denominado plásmido cooperador o "helper" (Kressler y col., 1992). La transferencia de los plásmidos autotransmisibles RK2 (IncP) y pCU1 (IncN), y la de aquellos no autotransmisibles pero movilizables desde las cepas adecuadas de *E. coli* a *P. ruthenica* CP76, se realizó según el modelo de cruce biparental.

Protocolo

1. A partir de cultivos incubados durante una noche a 37°C en medios adecuados para su crecimiento adicionados de los correspondientes antibióticos, se procede a la inoculación de nuevos cultivos (tubos de 5 ml de medio con 100 µl de cultivo) del donador y receptor, así como del cooperador cuando se trataba de conjugaciones triparentales.
2. Estos cultivos se incuban a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ igual a 0.4.
3. Los cultivos se mezclan en las proporciones adecuadas, generalmente la proporción óptima resultó ser 1:1:1.
4. La mezcla resultante se centrifuga, se lava dos veces con el medio SW2 para eliminar los restos de antibióticos y se resuspende en 150 µl del mismo medio.
5. Dicha mezcla se deposita sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 µm de diámetro de poro, previamente colocado sobre una placa de Petri con medio SW2. Dichas placas se incuban a 37°C durante 10-12 horas (Figura 35)
6. Tras el período de incubación, la mezcla de conjugación obtenida se resuspende en 1 ml de una solución estéril de glicerol al 20 %, para su siembra y posterior conservación a -20°C.
7. Una vez realizadas las diluciones oportunas, se sembraron 100 µl en los medios selectivos apropiados adicionados del antibiótico correspondiente (para contra seleccionar el donador) y del antibiótico correspondiente para seleccionar los transconjugantes portadores del plásmido.
8. Como control de las posibles mutaciones espontáneas, tanto donadores como receptores y cooperadores se siembran paralelamente en los mismos medios selectivos.
9. La eficiencia de la conjugación, expresada como frecuencia de transferencia, se determina calculando el número de transconjugantes obtenidos respecto al número final de células receptoras presentes. Todos los ensayos se realizan por triplicado.



Figura 35. Placa de Petri con medio SW2 y filtros de conjugación

III.11.2. Transformación

Para la obtención de células de *E. coli* competentes y su posterior transformación se siguió el método de CaCl_2 descrito por Sambrook y Russell (2001). Este método está basado en los estudios de Mandel y Higa (1970), quienes observaron que el tratamiento de *E. coli* con soluciones frías de CaCl_2 seguido de un breve calentamiento inducía un estado transitorio en el que las células eran capaces de incorporar ADN exógeno. A partir de aquí se han desarrollado diversas modificaciones del procedimiento original con el propósito de aumentar la eficiencia en el proceso de transformación, inicialmente de 10^5 - 10^6 transformantes/ μg de ADN. En aquellos casos en los que se requirió una mayor eficiencia, se empleó el método de transformación por electroporación (Sambrook y Russel, 2001) basándose en los estudios de Dower y colaboradores (1988). Este proceso se basa en la permeabilización transitoria de la membrana celular mediante un pulso eléctrico, permitiendo en este momento la incorporación del ADN. Su elevada eficiencia de transformación, en torno a 10^9 - 10^{10} transformantes/ μg de ADN, depende de una serie de parámetros, entre los que cabe destacar la potencia del campo eléctrico (kV/cm), la longitud del pulso eléctrico (τ) y la concentración de ADN (μg), característicos de cada tipo celular.

III.11.2.1. Preparación de células competentes

Hay varios aspectos fundamentales para garantizar el éxito en la preparación de células competentes: uno de ellos es la pureza de los reactivos y del agua destilada empleada tanto para la preparación del medio de cultivo como para la limpieza del material de vidrio y de plástico (agua de calidad MilliQ de Millipore) y el otro es el mantenimiento en todo momento de las células en hielo (mejor si se trabaja dentro de la cámara de 4°C). También se ha descrito que es importante que la cepa usada para la preparación de las células haya sido extraída directamente del congelador de -80°C la noche previa a la inoculación del cultivo de partida.

Protocolo

1. A partir de un vial congelado de la cepa de *E coli* deseada se siembran placas de medio LB y se incuban durante 12 horas a 37°C con el fin de obtener colonias aisladas.
2. Con una de estas colonias se inocula un tubo con 5 ml de medio LB líquido con el correspondiente antibiótico y se incuba durante toda la noche a 37°C .
3. Se inoculan matraces de 1.000 ml que contienen 100 ml de medio LB con 200 μl del cultivo y se incuban a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} comprendida entre 0,4 y 0,6 e inmediatamente se introducen en hielo durante 30 minutos.
4. Transcurrido este tiempo, las células se separan mediante centrifugación a 8.000 g durante 10 minutos (Centrífuga Sorvall Evolution RC) a 4°C . Para mantener condiciones de asepsia se esterilizan previamente los tubos de centrifuga y para no romper la cadena de frío se mantienen en hielo antes de su uso.
5. El medio de cultivo se decanta y el sedimento se resuspende cuidadosamente por agitación sobre hielo en 100 ml de una solución CaCl_2 0,1 M previamente enfriada en hielo.
6. Se vuelven a repetir los pasos de centrifugación y el sedimento se resuspende en la solución 0,1 M de CaCl_2 reduciendo el volumen primero a 50 ml y después a 20 ml.

7. Por último, el sedimento se resuspende en 1ml de una solución que contiene 0,1 M de CaCl_2 y 40% de glicerol.
8. Finalmente las células se distribuyen en alícuotas de 100 μl en microtubos Eppendorf enfriados en hielo y se congelan en un baño de hielo seco-etanol. Se almacenan a -80°C hasta su uso.

III.11.2.2. Transformación de células competentes por choque térmico

Este procedimiento de transformación es el más habitual y fue descrito por Hanahan (1983).

Protocolo

1. Se extrae un vial de células competentes congeladas a -80°C y se colocan en hielo para su descongelación lenta.
2. Una vez descongeladas las células se les añade el ADN a transformar y se mantienen 30 minutos en hielo.
3. A continuación se procede al "choque térmico" de 1 minuto a 42°C , seguido de 2 minutos en hielo.
4. Tras el choque térmico se añade 1 ml de medio JLB y la mezcla se incuba a 37°C con agitación durante una hora.
5. Transcurrido este tiempo se siembran alícuotas de 20, 50, 100 y 300 μl , en placas de LB adicionadas con el correspondiente antibiótico. En caso de ligaciones con plásmidos como pBluescript o pBC, los cuales manifiestan la presencia de insertos en sus sitios de clonación por supresión de la α -complementación con el gen *lacZ*, se añaden 40 μl del inductor IPTG a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y 20 μl del sustrato cromogénico X-Gal a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$.
6. Las placas se mantienen abiertas unos minutos en la cabina de flujo laminar y posteriormente se incuban durante 12-16 horas a 37°C (Figura 36).

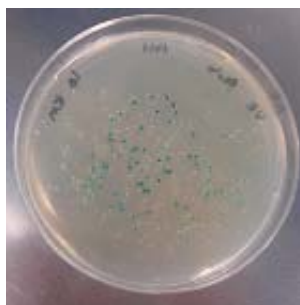


Figura 36. Placa con colonias procedentes de una transformación en *E. coli*

III.11.2.3. Preparación de células electrocompetentes

La preparación de células electrocompetentes se llevó a cabo de manera similar a la descrita en el apartado anterior en cuanto a normas de limpieza y frío. En este caso es especialmente importante eliminar las sales del proceso con el fin de reducir la conductividad de la suspensión celular.

Protocolo

1. A partir de un vial congelado de la cepa de *E. coli* deseada se siembran placas de medio LB y se incuban 12 horas a 37°C a fin de obtener colonias aisladas.
2. Con una de estas colonias se inocula un tubo con 5 ml medio de LB líquido con el correspondiente antibiótico y se incuba durante toda la noche a 37°C .
3. Se inoculan matraces de 1.000 ml que contienen 100 ml de medio LB con 200 μl del cultivo y se incuban a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} comprendida entre 0,4 y 0,6.
4. Inmediatamente se introducen en hielo durante 30 minutos.

-
5. El cultivo se transfiere a tubos de centrifuga previamente enfriados y las células se separan mediante centrifugación a 8.000 g durante 10 minutos a 4°C (Centrifuga Sorvall Evolution RC).
 6. El medio de cultivo se decanta y el sedimento se resuspende en 200 ml de agua fría estéril.
 7. Se repite el proceso de centrifugación en las mismas condiciones, así como el lavado con agua, esta vez con la mitad de volumen.
 8. Nuevamente sedimentadas, las células se resuspenden en 20 ml de glicerol al 10% y se transfirieren a un tubo de centrifuga SS34 para ser sometidas a una última centrifugación.
 9. Las células precipitadas se resuspenden en 1 ml de glicerol al 10% y se distribuyen en alícuotas de 40 µl en microtubos Eppendorf mantenidos en un baño de hielo seco-etanol y se congelan a -80 °C hasta su uso.
-

III.11.2.4. Electrotransformación de *E. coli*

Protocolo

-
1. Previamente a la electroporación las cubetas de electrotransformación y el soporte de nailon del electroporador se enfrían en hielo.
 2. El electroporador (Gene Pulser, BioRad) se ajusta a las condiciones estándar para electrotransformación de *E. coli* en cubetas de 0,1 cm: 25 mF, 260 W y 1,25 kV.
 3. Una vez descongeladas las células en hielo se añade el ADN susceptible de ser transformado y se mantiene 30 minutos en hielo.
 4. La mezcla se transfiere a la cubeta de electroporación y esta se coloca en la cámara de electroporación mediante el soporte de nailon.
 5. Tras someterla a un pulso eléctrico se añade rápidamente 1 ml de medio JLB y las células se resuspenden con suavidad.
 6. El conjunto se transfiere a un tubo de plástico estéril y se incuba durante 1 hora a 37°C y 225 g.
 7. Transcurrido este tiempo se siembra en placas de medio LB como se describe en el procedimiento de transformación de células competentes por choque térmico.
-

III.12. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DEL ADN

III.12.1. Extracción de ADN plasmídico

Para la purificación de plásmidos a gran escala (cultivos de más de 50 ml) se empleó el sistema Plasmid Midi Kit (Quiagen).

Cuando se requirió obtener plásmidos muy puros se uso el kit comercial Wizard Plus SV Minipep (Promega).

Para el análisis rutinario de plásmidos se usó, según el caso, el método de Minipreps o de Lisis alcalina que se describe a continuación.

III.12.1.1. Minipreps

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el método descrito por Holmes y Quigley (1981), que permite extraer el ADN plasmídico de un gran número de colonias en poco tiempo.

Protocolo

1. Se toma una colonia con un palillo estéril y se siembra en la placa de referencia, inoculando con el mismo palillo un tubo Eppendorf que contiene 1,2 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente. Este proceso se repite con todas las colonias que se quieren analizar y se incuban a 37°C en agitación durante 10-15 horas.
2. Una vez crecido, el cultivo se centrifuga a temperatura ambiente a 7000 g durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se añaden al tubo 200 µl de una mezcla compuesta por 10 ml de solución de lisis y 750 µl de lisozima (10 mg/ml).
3. Resuspendemos las células en la solución de lisis con la ayuda de un agitador (Mylab) durante 30 segundos.
4. El conjunto de tubos se hierve durante 40 segundos y se centrifuga 5 minutos a 12.000 g a temperatura ambiente.
5. Eliminamos el sedimento mucoso con un palillo estéril.
6. A cada tubo se añaden 20 µl de acetato sódico 3 M y se precipita el ADN con 250 µl de isopropanol.
7. La mezcla se incuba a -20 °C durante 15 minutos y se centrifuga 20 minutos a 12.000 g y 4°C.
8. El precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente, se seca al vacío y se resuspende finalmente en 30 µl de tampón TE.

► **Solución de lisis:** Sacarosa 1 M (ó 34,2%), 23,39 ml; Tritón X-100, 0,5 ml; EDTA pH 8,0, 0,5 M, 10,0 ml; trisHCl 1M, pH 8,0, 1 ml; agua destilada, csp 100 ml. Esta solución puede guardarse a 4°C hasta su uso.

► **TE:** TrisHCl 10 mM, pH 9; EDTA 1 mM pH 8.

III.12.1.2. Lisis alcalina

Se ha utilizado un método ligeramente modificado de Sambrook y Russell (2001).

Protocolo

1. A partir de una colonia de *E. coli* portadora del plásmido deseado se siembran 30 ml de medio LB al que previamente se ha añadido el antibiótico al que el plásmido confiere resistencia. Se incuba durante 15-20 horas a 37°C y 250 g.
2. El cultivo se centrifuga durante 5 minutos a 10.000 g en un rotor SS34 a 4°C (Sorvall Evolution RC) y el precipitado se resuspende en 5 ml de Solución I.
3. La mezcla se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añaden 10 ml de la Solución II recién preparada.
5. Se mezclan los contenidos invirtiendo el tubo varias veces y se incuba 10 minutos en hielo.
6. Se añaden 7,5 ml de la Solución III fría (mantenida previamente en hielo durante 15 minutos).
7. Se mezclan los contenidos invirtiendo el tubo más bruscamente que en el paso anterior y se incuba 10 minutos en hielo.
8. Centrifugamos la mezcla durante 30 minutos a 14.000 g y 4°C.
9. Seguidamente se recoge el sobrenadante (18 ml) y se transfiere a un tubo Corex de 30 ml.
10. Se añaden 0,6 volúmenes de isopropanol, se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga durante otros 15 minutos a 8.000 g y a temperatura ambiente.

11. El precipitado obtenido se lava con 10 ml de etanol al 70% y se centrifuga a 8.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se seca al vacío y se resuspende en 2 ml de TE.
12. El ADN plasmídico resuspendido en tampón TE se trata con ARNasa (concentración final 40 µg/ml) durante 30 minutos a 37°C.
13. Seguidamente se extrae en tubos Eppendorf con fenol neutro, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se precipita con dos volúmenes de etanol a -20 °C y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M.
14. Se mantiene durante 30 minutos a 4°C y seguidamente se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 14.000 g.
15. El precipitado obtenido se lava con 2 ml de etanol al 70%, se seca al vacío y se resuspende en 700 µl de tampón TE.

► **So**

Agua destilada, csp 100 ml. La solución I (sin lisozima) puede mantenerse almacenada a 4°C. En e o

► **Solució**

SDS 20%, 4,0 ml; agua destilada, 74,40 ml.

► **Solución III:** Acetato potásico 5M, 60 ml; ácido acético glacial, 11,5 ml; agua destilada 28,5 ml.

Cuando se requería una extracción rápida utilizando el método de lisis alcalina se usó el siguiente protocolo:

Protocolo

1. Inoculamos 5 ml de medio LB adicionado del antibiótico correspondiente con el microorganismo y se incuba durante toda la noche a 37°C en agitación.
2. Una vez crecido el cultivo para precipitar las células se centrifuga a 10.000 g durante 5 minutos.
3. Tiramos el sobrenadante y resuspendemos el sedimento en 100 µl de medio LB con ayuda de un agitador (Mylab) y lo transferimos a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
4. Se añaden 300 µl de Solución TENS y se mezcla con ayuda del agitador.
5. Añadimos 150 µl de acetato sódico 3M y se vuelve a utilizar el agitador.
6. Centrifugamos 10 minutos a 13.000 g. Se observa un sedimento blanco y recogemos el sobrenadante limpio que lo transferimos a un tubo Eppendorf nuevo.
7. Añadimos 900 µl de etanol absoluto, volvemos a mezclar con ayuda del agitador, centrifugamos 3 minutos y tiramos el sobrenadante.
8. Adicionamos 1 ml de etanol al 70%, centrifugamos 3 minutos y tiramos el sobrenadante.
9. Secamos el sedimento y resuspendemos en 50 µl de tampón TE o agua destilada.

► **So ó**

0 µl.

III.12.2. Extracción de ADN genómico

Cuando se requería un ADN muy puro se usó el kit comercial "Aqua pure Genomic DNA isolation kit" (Biorad). Para la extracción de ADN para fines analíticos se usó el método del CTAB y para las hibridaciones ADN-ADN se usó el Método de Marmur (1961).

III.12.2.1. Método del CTAB

La extracción y purificación de ADN genómico se realizó siguiendo el método descrito por Ausubel y colaboradores (1989) para la preparación de ADN genómico. Este método se basa en el uso del detergente CTAB (bromuro de cetil trimetilamonio), que en condiciones de elevada salinidad reacciona con los ácidos nucleicos formando complejos estables y solubles. Posteriormente, el CTAB se elimina con facilidad aprovechando su solubilidad en disolventes orgánicos.

Protocolo

1. Se parte de 50 ml de un cultivo incubado a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria.
2. Este volumen se centrifuga durante 15 minutos a 10.000 g resuspendiéndose el precipitado en 4,75 ml de tampón TE y se adiciona 250 µl de solución SDS al 10%, 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 30 µl de ARNasa (10 mg/ml).
3. Dicha mezcla se mantiene a 37°C durante 1 hora hasta que el lisado adquiere una consistencia semitransparente.
4. Posteriormente, se añaden 0,9 ml de NaCl 5 M y se mezcla por inversión.
5. A continuación, se añaden 0,75 ml de CTAB/NaCl y se mezcla, manteniendo dicha mezcla a 65°C durante 20 minutos.
6. Transcurrido ese tiempo, se trata dos veces con igual volumen de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez más, con un volumen de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
7. Por último, se precipita el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol durante al menos 20 minutos a -70 °C.
8. El precipitado se lava con etanol al 70%, se deseca al vacío y se resuspende en 1 ml de tampón TE o agua destilada estéril.

▶Tampó	CI 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0.
▶SD	0
▶Pr	n
▶AR	C.
▶CT	N

III.12.2.2. Método de Marmur



Figura 37. Extracción de ADN genómico

Para extraer el ADN genómico en grandes cantidades se utilizó el método descrito por Marmur (1961) (Figura 37).

El volumen inicial de cultivo de partida se estimó empíricamente debido a que la cantidad de ADN extraído varía en función de la cepa (generalmente se parte de 1 litro de cultivo).

Protocolo

1. Se parte del volumen estimado de cultivo hasta alcanzar la fase estacionaria.
2. Este volumen se centrifuga durante 10 minutos a 10.000 g para precipitar las células.
3. Se resuspenden las células en 50 ml de SW10, se vuelven a centrifugar y se resuspenden en 100 ml EDTA salino.
4. Las células se lisan de la siguiente manera:
 - a) Se añaden 10 mg de lisozima.
 - b) Se incuba 30 minutos a 37°C.
 - c) Se añaden 10 ml de SDS al 25% en agua destilada.
 - d) Se incuba en baño maría a 60°C durante 10 minutos.
 - e) Se añaden 20 ml de NaClO₄ 5M .
5. Se procede a la desproteización:
 - a) Se añade el mismo volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se introduce en una pera de vidrio.
 - b) Se agita con fuerza, con cuidado de que no salte el tapón, para mezclar las fases.
 - c) Se deja reposar a temperatura ambiente al menos 30 minutos para que se separen las fases.
 - d) Se centrifuga a 10.000 g durante 15 minutos.
 - e) El sobrenadante se extrae y se coloca en un recipiente limpio.

La desproteización se repite tantas veces como sea necesario hasta obtener un sobrenadante claro.

6. A continuación se realiza la precipitación del ADN:
 - a) El sobrenadante obtenido en la serie de desproteizaciones se coloca en un vaso de precipitado de plástico.
 - b) Se añade el doble de volumen de alcohol 96° frío, dejándolo deslizar por las paredes.
 - c) Las fibras de ADN se extraen enrollándolas en una varilla de vidrio fina.
 - d) El ADN de la varilla se lava introduciéndola en un tubo con alcohol 96°.
 - e) El ADN se disuelve en un tubo que contenga 10 ml de 0,1 SSC.
7. Tratamiento con ARNasa:
 - a) Se añade 0,25 ml de una Solución de ARNasa.
 - b) Se calienta en baño maría a 37°C durante 30 minutos.

Se vuelven a realizar los pasos correspondientes a los apartados 6 y 7.

8. El ADN final disuelto en 0,1 SSC se conserva a -80 °C.

▶**EDTA salino:** EDTA, 33,62 g; NaCl, 8,7 g; KOH, 6 g; agua destilada, csp 1.000 ml. El pH de la solución se ajustó a 8,0.

▶**NaClO₄ 5M :** NaClO₄, 702,3 g; agua destilada, csp 1.000 ml.

▶**20XSSC:** NaCl, 175,3 g; C₆H₅Na₃O₇, 88,2 g; agua destilada, csp 1.000 ml.

III.12.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Esta técnica se utilizó para la separación de fragmentos de ADN en base a su tamaño, con el fin bien de analizar patrones de restricción obtenidos con diferentes enzimas o con el objetivo de purificar algún fragmento concreto o simplemente para la comprobación de la extracción de plásmidos o ADN total.

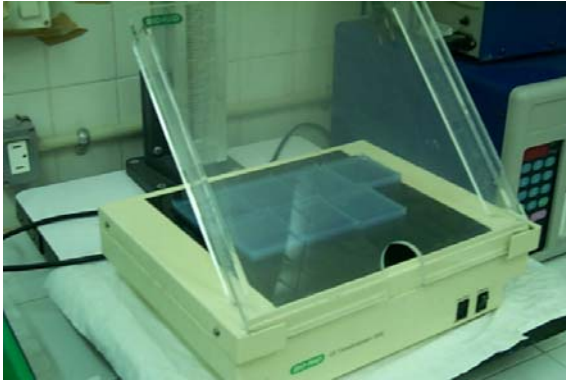


Figura 38. Transiluminador y geles de agarosa

La migración de las moléculas a través de la matriz del gel es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, de manera que es posible separar dichas moléculas en función de su tamaño molecular. La conformación en la que se encuentra la molécula es otro de los factores que determina su nivel de migración: las moléculas de ADN que se encuentran en forma circular covalentemente cerrada ofrecen menos

resistencia a la migración que aquellas que se encuentran en forma lineal.

La electroforesis del ADN se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa (Seakem, FMC), cuya concentración varió entre un 0,6 y un 2%, sumergidos en tampón TAE 1X y preparados en el mismo tampón. La concentración de agarosa utilizada en cada caso dependió del tamaño de los fragmentos a separar, utilizándose concentraciones elevadas para fragmentos de ADN de tamaño pequeño y concentraciones más bajas para fragmentos de ADN de tamaño más grande.

La visualización del ADN se realizó mediante tinción con bromuro de etidio, que se intercala en la doble cadena de ADN y permite su visualización tras exponerse el gel a luz ultravioleta a 360 nm como describe el manual de Sambrook y Russell (2001) (Figura 38).

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon mediante la curva peso molecular-movilidad, obtenida según las distancias de migración de los fragmentos *Hind*III del ADN del estándar λ cl857 Sam7 (Roche). En otros casos, se utilizó el ADN Ladder de 1 kb (Invitrogen) (Figura 39).

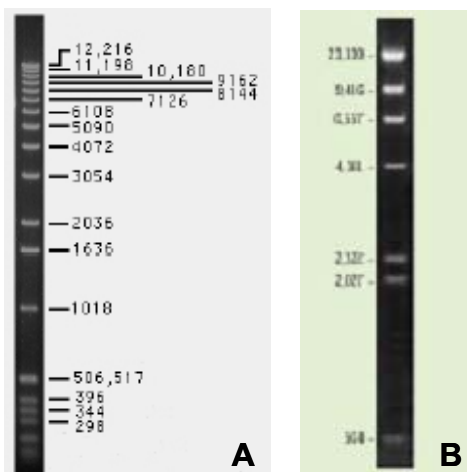


Figura 39. Marcadores de pesos moleculares. A. 1 kb DNA ladder; B. λ *Hind*III

Preparación del gel

1. La cantidad de agarosa necesaria se añade al tampón de electroforesis TAE 1x y la mezcla se calienta en el microondas hasta su total disolución.
2. Una vez enfriado a una temperatura en torno a 50°C, se vuelca sobre el molde de la cubeta de electroforesis ensamblada (BioRad) y se colocan los peines que constituyen los pocillos sobre los que se cargará la muestra. El gel solidifica a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.
3. Una vez solidificado el gel se retiran los peines y se coloca en la cubeta de electroforesis con el mismo tampón TAE 1x teniendo la precaución de recubrir totalmente la superficie (Figura 40).
4. Las muestras de ADN se preparan añadiendo 1/10 de su volumen final de Tampón de carga 10x.
5. Las muestras de ADN se cargan en los pocillos formados en el gel y se aplica una diferencia de potencial de entre 1 y 5 v/cm.
6. En general la electroforesis se considera finalizada cuando el colorante xilén-cianol del Tampón de carga se encuentra a una distancia del final del gel similar a la recorrida por el azul de bromofenol de los pocillos.
7. La tinción del ADN se realiza con una Solución de bromuro de etidio (EtBr) a una concentración final de 0,5 µg/ml, sumergiendo el gel durante 10 minutos en dicha solución (también se puede añadir el EtBr a la misma concentración en la preparación del gel).
8. Los geles se fotografían sobre un transiluminador de luz ultravioleta con una longitud de onda de 360 nm con cámara digital Kodak CD290 asociada al programa Kodak 1D 3.5, imprimiéndose la fotografía en una impresora térmica Sony Digital UP-D895.

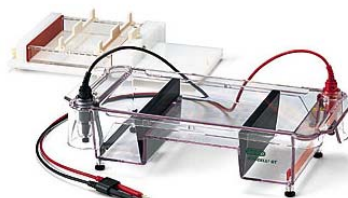


Figura 40. Sistema de electroforesis

- ▶ **Tampón TAE 50x:** Ácido acético glacial, 57,1 ml; EDTA 50 mM pH 8, 100 ml; tris base, 242 g; agua destilada, csp 1.000 ml.
- ▶ **Tampón de carga:** Azul de bromofenol 0,25% (p/v); sacarosa 40% (p/v); xilén-cianol 0,25% (p/v). Este tampón se conserva a 4°C.
- ▶ **Solución de bromuro de etidio:** Bromuro de etidio 10 mg/ml en agua y conservación a 4°C. Para un litro de agua se requieren 50µl de esta solución.

III.12.4. Determinación de la concentración del ADN

Las preparaciones de ADN se cuantificaron por comparación visual de la intensidad luminosa de las bandas de ADN tras la separación electroforética (teñidas con bromuro de etidio y bajo la luz UV de un transiluminador) con el patrón de concentración conocida.

Cuando se requirió determinar con mayor precisión la concentración de las muestras del ADN, se realizó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (1 unidad de A_{260} corresponde a una concentración de ADN de 50 µg/ml), utilizando un espectrofotómetro Lambda 20 UV/Vis (Perkin Elmer). En ambos casos se siguió la metodología descrita por Sambrook y Russell (2001).

Para determinar la pureza del ADN se calculó la relación de absorbancias del ADN a 260 nm y 280 nm, que debe estar comprendida entre 1,8 y 2,1 y la correspondiente a 260 y 230 nm, que debe ser al menos de 2,2 para considerarse satisfactoria (Marmur, 1961).

III.12.5. Manipulación enzimática del ADN

III.12.5.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN se llevó a cabo en las concentraciones óptimas para cada enzima de restricción, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón recomendadas por los fabricantes (Amersham Biosciences, New England Biolabs, Roche MIB Fermentas).

El volumen de la reacción y la cantidad de ADN digerido varió en función de las necesidades de cada ensayo. Así, la preparación de vectores para subclonación se realizó con 1-5 µg de ADN en un volumen de reacción de 50 a 100 µl. Las digestiones para recuperar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se llevaron a cabo con 5-20 µg en 100-200 µl de reacción.

El tampón de digestión, suministrado generalmente con la endonucleasa de restricción por las casas comerciales, a una concentración 10x proporciona la concentración de sales y el pH adecuado para el funcionamiento óptimo de la enzima. Este tampón se usa a una concentración final de 1x.

La enzima de restricción se añadió en un volumen nunca superior a 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, para evitar la inhibición de su actividad enzimática debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas. Se completó con agua destilada estéril hasta el volumen final de reacción calculado previamente.

La temperatura de incubación varió dependiendo de las endonucleasas de restricción utilizadas, la mayoría de las cuales son activas a 37°C. El tiempo de incubación depende de la cantidad de ADN digerido así como de la estabilidad de la enzima, pero como norma general, las digestiones de plásmidos se incubaron durante 3 horas y las de ADN genómico durante toda la noche.

Las reacciones se llevaron a cabo según el siguiente esquema general:

ADN	1 a 20 µg
Tampón de digestión (10X)	1x del volumen final
Enzima de restricción	1 U/µg
Agua	Completar el volumen final

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón, o bien se utilizó el tampón universal KGB a la concentración recomendada (McClelland y col., 1988) o el tampón OPA+ (One-Phor-All Buffer PLUS) suministrado por Amersham Biosciences a las concentraciones indicadas por el fabricante. Cuando no fue posible, se llevó a cabo la digestión con una enzima, que se eliminó según se detalla en el apartado III.12.6, y se precipitó el ADN, resuspendiéndolo

en el tampón adecuado para la segunda enzima y llevando a cabo la digestión con esta última.

III.12.5.2. Desfosforilación de los extremos 5'

La desfosforilación se llevó a cabo con los vectores preparados para subclonación con la finalidad de evitar su recircularización en las reacciones de ligación. La fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) utilizada para este proceso elimina los grupos fosfato de los extremos 5' del ADN, impidiendo así la formación de un enlace entre ellos.

La reacción de desfosforilación se realizó a partir de una preparación de vector digerido con una enzima de restricción, extraída y precipitada para eliminar las sales del tampón de digestión que pudieran interferir en la reacción (apartado III.12.6). El ADN se disolvió en 45 μ l de agua estéril y se añadieron 5 μ l del tampón de desfosforilación 10x suministrado por el proveedor de la enzima (Roche). La mezcla se calentó durante 5 minutos a 65°C para asegurar una buena disolución del ADN y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Seguidamente se añadió 1 unidad de CIAP y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se repitió el proceso de calentamiento y se añadió otra unidad de fosfatasa alcalina, incubándose de nuevo otros 30 minutos a 37°C. Una vez concluida la desfosforilación el ADN se extrajo tal y como se describe en el apartado III.12.6.

III.12.5.3. Ligación de los fragmentos de restricción

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando unas relaciones molares vector: inserto variables dependiendo de la naturaleza de los fragmentos a unir. Así, en ligaciones en las que los extremos del vector y del fragmento de ADN eran cohesivos se mantuvo una relación molar, vector: inserto de 1:2. Si estos extremos eran romos se utilizó la relación 1: 5, mientras que cuando el vector poseía extremos incompatibles entre si, pero compatibles con los extremos del inserto (ligación direccional) la reacción se mantuvo 1:1. La reacción de ligación se preparó añadiendo en primer lugar las cantidades de vector e inserto adecuadas en cada caso. Se calentó a 42°C durante 10 minutos para permitir que las moléculas se relajasen en su estructura y posteriormente se añadió el resto de los componentes: tampón de reacción 10x (concentración final 1x), 1 μ l (5U) de la enzima T4 DNA ligasa (Promega) y agua destilada estéril según el volumen final (de 10 a 20 μ l) de reacción. La mezcla de reacción se incubó a distintas temperaturas dependiendo de si los fragmentos a ligar eran romos o cohesivos. Así, se incubó a 22°C durante 3 horas ó a 4°C durante toda la noche si los extremos eran cohesivos y a 16°C toda la noche cuando queríamos ligar extremos romos (en este caso añadíamos el doble de T4 DNA ligasa). A continuación, la mezcla se incubó 15 minutos a 65°C para inactivar la ligasa, utilizándose esta mezcla de reacción directamente en la transformación.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo según el siguiente esquema general:

ADN inserto/vector	1:2, cohesivos; 1:5, romos; 1:1, direccional
Ligasa	5 U (cohesivo y direccional) 10 U (romos)
Tampón ligasa 10x	1x del volumen final
Agua	Completar el volumen final

III.12.6. Purificación de ADN

Es recomendable eliminar las enzimas de restricción y tampones tras su actuación, para lo cual se siguió el procedimiento de extracción descrito en el manual de Sambroock y Russell (2001).

Protocolo

1. En primer lugar el volumen de la muestra de ADN (genómico o plasmídico) se ajusta a 200 μ l con tampón TE.
2. Se añade 1 volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agita con ayuda de un agitador y se centrifuga a 12.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Con cuidado se recoge la fase acuosa (superior) y se trasvasa a un tubo Eppendorf limpio.
4. Se añade 1 volumen de cloroformo y repetimos la agitación y centrifugación recogiendo la fase acuosa.
5. Para precipitar el ADN se añaden tres volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato potásico 3 M.
6. La solución de ADN se mantiene 20 minutos a -20°C y seguidamente centrifugamos a 12.000 g y a 4°C durante 20 minutos.
7. El sedimento se lava con etanol al 70% y finalmente se deseca al vacío y se resuspende en el volumen adecuado de agua destilada estéril.

Cuando fue precisa una mayor purificación se utilizó el kit Wizard Clean up (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.12.7. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Una vez separados los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, las bandas elegidas se cortaron con una cuchilla y el ADN se recuperó utilizando los kits Gene Clean (BIO 101) o Qiaex (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

III.12.8. Reacción de amplificación de ADN mediante PCR

Esta técnica proporciona un método muy simple para la amplificación de ácidos nucleicos (Saiki y col., 1985; 1988; Mullis y Faloona, 1987). Se basa en el proceso natural de la replicación del ADN y, como en él, el número de moléculas de ADN formadas aumenta exponencialmente. Partiendo de una molécula de "ADN diana" podemos

amplificar una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de cebadores diseñados al efecto. Los cebadores utilizados son un par de oligonucleótidos sintéticos capaces de unirse a secuencias de ADN que limitan con la región que se pretende amplificar. Cada uno de ellos es réplica de una de las dos cadenas del ADN y se diseñan de manera que queden enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de "ADN diana". La distancia entre ellos en el conjunto ADN-cebadores determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

Para la amplificación de fragmentos de ADN se empleó este método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo las indicaciones de Sambrook y Russell (2001) y utilizando un termociclador modelo 9700 (Perkin Elmer).

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 50 μ l utilizando tubos Eppendorf de 0,2 ml previamente esterilizados para eliminar posibles nucleasas presentes en los mismos; asimismo todo el material se manipuló con guantes de latex y en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. En general, aunque las condiciones se han variado según el caso, la reacción de amplificación contenía: ADN molde, 1 pg a 1 μ g; tampón Taq ADN polimerasa 1X; $MgCl_2$, 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM de cada uno; cebadores 1 μ M; agua destilada estéril csp 50 μ l y 1-5 U de enzima Taq ADN polimerasa (Promega) ó Pfu ADN polimerasa (Stratagene). La enzima Taq ADN polimerasa es una enzima modificada de *Thermus aquaticus* (Saiki y col., 1989) y se utilizó en las reacciones convencionales de PCR. Cuando se requirió una amplificación absolutamente fiable y exacta se utilizó la ADN polimerasa clonada de *Pyrococcus furiosus*, Pfu ADN polimerasa (Hogrefe y col., 2002).

Los cebadores se diseñaron según la secuencia que se quería amplificar (Tabla 18). En los casos en los que se pretendía introducir un punto de corte para una determinada enzima de restricción, se modificaron las bases necesarias en el cebador para formar la secuencia de reconocimiento de la enzima.

Los parámetros de la reacción de PCR se optimizaron en cuanto a la temperatura de hibridación de los cebadores y el tiempo de elongación, dependiendo de los valores de las Temperaturas medias de desnaturalización (T_m) de los cebadores (ajustándose 5°C por debajo del cebador con T_m más baja) y del tamaño de los fragmentos a amplificar. En general, las reacciones de amplificación se iniciaron con una desnaturalización durante 2 minutos a 94°C ó 98°C, tras la cual se aplicaron 30 ciclos constituidos por las tres etapas correspondientes: desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión, cuya duración y temperatura se modificó según el caso. Los distintas condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones de PCR en el presente trabajo se detallan en la Tabla 19. Finalmente, se añadió un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos con el fin de permitir la elongación de los productos de la reacción. De cada reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa una alícuota para comprobar que la amplificación se

produjo correctamente. Posteriormente, el ADN amplificado se purificó mediante el kit Wizard PCR (Promega).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo según el siguiente esquema general, con diversas modificaciones según los casos:

Tampón 10x	5,0 µl
dNTPs (10 mM)	4,0 µl
Cebador 1 (20 pmol/µl)	0,5 µl
Cebador 2 (20 pmol/µl)	0,5 µl
Taq ADN polimerasa	1,25 U
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
ADN (20 ng/µl)	2,0 µl
Agua estéril	35,25 µl
Volumen total	50 µl

Tabla 18. Cebadores utilizados para la amplificación del ADN mediante PCR

Cebador	Secuencia (5'-- 3')	Utilización
	GCWGATGCWACNGGTCCWGGY	Amplificación de parte del gen <i>cp1</i> . Obtenido a partir de la secuencia N-terminal de CP1 (Sonda CPA)
Aminoproll	GGYCCWGGYGGYAAAYCAAAR	Obtenido a partir de la secuencia N-
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Amplificación del gen ARNr16S de CP76
16R1488	CGGTACCTTGTTAGGACTTCACC	Amplificación del gen ARNr16S de CP76
ProL	AAYGGYGCNTAYTCRCCNYTKAA	Amplificación de parte del gen <i>cp1</i> (Sonda CPA)
ProR	CCNGNATRTCHGARAANGCTTC	Amplificación de parte del gen <i>cp1</i> (Sonda CPA)
CP1E	CGGGAGAATTC AATGAATAAAC	Amplificación del gen <i>cp1</i> completo. Genera sitio <i>EcoRI</i> (GAATTC) en el extremo 5'
CP1X	GAGAATCTCGAGGTCTGCTTG	Amplificación del gen <i>cp1</i> completo. Genera sitio <i>XhoI</i> (CTCGAG) en el extremo 3'
CPB1	GGTTGAGTCTGGCCTTAGCGC	Sonda CPB
CPB2	CCGCTAGTAAGAGGCTGC	Sonda CPB
CP2H	CAAGCTTATGAAATATTCTTAC	Amplificación del gen <i>cp2</i> completo. Genera sitio <i>HindIII</i> (AAGCTT) en el extremo 5'
CP2X	TTTACTCGAGATTGGCGGTG	Amplificación del gen <i>cp2</i> completo. Genera sitio <i>XhoI</i> (CTCGAG) en el extremo 3'
WmpDL	GTCGCTGATGAGCGTACCAAT	Amplificación de parte del gen <i>wmpD</i>
WmpDR	TGATACTTCTTGCTCAAT	Amplificación de parte del gen <i>wmpD</i>
PDT1	TGGTTAAGGTATTACAGGGG	Sonda PDT
PDT2	GTAAACTGCAACATGCCTC	Sonda PDT

Cebador	Secuencia (5'-- 3')	Utilización
PDD1	GAATCAATGGCTTAGCTATGG	Sonda PDD
PDD2	GCGGTGTTACTTTAAGCTTC	Sonda PDD
PDF	CGCATCTATTACCGTGAACC	Amplificación de gen <i>wmpD</i> completo
PDR	CTACCAATAGCACTTGAAG	Amplificación de gen <i>wmpD</i> completo

Y (CT); N (ACGT); R (AG); K (GT); W (AT)

En color rojo se indican los nucleótidos que corresponden a la secuencia de reconocimiento de las endonucleasas de restricción

En la Tabla 19 se muestran los distintos programas utilizados en las diversas PCR realizadas en este trabajo.

Tabla 19. Condiciones de las reacciones cíclicas de PCR

Reacción	aturalización	H acción	Extensión
ARNr 16S	45 seg, 94°C	1', 48°C	1'30", 72°C
Amplificación a partir del extremo N-terminal de CP1	2 min, 92°C	1'30", 45°C	
Amplificación de <i>cp1</i> introduciendo	2 min, 92°C	1'3	2'30", 72°C
Amplificación de la sonda CPB	2 min, 92°C	1'3	2'30", 72°C
Amplificación de <i>cp2</i> introduciendo los sitios de cort	2 min, 92°C	1'3	2'30", 72°C
Amplificación de la zona conservada	2 min, 92°C	1'3	2', 72°C
Amplificación de	2 min, 92°C	1,3	2', 72°C
Amplificación de	2 min, 92°C	1,3	2', 72°C
Amplificación del gen <i>wmpD</i>	2 min, 92°C	1'3	2'30", 72°C

Gracias a la propiedad de la *Taq* ADN polimerasa de añadir una desoxiadenosina al final de la síntesis, los productos de PCR obtenidos se subclonaron en el vector PCR 2.1 linealizado (Invitrogen), que presenta una desoxitimidina desapareada en su extremo 3', siguiendo las instrucciones del fabricante. Si la amplificación se lleva a cabo utilizando la polimerasa *Pfu* DNA, se ligaron a extremos romos en el vector pBlueScript previamente digerido con *EcoRV* (genera extremos romos).

III.12.9. Reacción de amplificación de ADN mediante PCR inversa

La amplificación por PCR convencional tiene una limitación ya que requiere el uso de dos cebadores que flanqueen y definan la región que será amplificada. Por ello no es posible la amplificación de regiones de secuencia desconocida. Sin embargo, la estrategia

denominada PCR inversa permite soslayar esta limitación y amplificar secuencias desconocidas de ADN que estén próximas a otra conocida.

Esta técnica se realizó en varias etapas:

En primer lugar, se diseñó una sonda de unas 200-300 pb correspondiente a una región próxima al extremo de la secuencia conocida y posteriormente se marcó con digoxigenina, según la metodología descrita en el apartado III.13.1.

Se realizaron digestiones del ADN genómico con enzimas de restricción que no presentaban regiones dianas en la región que constituía la sonda, pero sí en una zona cercana dentro de la secuencia conocida. Los fragmentos generados se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a una membrana de nailon mediante Southern blot según se describe en el apartado III.13.2.

Seguidamente se procedió a la hibridación con la sonda marcada y al revelado de la membrana. Se seleccionaron aquellas enzimas que generaron fragmentos de un tamaño adecuado para su posterior amplificación y clonaje (1-4 kb).

Una vez seleccionada la enzima de restricción, la mezcla de fragmentos se dializó en agua destilada durante 10 minutos con filtros de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,025 μm y 13 mm de diámetro (Millipore). Seguidamente se realizaron diversas diluciones de la mezcla de fragmentos de restricción (1:10; 1:20; 1:40; 1:50; 1:100) y se llevaron a cabo reacciones de ligación utilizando 4 μl de cada una de las diluciones, según las condiciones descritas en el apartado III.12.5.3. De esta forma, se realizó el ligado intramolecular de los fragmentos de restricción para formar moléculas circulares.

Antes de realizar la reacción de PCR, el ADN circular se dializó de nuevo durante 10 minutos en agua destilada estéril en filtros de nitrocelulosa (Millipore).

A continuación, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como ADN molde la mezcla de fragmentos religados. Los cebadores utilizados (Tabla 18) se diseñaron en sentido divergente, es decir, a partir de la región de secuencia conocida pero orientados hacia el exterior de la misma (Figura 41). La longitud de cada cebador fue de 28 pb y con un alto contenido en G+C para que la T_m fuera elevada (superior a 72°C).

Los componentes de la reacción de PCR fueron los siguientes:

ADN molde	1-10 ng
Cebadores	30 pmoles
Tampón ADN polimerasa	5 μl
dNTPs	0,2 mM de cada uno
ADN polimerasa <i>Pfu</i> Turbo	1-2,5 U
Agua destilada	csp 50 μl

Los parámetros de los ciclos de la reacción de PCR se optimizaron en cuanto a temperatura de hibridación de los cebadores y tiempo de elongación dependiendo del tamaño de los fragmentos. En general, tras un primer calentamiento a 98°C durante 2 minutos, se aplicaron 30 ciclos constituidos por tres etapas: desnaturalización a 98°C, 30 segundos; hibridación de los cebadores a 72°C, 30 segundos; y extensión a 72°C, 3 minutos y 30 segundos y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos. El resultado de la PCR se visualizó en electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (p/v).

De la mezcla de fragmentos circulares, la ADN polimerasa amplificó específicamente un fragmento lineal con origen y final en dicha zona e incluyendo las secuencias que la flanqueaban, en el ADN original. En la unión entre estas últimas, apareció el lugar de restricción para la enzima previamente utilizada en la digestión del ADN (Figura 41).

Por último se procedió a clonar el fragmento amplificado. Cuando se produjo una reacción inespecífica en la que aparecía una mezcla de fragmentos de diferentes tamaños, se extrajo del gel el fragmento de tamaño esperado según se describe en el apartado III.12.7. Los fragmentos amplificados con *Pfu*Turbo se clonaron en el vector pBC KS(+) digerido con *EcoRV* que genera extremos romos.

Una vez clonado, el fragmento se secuenció utilizando tanto cebadores universales de clonación y cebadores diseñados a partir de la secuencia (MWG).

En la Tabla 20 se muestran los cebadores utilizados en la técnica de PCR inversa en este trabajo.

Tabla 20. Cebadores utilizados para realizar la amplificación de ADN mediante PCR inversa

Cebador	Secuencia (5' --)3')	Bases	Tm(°C)	Fragmento amplificado
CP1inv1	CTGCACACGAAGTCAGCCACGGCTTTAC	28	69,5	-
CP1inv2	GATGACCTTCGGTGACGGCGCCACAACC	28	72,4	Fragmentos <i>DraI</i> de 3,8 kb y
CP1inv3	GCAGGTAAAGCTGTACGCTGTTGAGCCG	28	69,5	-
CP1inv4	GCGTTTTCCATGGTACAAGTGCTGCCAG	28	68,0	Fragmentos <i>DraI</i> de 3,8 kb y e 2,6 kb
CP2inv1	TGGCATCGCGGTGTAAAGCAGCTGTTC	28	69,5	Fragmento <i>SacI</i> de 2,3 kb
CP2inv2	CCGATTCTGTGCGCTTCTCAATGGC	28	68,0	Fragmento <i>SacI</i> de 2,3 kb
GspDinv1	GCTTCGTGCGCTTC TGTCATC	29	69,1	Fragmentos <i>AclI</i> de 1,7 kb y <i>HinI</i> de 1,7 kb
GspDinv2	TGAAGGCGATGGCGTTAACTTTGGTTTGC		66,7	Fragmentos <i>AclI</i> de 1,7 kb y <i>HinI</i> de 1,7 kb
GspDinv3	GGGGTCGCCAAAATATTCGAATTCGTGTC	29		Fragmento <i>EcoRV</i> de 2,2 kb
GspDinv4	CGTCGACCGGCAGTAACAATGAAAACC	28	68,0	Fragmento <i>EcoRV</i> de 2,2 kb

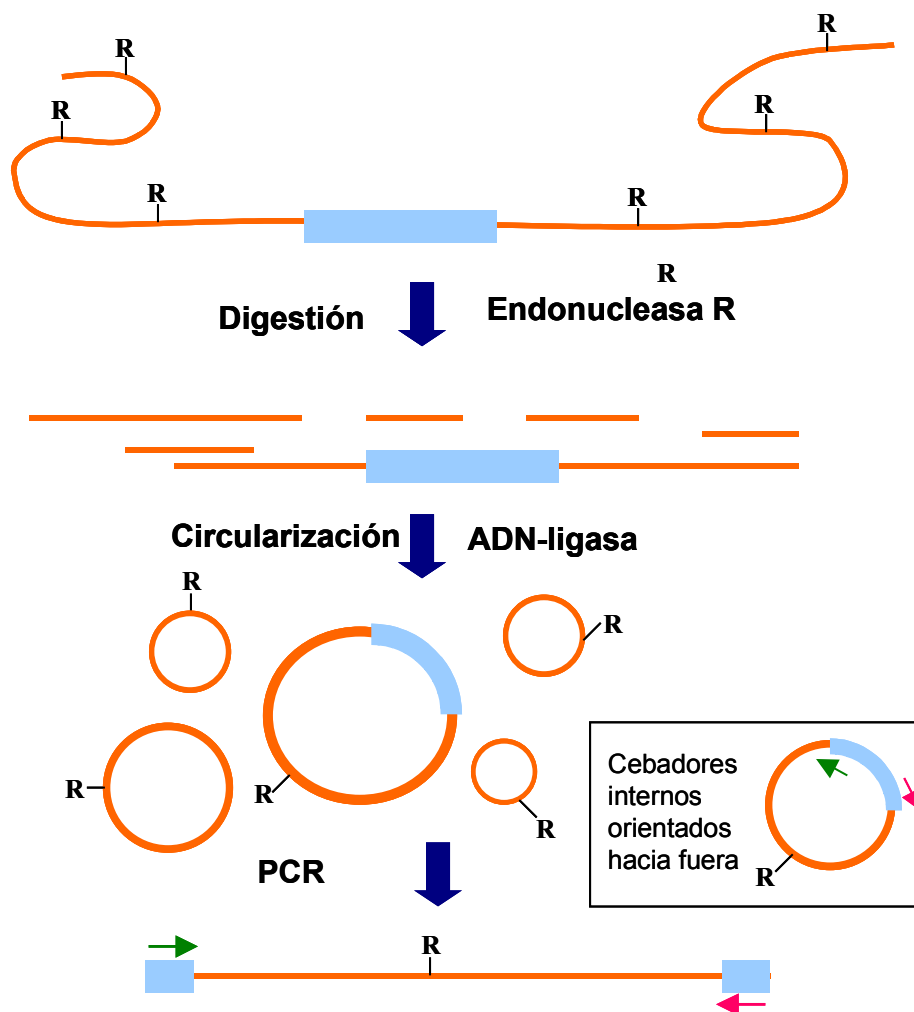


Figura 41. Esquema de la estrategia de PCR inversa

III.13. HIBRIDACIÓN DE ADN

Las hibridaciones de ADN se realizaron según la metodología descrita por Sambrook y Russell (2001).

III.13.1. Marcaje de las sondas con digoxigenina

Para el marcaje de las sondas se siguió el método descrito por Feinberg y Vogelstein (1983), utilizándose desoxiuridín-trifosfato marcado con digoxigenina (DIG-dUTP) en lugar de desoxinucleótidos radiactivos. Para ello, se marcó 0,5-1 µg de ADN utilizando el kit DIG DNA Labelling (Roche), durante 16-20 horas, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de iniciar la reacción de marcaje, el ADN se desnaturalizó durante 10

minutos en agua hirviendo, seguido de 30 segundos en hielo. Para un volumen final de 20 μl se utilizaron las siguientes cantidades:

ADN	0,5-1 μg
Mezcla de hexanucleótidos (10 X)	1 μl
dNTP marcados (10 X)	2 μl
Agua destilada	csp 20 μl
Enzima Klenow	1 μl

Una vez finalizado el tiempo de marcaje, se paró dicha reacción con una solución 0,2 M de EDTA, pH 8,0. La eliminación de los nucleótidos no incorporados se llevó a cabo mediante la precipitación de la sonda de ADN con LiCl 4 M y etanol de 96°C, previamente enfriado, durante al menos 30 minutos a -80°C, y posterior centrifugación y disolución de la misma en agua destilada. El ADN marcado se conservó a -20°C hasta su utilización.

III.13.2. Transferencia del ADN a las membranas

Los soportes más comúnmente empleados en la transferencia de los ácidos nucleicos son las membranas de nitrocelulosa o de nailon (las de éste último tipo son más utilizadas en la actualidad, debido fundamentalmente a su mayor resistencia). La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en un gel de agarosa se denomina "Southern blotting" o "transferencia de Southern" (Southern, 1975).

Esta técnica se utilizó para localizar el tamaño de los fragmentos homólogos a una sonda en digestiones de ADN genómico o de plásmidos. La cantidad de ADN necesaria para la detección de los fragmentos es diferente según se trate de ADN genómico (10 μg) o de ADN amplificado y plasmídico (100 a 500 ng).

Procedimiento

1. Una vez separadas las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa (si estamos trabajando con ADN total se recomienda dejar la electroforesis toda la noche a velocidad muy lenta para conseguir así una mejor separación de las bandas de ADN) se fotografía teniendo en cuenta la escala fotográfica.
2. Se procede en primer lugar a la depurinización ácida mediante la incubación del gel 5 minutos en 100 ml de HCl 0,25 N o bien hasta que el colorante xilén-cianol vire a amarillo.
3. Tras un breve enjuagado con agua destilada se procede a la desnaturalización del ADN en Solución desnaturalizante (incubación del gel en 100 ml de dicha solución durante 30 minutos), seguidamente se enjuaga con agua.
4. Se realizan dos incubaciones de 15 minutos en 100 ml de Solución renaturalizante.
5. Enjuagamos con agua.
6. Se procede a realizar un puente salino: utilizamos para ello una bandeja de plástico que contiene 1 l de tampón SSC 20X, atravesado sobre ella colocamos un soporte de plástico y lo recubrimos con papel de filtro doble empapado también en SSC 20X, de manera que contacte con la solución para que el papel siempre esté empapado. Se alisa para eliminar las posibles burbujas con una pipeta a modo de rodillo.
7. El gel se coloca encima, con mucho cuidado ya que ahora es muy frágil.

8. La membrana de nailon (HybondTMN+ de 0,45 μm de diámetro de poro, Amersham Pharmacia) se recorta con el tamaño exacto del gel y se coloca sobre él.
9. Seguidamente se colocan 3 papeles Whatman 3MM empapados en tampón SSC 20X sobre la membrana de nailon y sobre éste medio paquete de servilletas para que absorban el tampón.
10. Colocamos encima una tapa de cristal plana y encima 1 kg de peso y se deja entre 2 y 16 horas.
11. Transcurrido este tiempo recuperamos la membrana y marcamos los pocillos del gel con un lápiz.
12. Una vez transferido el ADN, la membrana se lava con una solución de SSC 2X y la fijación del ADN a la membrana se lleva a cabo con luz ultravioleta.

► **Solución desnaturalizante:** NaCl, 87,66 g; NaOH, 20 g; Agua destilada, csp 1000 ml.

► **Solución renaturalizante:** NaCl, 88,2 g; Trizma Base, 0,55 g; EDTA, 0,37 g, Agua destilada, csp 1000 ml.

► **SSC 20 X:** NaCl, 175,3 g; Citrato trisódico, 88,2 g, Agua destilada, csp 1000 ml.

III.13.3. Prehibridación

Las membranas se prehibridaron durante al menos 1 hora a 37°C en un horno de hibridación (Stuart Scientific) con agitación. Esta prehibridación se realizó en Tampón de hibridación. El agente de bloqueo utilizado fue obtenido de la casa comercial Roche. Para la desionización de la formamida se usó la resina comercial Molecular Biology Grade AG 501-XB (Bio Rad): se desionizaron 100 ml de formamida con 5 g de resina, en agitación en cámara fría durante toda la noche. Se procedió a su filtración para eliminar los restos de resina y se conservó a 4°C.

► **Tampón de hibridación:** Formamida desionizada, 25 ml; SSC20 X, 12,5 ml; Agente de bloqueo 10 X, 10 ml; N-Lauril sarcosina al 5%, 1 ml; SDS 10%, 0,1 ml; Agua destilada, csp 50 ml.

III.13.4. Hibridación

La hibridación se llevó a cabo durante un periodo de tiempo variable entre 2 y 24 horas, en las mismas condiciones que la prehibridación, pero añadiendo a 10 ml de la solución anterior la sonda marcada con digoxigenina, previamente desnaturalizada por incubación a 100°C durante 10 minutos.

III.13.5. Lavado de las membranas

Tras la hibridación, las membranas se lavaron a 37°C dos veces durante 5 minutos con una solución de lavado que contenía SDS 0,1% y SSC 2X y otras 2 veces a 68°C durante 15 minutos con una solución conteniendo SDS 0,1% y SSC 0,5X.

III.13.6. Detección

La detección se realizó a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche).

Protocolo de detección

1. Las membranas se lavan brevemente en Solución de lavado.
2. A continuación, las membranas se preincuban durante 30 minutos en una Solución de bloqueo.
3. Se incuban durante 30 minutos en Solución de bloqueo con anti-DIG-AP (anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina) (Roche).
4. Seguidamente, se lava dos veces con Solución de lavado.
5. Se equilibran las membranas durante 2-5 minutos con el Tampón de detección.
6. Una vez equilibradas, se añade el sustrato para la fosfatasa alcalina (^aCSPD, Roche) a una concentración de 25 mM diluido en Tampón de detección 1:100.
7. Se secan las membranas y se elimina el exceso de líquido con papel Whatman.
8. Por último se expone sobre una película Kodak-O-Mat a 37°C durante al menos 1 hora, procediéndose a continuación al revelado utilizando revelador y fijador Kodak al 1X (Sigma)

► **Solución de lavado:** Ácido maleico, 11,6 g; NaCl, 8,76 g; Tween-20, 3 ml; Agua destilada, csp 1000 ml. Ajustar la solución a pH 7,5.

► **Solución de bloqueo:** Ácido maleico, 11,6 g; NaCl, 8,76 g, agente de bloqueo al 10%, 100 ml; Agua destilada, csp 1000 ml. pH 7,5.

► **Solución de bloqueo con anti-DIG-AP:** Diluir el anti-Dig-AP 75 mU/ml (1:10000) en solución de bloqueo.

► **Tampón de detección:** TrisHCl 1 M, pH 9,5, 5 ml; NaCl 5 M, 1 ml; Agua destilada, csp 50 ml. Es muy importante ajustar la solución a pH 9, 0 pH óptimo de actuación para la fosfatasa alcalina.

^a**CSPD:** 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decano}-4-il) fenil fosfato disódico

III.13.7. Reutilización de los filtros

Para reutilizar los filtros se procedió a lavar las membranas brevemente con agua destilada, seguidamente se lavaron 2 veces más durante 15 minutos a 37°C en una solución NaOH 0,2M y SDS 0,1% para separar la sonda. Seguidamente se lavó con SSC 2X y se secaron al aire. Las membranas se conservan en un papel de filtro a temperatura ambiente.

III.14. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ADN

III.14.1. Secuenciación de ADN

La secuenciación de los distintos fragmentos de ADN analizados en el presente trabajo han sido realizadas por la empresa MWG-Biotech (Ebersber, Alemania) mediante un secuenciador automático (LiCor).

Los oligonucleótidos empleados como iniciadores en la secuenciación fueron cebadores universales comerciales y otros internos de diseño, sintetizados por MWG-Biotech, que permitieron ir avanzando en la lectura de la secuencia (Tabla 21).

Tabla 21. Cebadores utilizados en la secuenciación del ADN

Cebador	Secuencia (5' --)3')	Cebador	Secuencia (5' --)3')
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	CP3.5	GCAATCATAGCTACTGAGTGTC
M13 forward		CP3.6	CGGACAAGAGTTAAGTGATG
T3		CP4.1	CTCAAAGCTCTTCGGATCC
T7		CP4.2	CGTTTACTCTCATGTTCCG
T7 terminator	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	PET1.1	GC CGTACAGC
CP2.1		PET1.2	GCTGTCCAATAAAGCTGG
CP2.2		PET1.3	GTAACATCAAGCCTAAGCG
CP2.3		PET1.4	CTCACATCCAAATAGCCG
CP2.4		PET2.1	GGTGTGCGATGCAGCAGAT
CP3.1	GCCTTTGTGCATTTGCTG	PET2.2	GCGACCGTAATAGTAGTCG
	TGCACCATGAGTACAAACG	PD2.1	CGCACAAATATCAACACG
CP3.3	GCTCATTCTCGATGGCAGG	PD3.1	GGATCAGTGGACCCAACTC
CP3.4	GTCAAACGCGGATAAAACG		

III.14.2. Análisis de la secuencia del ADN

El tratamiento y análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, alineamientos, así como el diseño de cebadores, se llevó a cabo utilizando el programa **DNASTAR** (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, EEUU) y programas específicos del servidor de Internet **Baylor College of Medicine** como el programas **CLUSTAL W**, versión 1.8. y **BOXSHADE** 3.21 del European Molecular Biomedical Network (Jeanmougin y col., 1998).

Las secuencias se compararon con las disponibles en las bases de datos (EMBL, GenBank y DDBJ) con la ayuda de los programas **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul y col., 1997) en el servidor del **NCBI** (National Center for Biotechnology Information).

El uso de codones más frecuentes se determinó mediante la aplicación **Codon Usage Database** diseñada a partir de la base de datos GenBank (Nakamura y col., 2000).

Para la predicción de regiones promotoras, se utilizó el programa **BDGP Neural Network Promoter Prediction Input** (Waibel y col., 1989; Reese y Eeckman, 1995). El programa **MFOLD** se empleó para la predicción de estructuras secundarias en ARN, y así determinar los posibles terminadores transcripcionales (Zuker y col., 1999).

El análisis de los productos proteicos provenientes de los genes secuenciados se realizó mediante programas específicos a partir del servidor **ExPASy** (Expert Protein Analysis System). Así, para la predicción de péptidos señal, se utilizó la nueva versión del programa **Signal P**, la versión 3.0 (Nielsen y col., 1997; Bendtsen y col., 2004). Para la localización celular de la proteína se utilizó el programa **pSORTb** (Gardy y col., 2005), este programa realiza la búsqueda de los motivos característicos que deben poseer las proteínas para estar localizadas en una región celular concreta y en base a estos análisis le asigna su

localización celular. Las predicciones para la estructura secundaria de las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos se realizó utilizando el programa **SOSUI** system (versión 1.0/1.0, Mar, 1996) basado en las propiedades fisicoquímicas de las secuencias de aminoácidos, tales como la hidrofobicidad y la carga (Mitaku y col., 1999; 2002; Hirokawa y col., 1998; Mitaku y Hirokawa, 1999). Para la predicción de hélices transmembrana de proteínas se empleó el programa **TOPPRED** (Claros y Heijne, 1994).

La base de datos **CDD** (Conserved Domain Database) en el servidor del NCIB se utilizó para la búsqueda de los dominios conservados en las proteínas (Marchler-Bauber y Bryant, 2004).

Para el modelado de las proteínas CP1 y CP2 se utilizó el programa **Cn3D** suministrado en el servidor del NCIB, en el que se predice la estructura terciaria de proteínas basándose en sus dominios conservados. También se utilizaron los programas **Swiss-Model** y **Swiss-PdbViewer** (Guex y Peitsch, 1997) del servidor Expasy.

En la Tabla 22 se muestran las direcciones de las páginas Web utilizadas para el análisis de las secuencias.

Tabla 22. Programas utilizados en el análisis de secuencias con sus correspondientes direcciones Web

Programa	Dirección	Utilidad
BDGP N.N. Promoter Prediction	http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl	Localización de promotores
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast	Alineación de secuencias
CLUTAL W	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-	secuencias proteicas
Cn3D	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml	Estructuras 3D de proteínas
Codon frequency	http://www.kazusa.or.jp/codon/	codones
MFOLD	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html	Predicción de estructuras secundarias de ARN
Psort	http://www.psort.org/psortb/index.html	Localización celular de proteínas
Signal P	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Predicción de péptidos señal
Sosui	http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html	Determinación de regiones transmembrana
Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/	Estructura 3D de proteínas
TOpPPRED		Predicción de regiones transmembrana

III.15. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

III.15.1. Generalidades

Vectores de la serie pET

Los vectores de expresión del tipo pET poseen un promotor inducible por IPTG. Los genes clonados en este tipo de vectores se encuentran bajo el control de la maquinaria transcripcional del bacteriófago T7 y, opcionalmente, bajo el control de señales de traducción. La expresión de la proteína de interés se produce gracias a la presencia de la T7 ARN polimerasa en las células hospedadoras. La T7 ARN polimerasa es tan activa y selectiva que el producto deseado puede llegar a niveles de expresión superiores al 50% del total de las proteínas expresadas en la célula hospedadora (pET System Manual, Novagen 2002). Además, el sistema de expresión de los vectores pET añade una cola de 6 histidinas en el extremo amino o carboxi terminal de la proteína, lo que permite la purificación de las proteínas expresadas mediante una resina de níquel (HiTrap Chelating HP, Amersham), por la que tienen afinidad las histidinas de la proteína.

Una vez formada la molécula de ADN recombinante, es decir, que el fragmento de ADN exógeno ha sido ligado en el vector (debe de estar en fase de lectura correcta), debe introducirse en la célula hospedadora. Con frecuencia, *E. coli* es la célula hospedadora. La cepa de *E. coli* BL21(DE3) de Novagen posee una copia de la T7 ARN polimerasa en su cromosoma. Estos hospedadores son lisógenos del bacteriófago DE3, un derivado del fago lambda que posee la región de inmunidad del fago 21 y contiene un fragmento de ADN que posee el gen *lacI*, el promotor lacUV5 y el gen de la T7 ARN polimerasa. Una vez formado un lisógeno DE3, el único promotor para la transcripción directa del gen de la T7 ARN polimerasa es el promotor lacUV5, inducible por IPTG. La adición de IPTG al cultivo en crecimiento induce la T7 ARN polimerasa, la cual transcribe el ADN diana en el plásmido (pET System Manual, Novagen 2002) (Figura 42).

Expresión heteróloga

La expresión heteróloga de genes es una técnica cuyo objetivo principal es la obtención de elevadas cantidades de proteína exógena al organismo hospedador en el mínimo tiempo posible. Por ello, se utiliza como organismo hospedador principalmente *E. coli*. Este organismo es muy versátil a la hora de aceptar plásmidos exógenos, lo que permite utilizarlo como modelo en diversas técnicas de biología molecular.

La sobreexpresión de proteínas en *E. coli* es una herramienta de gran utilidad para la purificación, localización y análisis funcional de las proteínas. La técnica de expresión se basa en la inserción de un promotor fuerte y una secuencia de unión al ribosoma muy eficaz delante del ORF del gen a estudiar (Claros y col., 2001). Estas proteínas pueden expresarse en modo nativo o como proteínas de fusión.

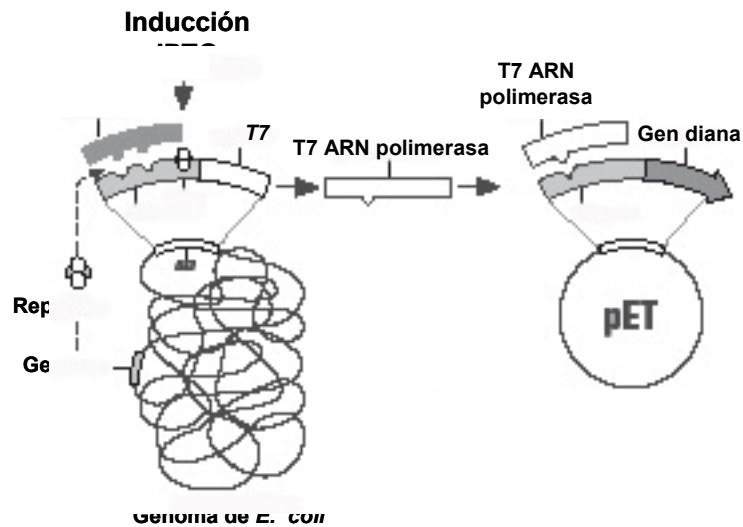


Figura 42. Esquema de actuación de los vectores pET

Las proteínas que se obtienen en la fracción citoplasmática de la bacteria pueden aparecer en dos formas posibles: insoluble, lo que se conoce como “cuerpos de inclusión”, o en forma soluble. Las proteínas que aparecen solubles en el citoplasma pueden estar en forma activa o inactiva. Si las proteínas presentan actividad, únicamente se requiere un proceso de purificación de la proteína recombinante que dependerá de dicha proteína en cuestión. Si estas proteínas no presentan actividad se requiere un paso previo de reactivación, y luego la posterior purificación de la proteína.

A menudo, las proteínas expresadas a elevados niveles tienden a asociarse entre sí mediante interacciones hidrofóbicas para hacerse más solubles. Estas asociaciones acaban siendo finalmente insolubles debido a su gran tamaño, ya que la proteína es muy abundante y forman los denominados “cuerpos de inclusión” (Claros y col., 2001).

Las proteínas que se obtienen en forma de cuerpos de inclusión se encuentran como un aglomerado de estructuras primarias y material contaminante, como vesículas de membrana que se adhieren a los cuerpos de inclusión tras la lisis celular, por lo que no presentan actividad (Georgiou y Valax, 1999). En este caso se requiere un paso previo de solubilización de estos cuerpos de inclusión, a continuación un plegamiento de la proteína para que adquiera su estructura tridimensional, y por último la purificación de la proteína de interés de los restos que la acompañaban en los cuerpos de inclusión.

La obtención de proteínas expresadas en forma de cuerpos de inclusión presenta varias ventajas. En primer lugar, se obtienen altos niveles de proteína recombinante; además, se evita el paso de la proteína a través de las membranas celulares y la proteína obtenida de esta forma se encuentra protegida del ataque de proteasas del hospedador presentes en el citoplasma y el espacio periplásmico; incluso, si la proteína, a tan altos niveles de

expresión, resultara tóxica para el organismo hospedador, la producción de cuerpos de inclusión sería el método más eficaz para obtener la proteína recombinante (de Bernardez, 2001). Sin embargo, tiene una gran desventaja, debido a que durante el proceso de renaturalización *in vitro* de la proteína se pueden formar estructuras intermedias inactivas de forma irreversible, o agregaciones, lo que interrumpiría el proceso de plegamiento impidiendo la formación de la proteína nativa. Este proceso improductivo puede llegar a predominar sobre el correcto plegamiento bajo las condiciones convencionales de dicho plegamiento cuando se trata de proteínas complejas (Rudolph y Lilie, 1996); por ello, este proceso debe ser cuidadosamente desarrollado.

III.15.2. Clonación en un vector de expresión

Para la clonación de los genes *cp1* y *cp2* se eligió el vector de expresión pET22b(+). En este vector, de 5.493 pb, está presente el promotor inducible del fago T7, un operador *lac*, una secuencia de unión al ribosoma o Shine Dalgarno una secuencia que codifica el péptido líder de la proteína periplásmica pelB de *E. coli*, el codón de inicio seguido de un conector que permite, sin romper el marco de lectura, insertar la secuencia del gen que se pretende expresar, y la secuencia que codifica las 6 histidinas (Figura 43). Además contiene un cassette que le confiere resistencia a la ampicilina. Para la clonación de estos genes se diseñaron unos cebadores específicos que amplificaban la región correspondiente a ambos genes por separado y además, se les introdujo las secuencias de restricción para dos enzimas. Concretamente para las enzimas *EcoRI* (para el extremo N-terminal) y *XhoI* (para el extremo C-terminal) en el caso de *cp1* y para las enzimas *HindIII* (para el extremo N-terminal) y *XhoI* (para el extremo C-terminal) en el caso de *cp2*. Los cebadores se denominaron CP1E, CP1X, CP2H y CP2X respectivamente y su secuencia se muestra en la Tabla 19. Una vez obtenidas las moléculas recombinantes se introdujeron mediante transformación en las células competentes BL21(DE3) (Novagen).

4. Se añade 100 µl de Tampón de carga
5. Las células se someten a 2 pulsos de sonicación de 15 segundos de duración a 90-100 W de potencia.
6. Se incuba la muestra 3 minutos a 85°C. Se puede cargar directamente la muestra en el gel o congelar a -20°C.

Fracción del medio extracelular

1. Una vez centrifugados los cultivos se toma 1 ml del sobrenadante de los mismos.
Concentración:
2. Se añade 100 µl de ácido tricloroacético y se agita con ayuda de un agitador durante 15 segundos.
3. Se deja reposar 15 minutos en hielo.
4. Se centrifuga 10 minutos a 14.000 g.
5. Se tira el sobrenadante y se lava el pellet 2 veces con 100 µl de acetona.
6. Se centrifuga 5 minutos a 13.000 g, se tira el sobrenadante y secamos el pellet
7. Se añaden 100 µl de PBS 1x y 100 µl de Tampón de carga y se resuspende.
8. Se incuba 3 minutos a 85°C. Se puede cargar directamente la muestra en el gel o congelar a -20°C.

Fracción periplásmica

1. Se resuspende el pellet (de los 50 ml) del paso anterior en 30 ml de Tampón A.
2. Se añade 60 µl de EDTA 0,5 M pH 8.
3. Se centrifuga 10 minutos a 10.000 g y se tira el sobrenadante.
4. Se resuspende el pellet en 30 ml de MgSO₄ 5 mM frío.
5. Se deja en hielo 10 minutos y se agita frecuentemente.
6. Se centrifuga 10 minutos a 10.000 g.
7. Se toma 1 ml de sobrenadante y se concentra como en el apartado anterior.

Fracción citoplasmática soluble

1. Se resuspende el pellet del apartado anterior en 4 ml de TrisHCl 20 mM pH 7,5 frío.
2. Se somete la muestra a 2 pulsos de sonicación de 15 segundos de duración a 90-100 W de potencia.
3. Se añaden 10 mg de lisozima y se incuba a 30°C durante 15 minutos.
4. Se centrifuga 10 minutos a 10.000 g para separar las fracciones insolubles de las solubles.
5. Se toman 100 µl de sobrenadante y se añaden 100 µl de Tampón de carga.
6. Se incuba 3 minutos a 85°C. Se puede cargar directamente la muestra en el gel o congelar a -20°C.

Fracción citoplasmática insoluble

1. Se lava el pellet del apartado anterior 2 veces con 750 µl de Tris HCl 20 mM pH7,5.
2. Se centrifuga 5 minutos a 10.000 g.
3. Se tira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1,5 ml de SDS 1%. Se agita vigorosamente.
4. Se toman 100 µl de esta solución y se añaden 100 µl de Tampón de carga.
5. Se incuba 3 minutos a 85°C. Se puede cargar directamente la muestra en el gel o congelar a -20°C.

► **Tampón A:** TrisHCl 30 mM pH 8; Sacarosa 20%.

► **Tampón**
40%; Azul de bromofenol 0,02%.

rcaptoetanol 10%; DTT 300 mM; Glicerol

III.15.5. Solubilización de los cuerpos de inclusión

Una vez analizadas las distintas fracciones se determinó que la haloproteasa CP1 recombinante se encontraba en la fracción citoplasmática insoluble en forma de cuerpos de inclusión, por lo que se puso a punto un procedimiento para su solubilización.

1. La cepa *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido pPEProt1 se crece en las condiciones descritas en el apartado III.15.3. induciendo el cultivo con 0,5 mM de IPTG y las células se recogen por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos.
2. Se pesa el pellet y se resuspende en Tampón de lisis (se añaden 5 ml por cada gramo de pellet).
3. Las células se someten a 3 pulsos de sonicación de 15 segundos de duración a 90-100 W de potencia.
4. Se centrifuga 10 minutos a 10.000 g.
5. Se guarda una alícuota del sobrenadante para cargar en el gel (fracción soluble).
6. Se resuspende el pellet en el mismo volumen anterior esta vez en Tampón de solubilización.
7. Se centrifuga 10 minutos a 10.000 g.
8. El sobrenadante en el que tenemos solubilizados los cuerpos de inclusión se guarda para su purificación a través de la columna HiTrap Chelating HP (Amersham).

▶Tam n	0%; N-lauril sarcosina 0,2%.
▶Tam n	I 50 mM; CINA 0,5 M; Disolución en PBS 1X pH 8.

III.15.6. Purificación de proteínas expresadas en *E. coli* mediante una columna de afinidad

Como se ha comentado anteriormente la utilización del sistema de expresión de los vectores pET permite la purificación de las proteínas expresadas mediante una resina de níquel (HiTrap Chelating HP, Amersham), metal afín a histidinas de la proteína. Se siguieron las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones.

1. Una vez que tenemos solubilizados los cuerpos de inclusión (apartado anterior) procedemos a su purificación a través de la columna.
2. Se utiliza la columna HiTrap Chelating HP (Amersham) (Figura 44). Para facilitar los pasos, se recomienda realizar todos los pasos del proceso en tubos Falcon, y pasar a un soporte adecuado (columna) después de incubar.
3. Se abre la columna, se saca la resina y se lava con 10 volúmenes de agua destilada.
4. Se centrifuga 1 minuto a 2.000 g y se tira el sobrenadante.
5. Se carga la resina con níquel, para ello se añaden 10 volúmenes de SO_4Ni (5 mg/ml) y se resuspende.
6. Se centrifuga 1 minuto a 2.000 g y se tira el sobrenadante.
7. Se añaden 10 volúmenes de agua destilada.
8. Se centrifuga de nuevo 1 minuto a 2.000 g y se tira el sobrenadante.



Columnas de purificación HiTrap

9. Se vuelven a añadir 5 volúmenes de SO_4Ni (5 mg/ml).
10. Se centrifuga 1 minuto a 2.000 g y se tira el sobrenadante.
La resina ya está cargada, procedemos a su equilibrado.
11. Se añaden 10 volúmenes de Tampón de equilibrado.
12. Se centrifuga 1 minuto a 2.000 g y se tira el sobrenadante.
13. Se incuba con la muestra (del apartado anterior) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. En estas condiciones la proteína, que contiene la cola de 6 histidinas queda retenida en la resina.
14. Transcurrido este tiempo, se pasa la mezcla al soporte adecuado (columna) y se elimina todo lo que no se ha unido a la resina.
15. Se lava con 30 ml de Tampón de equilibrado.

Elución de la proteína

16. Se añaden sucesivamente Tampón de elución (5 ml de cada concentración) conteniendo en cada caso concentraciones crecientes de imidazol de 100 a 500 mM, recogiendo fracciones de 1 ml en tubos Eppendorf.
17. Las distintas fracciones se analizan en gel de acrilamida.
18. Las fracciones en las que la proteína se encuentra en concentraciones más elevadas se dializan frente a tampón TrisHCl 20 mM pH 8 para eliminar los restos de imidazol.

Regeneración de la columna

1. Se añaden 20 volúmenes de Tampón de regeneración
2. Se lava con 20 volúmenes de agua destilada
3. Se añaden 20 volúmenes de agua destilada y 20% de etanol. Conservar a 4°C.

- ▶ **Tampón de equilibrado:** Urea 8 M; Imidazol 100 mM; ClNa 0,5 M; disolución en PBS 1x pH 8.
- ▶ **Tampón de elución:** Urea 8 M; ClNa 0,5 M; Imidazol a concentraciones 100, 200, 300, 400, 500 mM; disolución en pBS 1x pH 8.
- ▶ **Tampón de regeneración:** ClNa 0,5 M; EDTA 0,05 M pH 4.

III.16. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA

III.16.1. Caracterización fenotípica

III.16.1.1. Características morfológicas

Morfología y motilidad

Para realizar esta prueba se añade a un cultivo del microorganismo a ensayar una pequeña cantidad de solución salina estéril al 10%. Al cabo de unos minutos, las bacterias móviles se desplazan a la solución salina y se observan al microscopio de contraste de fases mediante el método de la gota pendiente. A la vez que se observa la motilidad, también se determina la morfología bacteriana y las agrupaciones típicas de cada cepa.

Se ha utilizado un microscopio Olympus BX41 provisto de una cámara digital DP70 (Olympus).

Tinción de Gram

Para realizar esta tinción diferencial se emplearon cultivos recientes de las cepas y se siguió la técnica de Gram convencional y mediante la modificación de Dussault (1955).

III.16.1.2. Características fisiológicas

Crecimiento a distintas concentraciones salinas

El crecimiento de cada cepa se determinó en una serie de medios de cultivo adicionados de diferentes concentraciones de sales. El medio de cultivo contiene extracto de levadura al 1% y glucosa al 0,1% al cual se le añadió la solución de sales correspondiente mediante dilución de una solución de sales al 30% (Subow, 1931). El pH se ajustó entre 7,2 y 7,4, y se adicionó agar al 2% para obtener medios sólidos. Las concentraciones de sales ensayadas fueron: 0; 0,9; 3; 5; 7,5; 10; 12; 15 y 20%.



Figura 45. Campana de anaerobiosis

Los medios así preparados se inocularon a partir de un cultivo líquido en fase logarítmica de crecimiento, mediante la siembra en estrías y posteriormente se incubaron a 37°C. Las placas se observaron a distintos intervalos de tiempo: 1, 2, 3, 5 y 7 días. Se consideró positivo siempre que el crecimiento fue notorio.

Crecimiento en anaerobiosis

El crecimiento en anaerobiosis se determinó mediante la siembra en placa con estrías, utilizando el medio SW10 y se incubaron durante 7 días a 37°C dentro de una campana de anaerobiosis (Figura 45). Para la generación de la atmósfera anaerobia se utilizó AnaeroGen (Oxoid) y un indicador de anaerobiosis (Oxoid).

III.16.1.3. Pruebas bioquímicas

Prueba de la oxidasa

La prueba detecta la presencia o ausencia de la enzima citocromo c oxidasa, cuyo inmediato precursor en la cadena respiratoria, el citocromo c, tiene la propiedad de cambiar el color del reactivo tetrametil-p-fenilendiamina en solución acuosa al 1%. Se siguió el método de Kovacs (1956). En esta prueba el reactivo ya viene preparado en unas tiras comerciales y sólo hay que añadir el microorganismo problema, con la ayuda de un palillo de dientes, sobre la tira que contiene el reactivo de la oxidasa. La reacción positiva viene indicada por la aparición de un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos.

Prueba de la catalasa

Se pretende determinar si el microorganismo posee la enzima catalasa, la cual está presente en la mayoría de las bacterias que crecen en condiciones aerobias. La prueba se realizó añadiendo unas gotas de agua oxigenada al 3% (v/v) sobre un cultivo joven. Si aparece un burbujeo inmediato será consecuencia de la actuación de la catalasa sobre el

agua oxigenada hasta descomponerla en agua y oxígeno y el resultado de la prueba es positivo.

Prueba de la fosfatasa

Se utilizó el siguiente medio:

Extracto de levadura (Difco)	0,5 g
Difosfato de fenolftaleína (Sigma)...	0,001 g
Solución de sales al 10%.....	csp 100 ml
Agar (Pronadisa).....	2 g

En primer lugar se mezcló el extracto de levadura con la solución de sales y el agar y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar y cuando alcanzó la temperatura de 60°C se le añadió el difosfato de fenolftaleína esterilizado por filtración. Tras la inoculación, las placas se incubaron a 37°C durante 5 días.

Para su lectura se invirtieron las placas y sobre las tapas se depositaron unos mililitros de amoníaco. Si sobre la zona de crecimiento aparece un color rosa brillante la prueba se considera positiva y es indicativa de que el microorganismo posee la enzima fosfatasa que hidroliza el difosfato de fenolftaleína liberando fenolftaleína, que al reaccionar con los vapores de amoníaco adquiere un color rosa característico (Koneman y col., 1983).

Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Se determinó la producción de ácidos a partir de los siguientes carbohidratos: D-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, lactosa, maltosa, D-manitol, sacarosa, D-trealosa y D-xilosa.

Como medio para la realización de la prueba se empleó el siguiente:

Extracto de levadura (Difco)	0,5 g
Rojo fenol	0,001 g
Sales al 10%.....	csp 100ml

El rojo fenol se disolvió previamente en 0,5 ml de alcohol para facilitar su homogenización. El pH se ajustó a 7,6. Los carbohidratos se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio base a una concentración final del 1%.

Para obtener el inóculo se empleó el medio SW10. La incubación se realizó durante 14 días efectuándose lecturas diarias. La producción de ácidos se manifiesta mediante el viraje del indicador a color amarillo (Cowan y Steel, 1982).

Producción de indol

Como medio base se empleó:

Triptona (Oxoid)..... 1 g
Sales al 10%..... csp 100ml

El pH se ajustó a 7,6 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 5 minutos. Este medio se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente y se incubó a 37°C durante 7 días; para la lectura se añadió 0,5 ml del reactivo de Kovacs (1928), se agitó y al cabo de un minuto se observó el color: la prueba se consideró positiva al observar la aparición de un anillo de color rojo en la parte superior del medio (Figura 46).



Figura 46. Prueba del indol

Reactivo de Kovacs (1928) para indol:

p-Fenilen diaminobenzaldehido5 g
Alcohol amílico..... 72 ml
HCl..... 25ml

El aldehído se disolvió en el alcohol por calentamiento suave en baño maría (50-55°C), se enfrió y se añadió el ácido clorhídrico. Este reactivo debe protegerse de la luz y almacenarse a 4°C. El color del reactivo debe ser amarillo o marrón claro.

Prueba del rojo de metilo

El medio de cultivo utilizado fue:

Glucosa 0,5 g
Sales al 10%..... csp 100 ml

Se ajustó el pH a 7,6, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente y se incubó a 37°C durante 7 días.

Para su lectura se añadieron unas gotas de una Solución de rojo de metilo, se agitó y se observó el posible cambio de color: rojo indica que la prueba es positiva y amarillo negativa (Cowan y Steel, 1982) (Figura 47).



Figura 47. Prueba del rojo de metilo

Solución de rojo de metilo

Rojo de metilo.....0,04 g
Etanol40 ml
Agua destilada.....csp 100 ml

El indicador se disuelve primero en el alcohol y después se enrasa con agua destilada.

Prueba de Voges-Proskauer

El medio de cultivo y las condiciones utilizadas son las mismas que en la prueba del rojo de metilo. Para su lectura se añadieron 0,6 ml de solución de α -naftol en etanol y 0,2 ml de solución acuosa de KOH al 40%. Los tubos se examinaron a los 15 minutos y después de una hora. La reacción positiva viene indicada por la presencia de un color rojo intenso (Barrit, 1936).

La solución de α -naftol no debe tener color rojo oscuro. Si es necesario se debe redestilar (Fulton y col., 1960).

Reducción de nitratos y nitritos

Siguiendo la metodología descrita por Skerman (1967) se utilizó un medio con nitrato potásico al 0,2%, cuya composición es la siguiente:

KNO ₃	0,2 g
Extracto de levadura (Difco)	0,5 g
Sales 10%	csp 100 ml

Para detectar la formación de gases se emplea una campana Durham. El medio se inocula y después de 7 días de incubación a 37°C se observa si hay gases en la campana Durham, indicativo de que los nitratos se han reducido a nitritos y estos a su vez a gas. A los tubos en los que no se forma gas se les añade 1 ml de Reactivo A y 1 ml de Reactivo B de nitritos. La aparición de color rojo indica la presencia de nitritos y por tanto se considera positiva la reducción de nitratos.

Si al cabo de 5 minutos la reacción continua siendo negativa se añade limaduras de zinc (aproximadamente 5 mg/ml). La aparición de color rojo transcurridos unos segundos indica la presencia de nitratos en el medio y por tanto la ausencia de este color indica la reducción de los nitritos. Las soluciones de Reactivo A y B se disuelven sometiéndolas a un calentamiento suave:

Reactivo A: Solución al 0,8% de ácido sulfanílico en ácido acético 5 N.

Reactivo B: Solución al 0,5% de α -naftilamina en ácido acético 5 N.

Citrato de Simmons

Se siguió la técnica de Koser (1923). En un medio base (SW10) con la solución de sales al 10% se añadió citrato sódico al 0,2 % y azul de bromotimol al 0,008%. El pH se ajustó a 7,6 y se esterilizó a 121°C durante 5 minutos. Los tubos de agar inclinado se inocularon a partir de un cultivo joven y se incubaron a 37°C durante 7 días al cabo de los cuales se procedió a la lectura. La prueba se considera como positiva si se produce un viraje del medio a color azul intenso, siendo negativa si el mismo permanece verde.

Prueba de la fenilalanina desaminasa

Medio utilizado:

DL-Fenilalanina.....	0,2 g
Extracto de levadura (Difco)	0,3 g
Sales al 10%.....	csp 100 ml
Agar (Pronadisa)	2 g

El pH se ajustó a 7,6 y se esterilizó en autoclave. Tras verter el medio en tubos estériles se dejó solidificar el agar en pico de flauta. Los tubos se inocularon y se incubaron a 37°C durante 7 días.

Para la lectura se añadieron 4 ó 5 gotas de FeCl₃ en solución acuosa al 10%. La inmediata aparición de un color verde intenso indica la presencia de ácido fenilpirúvico y la prueba se considera positiva (Cowan y Steel, 1982).

Prueba de la arginina desaminasa

El medio utilizado fue:

Extracto de levadura (Difco)	0,1 g
Rojo fenol	0,001 g
Agar (Pronadisa).....	0,3 g
Arginina	1 g
Sales al 10%.....	csp 100 ml

El pH del medio se ajustó hasta conseguir una coloración amarillo-anaranjada.

La arginina se esterilizó por filtración añadiéndola al medio estéril a 55°C-60°C. La siembra se realizó en picadura y los tubos se cubrieron con una capa de aceite de parafina estéril de 1 cm de grosor.

La incubación se realizó a 37°C durante 7 días y transcurrido este tiempo la presencia de un color rojo en los tubos indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación (Koneman y col., 1983).

Prueba de la ureasa

Se utilizó el medio agar urea descrito por Christensen (1946), cuya composición es la siguiente:

Medio base:

Peptona	0,1 g
Glucosa	0,1 g
Solución de rojo fenol al 0,2%	0,6 ml
Sales al 10%	86,6 ml
Agar (Pronadisa).....	2 g

Solución de urea:

Urea.....	2 g
Sales al 10%.....	13,4 ml

Al medio base se le ajustó el pH a 6,8 y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. Tras ser esterilizado se dejó enfriar en baño maría hasta una temperatura de 50-55°C. La solución de urea se esterilizó por filtración y se añadió asépticamente al medio base. Se distribuyó en tubos estériles y se dejó solidificar en pico de flauta. Los tubos se inocularon a partir de un cultivo joven y se incubaron a 37°C durante 7 días. Se examinaron diariamente y la prueba se dio como positiva al observar la aparición de color rojo.

III.16.1.4. Pruebas nutricionales

Se determinó la capacidad de cada cepa para utilizar un total de 95 sustratos diferentes como única fuente de carbono y energía (Tablas 23 y 24).

Tabla 23. Sustratos utilizados en las pruebas nutricionales para la caracterización de microorganismos Gram-positivos

α -ciclodextrina	β -metil-galactósido	Metil piruvato ^d
β -ciclodextrina ^c	3-metil-glucosa ^a	Metil succinato ^d
Dextrina ^c	α -metil-D-glucósido ^a	Propionato ^d
Glucógeno ^c	β -metil-D-glucósido ^a	Piruvato ^d
Inulina ^a	α -metil-D-manósido ^a	Succinamato ^d
Manano ^a	Palatinosa ^a	Succinato ^d
Tween-40 ^c	D-psicosa ^a	N-acetil-L-glutamato ^d
Tween-80 ^c	D-rafinosa ^a	Alaninamida ^f
N-acetil glucosamina ^a	L-ramnosa ^a	D-alanina ^h
N-acetil manosamina ^a	D-ribosa ^a	L-alanina ^h
Amigdalina ^a	Salicina ^a	L-alanil-glicina ^h
L-arabinosa ^a	Sedoheptulosano ^a	L-asparragina ^h
D-arabitol ^a	D-sorbitol ^a	L-glutamato ^d
Arbutinina ^a	Estaquiosa ^a	Glicil-L-glutamato ^d
Celobiosa	Sacarosa ^a	L-piroglutamato ^d
D-fructosa ^a	D-tagatosa ^a	L-serina ^h
L-fucosa ^a	D-trehalosa ^a	Putrescina ^k
D-galactosa ^a	Turanosa ^a	2,3-butanodiol
D-galacturonato ^d	Xilitol ^a	Glicerol ^e
Gentiobiosa ^a	D-xilosa ^a	Adenosina ⁱ
D-gluconato	Acetato ^d	2-deoxiadenosina ⁱ
α -D-glucosa ^a	α -hidroxibutirato ^d	Inosina ⁱ
m-Inositol ^a	β -hidroxibutirato ^d	Timidina ⁱ
α -D-lactosa ^a	γ -hidroxibutirato ^d	Uridina ⁱ
Lactulosa ^a	p-hidroxifenilacetato ^d	Adenosina-5'-monofosfato ^g
Maltosa ^a	α -ketoglutarato ^d	Timidina-5'-monofosfato ^g
Maltotriosa ^a	α -ketovalerato ^d	Uridina-5'-monofosfato ^g
D-manitol ^a	Lactamida ^f	Fructosa-6-fosfato ^g
D-manosa ^a	D-metilesterlactato ^d	Glucosa-1-fosfato ^g
D-melezitosa ^a	L-lactato ^d	D,L- α -glicerolfosfato ^g
D-melibiosa ^a	D-malonato ^d	
α -metil-D-galactósido ^a	L-malonato ^d	

^aCarbohidratos, ^bésteres, ^cpolímeros, ^dácidos carboxílicos, ^ealcoholes, ^famidas, ^gcompuestos fosforilados, ^haminoácidos, ⁱcompuestos aromáticos y ^kaminas

Tabla 24. Sustratos utilizados en las pruebas nutricionales para la caracterización de microorganismos Gram-negativos

α -ciclodextrina ^c	D-melibiosa ^a	γ -hidroxibutirato ^d
Dextrina	β -metil-D-glucósido	p-hidroxifenilacetato
Glucógeno ^c	D-psicosa ^a	Itaconato ^d
Tween-40 ^c	D-rafinosa ^a	α -ketobutirato ^d
Tween-80 ^c	L-ramnosa ^a	α -ketoglutarato ^d
D-sorbitol ^a	α -ketovalerato ^d	Sacarosa ^a
D,L-lactato ^d	adonitol ^a	D-trehalosa ^a
Malonato ^d	L-arabinosa ^a	Turanosa ^a
Propionato ^d	D-arabitol ^a	Xilitol ^a
Quinato ^d	Celobiosa ^a	Metil piruvato ^b
D-sacarato ^d	i-eritritol ^a	Mono-metil-succinato ^b
Sebazato ^d	D-fructosa ^a	Acetato ^d
Succinato ^d	L-fucosa ^a	cis-aconitato ^d
Bromosuccinato ^j	D-galactosa ^a	Citrato ^d
Glucuronamida ^f	Gentiobiosa ^a	Formianato ^d
Alaninamida ^f	α -D-glucosa	Lactona-D-galactonato ^d
D-alanina ^h	m-inositol	D-galacturonato ^d
L-alanin	α -D-lactosa ^a	D
L-alanil-glicina ^h	Maltosa ^a	D
L-asparragina ^h	D-manitol	D-glucuronat
L-aspartato	D-manos	α -hidroxibutirato ^d
L-glutamato ^h	rtato ^h	β t ato ^d
L-histidina	Hidroxil-L-prolina ^h	Glicil-L-glutamato ^h
L-ornitina	L-fenilalanina ^h	L-leucina
L-piroglutamato	D-serina ^h	L-prolina ^h
D,L-carnitina ^h	γ -aminobutirato ^h	L-treonina ^h
Inosina ⁱ	i	U
Fenil etilamina ^k	Putrescin ^k	Timidina
2,3-butanodiol ^e	Glicerol	2-amino etanol ^k
	Glucosa-6-fosfato ^g	D f fato ^g
N-acetil-galactosamina ^a	Lacturosa ^a	N-acetil-D-glucosamina ^a
L-serina	Succinamato ^d	

^aCarbohidratos, ^bésteres, ^cpolímeros, ^dácidos carboxílicos, ^ealcoholes, ^famidas, ^gcompuestos fosforilados, ^haminoácidos, ⁱcompuestos aromáticos y ^kaminas

Para la realización de estas pruebas nutricionales se utilizó el sistema de identificación Biolog (Biolog, Inc., USA), siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 48). Este sistema determina la capacidad de los microorganismos para utilizar (oxidar) un panel preseleccionado de 95 fuentes de carbono diferentes. El sistema proporciona como resultado un perfil característico de pocillos de color púrpura que constituyen la "huella dactilar metabólica" de los microorganismos inoculados (Bochner, 1989a; 1989b). Todos los nutrientes ensayados se encuentran desecados en el fondo de los pocillos, dedicando uno de ellos para el inóculo sin sustrato, como control negativo. De la misma manera, cada pocillo lleva adicionada una sal de tetrazolio, que actúa como aceptor de electrones. En el caso de que la bacteria utilice el sustrato, esta sal toma una coloración púrpura.



Figura 48. Sistema de identificación Biolog

Las cepas se sembraron en placas con medio SW10 y tras un período de incubación de 24 a 48 horas, se procedió a resuspender las bacterias en 20 ml de una solución de sales al 3 %. Para ello se utilizaron bastoncillos de algodón estériles, evitándo arrastrar nutrientes del medio de cultivo. La densidad óptica de las suspensiones se determinó en un espectrofotómetro a 590 nm (Biolog), previamente calibrado con una solución patrón y que debe estar comprendida entre 0,35 y 0,45, correspondiente a una solución estándar, que equivale a una concentración entre 4×10^8 y 6×10^8 microorganismos/ml. La inoculación de las placas Biolog específicas para bacterias Gram-positivas (placas Biolog GP) y para bacterias Gram-negativas (placas Biolog GN) se realizó mediante el uso de una pipeta multicanal de 8 canales (Biolog) y adicionando a cada pocillo 150 μ l de la suspensión bacteriana preparada anteriormente. Tras la inoculación de las placas, éstas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente, se procedió a la lectura automática de las placas. Para ello se utilizó un lector de placas (Biolog) basado en la medida de la absorbancia de cada pocillo a 590 nm.

III.16.1.5. Sensibilidad frente a los antibióticos

Se llevó a cabo un estudio de sensibilidad frente a los antibióticos siguiendo la técnica de discos.

Se emplearon discos comerciales (Difco) de 6 mm de diámetro conteniendo los siguientes antibióticos a las concentraciones que se detallan en la Tabla 25.

Tabla 25. Antimicrobianos utilizados

Ácido nalidíxico	30 μ g/ml
Cloranfericol	30 μ g/ml
Eritromicina	15 μ g/ml
Estreptomicina	10 μ g/ml
Neomicina	30 μ g/ml
Novomicina	30 μ g/ml
Penicilina G	10 U
	5 μ g/ml
Tetraciclina	30 μ g/ml

Las placas de medio SW10 se sembraron con una torunda estéril empapada en un cultivo líquido reciente y a continuación se colocaron 4 ó 5 discos por placa y se incubaron a 37°C. Tras 7 días de incubación se midió el halo de inhibición de cada antibiótico y se

determinó la sensibilidad o resistencia a los mismos de acuerdo a los datos facilitados por la casa comercial.

III.16.2. Caracterización genotípica

III.16.2.1. Determinación del porcentaje guanina mas citosina (G+C) del ADN

III.16.2.1.1. Extracción de ADN

Para extraer el ADN se siguió el método de Marmur (1961), descrito en el apartado III.12.2.2.

III.16.2.1.2. Determinación de la temperatura media de desnaturalización (T_m)

Para esta determinación se utilizó un espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin-Elmer) UV-Vis, a una longitud de onda de 260 nm. Para ello la muestra se calentó desde 50 hasta 110°C a una velocidad constante de 1°C/minuto, mediante un programador de temperatura modelo PTP-1 (Perkin-Elmer). La variación de la DO_{260} en función de la temperatura se recogió en un registrador modelo 561 (Perkin-Elmer), a una velocidad constante de 1 cm/minuto.

La T_m se determinó siguiendo el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976). A partir del valor obtenido, se calculó el porcentaje de G+C mediante la fórmula descrita por Owen y Hill (1979), para un ADN disuelto en una solución salina citratada al 1:10 en agua destilada (SSC 0,1X):

$$\%G+C=(\%G+C)_{mr} +2,08 \times (T_{mp}-T_{mr})$$

siendo $(\%G+C)_{mr}$ el % de G+C del ADN de una cepa de referencia, T_{mr} su temperatura de desnaturalización, y T_{mp} la temperatura de desnaturalización del ADN desconocido.

Como cepa de referencia se utilizó *Escherichia coli* NCTC 9001, cuyo ADN tiene un % G+C igual a 50,9 y un valor de T_m en SSC 0,1X de 74,6°C (Owen y Pitcher, 1985).

III.16.2.2. Hibridación ADN-ADN

III.16.2.2.1. Marcaje del ADN

Para marcar el ADN se utilizó el kit comercial Prime- α -Gene Labeling System (Promega). Mediante este procedimiento se obtuvo una actividad específica media de $8,4 \times 10^6$ cpm/ μ g de ADN. Antes de la hibridación el ADN marcado se desnaturalizó calentándolo a 100°C durante 5 minutos e inmediatamente después, se mantuvo en hielo.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

Agua libre de nucleasa	20 μ l
Tampón de marcaje 5X	10 μ l
Mezcla dNTPs	2 μ l
ADN desnaturalizado	10 μ l
BSA libre de nucleasa	2 μ l
3 H-dCTP	5 μ l
Enzima Klenow	1 μ l
Volumen total	50 μ l

III.16.2.2.2. Procedimiento de hibridación ADN-ADN

Se siguió el método de competición en filtro de membrana, descrito por Johnson (1981) (Figura 49).

Las soluciones con los ADNs competidores se sonicaron a 50W (Braun), mediante dos intervalos de 15 segundos.

Los filtros de membrana (tipo HAHY, Millipore) con el ADN de referencia (25 μ g/cm²) se colocaron en viales de 5 ml con tapón de rosca, junto con el ADN marcado y desnaturalizado y el ADN

competidor desnaturalizado y sonicado. La proporción entre las concentraciones de ADN competidor y de ADN marcado fue al menos 150:1. El volumen final se ajustó a 140 μ l. La concentración final, en la mezcla de reacción fue de SSC 2X y 30% de solución de formamida.



Figura 49. Preparativos de la hibridación



Figura 50. Contador de centelleo

La radiactividad asociada al filtro se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments) (Figura 50) y el porcentaje de hibridación ADN-ADN se calculó utilizando el

La temperatura de hibridación utilizada estaba comprendida entre 45 y 60°C. Este rango de temperatura es aceptable puesto que no rebasa el límite superior permitido para la validez del método de filtro de membrana (De Ley y Tijgat, 1970). Durante la incubación los viales se agitaron ligeramente en baño maría (Grant Instrument). Cada experimento se realizó por triplicado. Después de la hibridación los filtros se lavaron con SSC 2X a la temperatura óptima de renaturalización. La

método de Johnson (1981). Por cada experimento se realizaron tres reacciones independientes y se calcularon los valores medios.

III.16.2.3. Secuenciación del ARNr 16S

III.16.2.3.1. Obtención del ADN

Para la obtención del ADN se siguió el método de CTAB descrito en el apartado III.12.2.1.

III.16.2.3.2. Amplificación del gen ARNr 16S

Para la amplificación del gen ARNr 16S se siguió el método de la PCR como se describe en el apartado III.12.8.

La enzima empleada fue la ADN polimerasa modificada de *Thermus aquaticus* (Lawyer y col., 1989), *Taq* ADN polimerasa (Promega).

Los cebadores utilizados fueron el 16F27 y 16R1488. El cebador 16F27 se une a las posiciones 8 a 27 según la numeración del gen ARNr 16S de *E. coli*. El cebador 16R1488 se une a los nucleótidos complementarios de las posiciones 1511 a 1488. Las condiciones de la PCR están descritas en el apartado II.12.8.

III.16.2.3.3. Análisis filogenético de las secuencias



Figura 51. Logotipo del programa ARB

Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias conocidas de ARNr 16S, usando como referencia regiones que se encuentran conservadas en el gen, así como la estructura secundaria característica del mismo (Woese y col., 1983, Gutell y col., 1985). Para ello se utilizó el programa ARB bajo el sistema operativo

Linux (Ludwig y Strunk, 1996) (Figura 51). ARB es un conjunto de programas desarrollados en la Universidad Técnica de Munich bajo la dirección de W. Ludwig y que aventaja a otros programas en que aún en torno a un programa principal (ARB_NT) un importante número de aplicaciones con las cuales se pueden realizar análisis filogenéticos muy elaborados. ARB utiliza tres algoritmos de construcción de árboles: Neighbour Joining (Saitou y Nei, 1987), Maximum Parsimony (Kluge y Farris, 1969) y Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981); cada uno de ellos representa un modelo evolutivo diferente. El algoritmo de Neighbour Joining utiliza el método de corrección de valores "similarity" para obtener la matriz de semejanza y el método de Jukes-Cantor o Felsenstein (Jukes y Cantor, 1969) para obtener el árbol filogenético.

III.16.3. Caracterización quimiotaxonómica

Para la caracterización quimiotaxonómica de la cepa CP76 se determinó el contenido en ácidos grasos de la misma y de las tres cepas más relacionadas filogenéticamente, concretamente *P. ruthenica* LMG 19699^T, *P. luteoviolacea* NCIMB 1893^T y *P. haloplanktis* subsp. *haloplanktis* IAM 12915^T.

Para ello se inocularon las tres cepas en el mismo medio (agar marino) y se cultivaron a 28°C ya que está descrito que la composición de los ácidos grasos de la membrana varía en función de las condiciones de cultivo y para poder realizar estudios comparativos de los resultados es fundamental que todas las cepas estén cultivadas en las mismas condiciones.

La determinación de los ácidos grasos se llevó a cabo por la Bacterial Culture Collection of Microorganisms (BCCM), Laboratorio de Microbiología de Gante (Bélgica).

IV. RESULTADOS

IV.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CEPAS DE COLECCIÓN

Con el propósito de determinar la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas, se seleccionó un grupo representativo de las mismas pertenecientes a la colección de cultivos que posee nuestro Departamento. Entre las posibles enzimas, se analizó la presencia en estos microorganismos de proteasas, amilasas, DNAsas, lipasas, pululanasa y xilanasas. Debemos indicar que los métodos de detección enzimática que se han utilizado en el presente estudio consistieron en el uso de medios sólidos en placas de Petri; concretamente, se utilizaron placas de agar caseína, agar almidón, agar DNA, Tween 80, agar pululano y agar xilano, respectivamente, adicionadas de un 10% de sales, tal y como se indica en el apartado III.4.3 de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Producción de enzimas extracelulares en bacterias halófilas moderadas de colección

Cepa bacteriana	Amilasa	DNasa	Lipasa	Proteasa
Gram-negativas				
<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T	-	+	+	+
<i>Chromohalobacter israelensis</i> ATCC 43985 ^T	-	-	-	+
<i>Chromohalobacter marismortui</i> ATCC 17056 ^T	-	-	-	-
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043 ^T	-	-	-	-
<i>Halomonas halodurans</i> ATCC 29686 ^T	-	-	-	-
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662 ^T	-	-	-	-
<i>Halomonas magadiensis</i> NCIMB 13595 ^T	-	-	-	-
<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	+	-	-	-
<i>Halomonas pantelleriensis</i> DSM 9661 ^T	-	-	-	-
<i>Halomonas salina</i> ATCC 49509 ^T	-	-	-	-
<i>Halomonas subglaciescola</i> UQM 2926 ^T	-	-	-	-
<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 ^T	-	-	-	-
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i> NCIMB 13595 ^T	-	+	+	-
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortui</i> DSM 8285 ^T	-	+	+	+

Cepa bacteriana	Amilasa	DNasa	Lipasa	Proteasa
Gram-positivas				
<i>Bacillus halophilus</i> ATCC 49085 ^T	-	+	-	+
<i>Marinococcus albus</i> CCM 3317 ^T	-	+	-	-
<i>Marinococcus halophilus</i> DSM 20408 ^T	-	+	-	-
<i>Nesterenkonia halobia</i> ATCC 21727 ^T	+	-	-	-
<i>Salinicoccus roseus</i> DSM 5351 ^T	-	-	-	-
<i>Virgibacillus marismortui</i> DSM 12325 ^T	-	+	+	+
<i>Virgibacillus salexigens</i> ATCC 700290 ^T	-	+	-	-

Como se muestra en la Tabla 26, las actividades hidrolíticas ensayadas estaban ausentes en la mayoría de las cepas estudiadas; además, hay que señalar que en aquellas cepas en las que se observó actividad, la misma no era muy intensa. Por otra parte, tanto la actividad pululanasa como la xilanasa estaban ausentes en todas las cepas de colección ensayadas.

IV.2. SCREENING DE BACTERIAS HALÓFILAS MODERADAS PRODUCTORAS DE HIDROLASAS EXTRACELULARES

En base a los resultados obtenidos, y con el fin de estudiar actividades hidrolíticas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas, se procedió a realizar un amplio screening, para lo cual se hicieron muestreos a partir de diversos ambientes hipersalinos. Así, se recogieron muestras de diferentes salinas del Sur de España concretamente en Cabo de Gata (Almería), San Fernando y San Vicente (Cádiz) e Isla Bacuta, Río Tinto e Isla Cristina (Huelva). Se tomaron un total de 45 muestras en tres muestreos diferentes realizados en Octubre de 1999 (16 muestras), Noviembre de 2000 (18 muestras) y Julio de 2001 (12 muestras).

El rango de salinidades de las muestras se detalla en la Tabla 27.

Tabla 27. Salinidad de las muestras de agua

Lugar de muestreo	Rango de salinidades (%)
Isla Bacuta	8,2-19,2
Río Tinto	3,3
Isla Cristina	9,7-18,4
Cabo de Gata	5,1
San Vicente	3,8-13,9
San Fernando	3,5-15,9

Se aislaron un total de 9.848 bacterias halófilas moderadas, de las cuales 892 producían hidrolasas extracelulares, lo que representa un 9% del total. En la Tabla 28 se muestran las distintas actividades hidrolíticas de las cepas aisladas en el muestreo. Es importante destacar que no se aislaron cepas productoras de xilanasas.

Tabla 28. Producción de enzimas extracelulares en bacterias halófilas moderadas procedentes de distintos muestreos

Lugar de muestreo	AMILASA		DNAse		LIPASA		PROTEASA		PULULANASA		TOTAL
	Agua	Sed.	Agua	Sed.	Agua	Sed.	Agua	Sed.	Agua	Sed.	Total
Isla Bacuta	15	25	-	-	5	7	11	5	37	25	130
Río Tinto	5	10	-	-	5	16	-	2	-	-	38
Isla Cristina	35	17	-	-	13	12	4	2	21	14	118
Cabo de Gata	3	2	-	-	6	4	2	-	-	-	17
San Vicente	59	28	33	5	55	43	37	1	-	-	261
San Fernando	31	39	32	48	13	28	90	47	-	-	328
Total	148	121	65	53	97	110	144	57	58	39	892
	269		118		207		201		97		

En la Tabla 29 se muestran los porcentajes de cepas que presentan actividad hidrolítica con respecto al total de las cepas aisladas y a las cepas productoras.

Tabla 29. Porcentajes de actividades hidrolíticas

	% Respecto a las cepas productoras	% Respecto al total de cepas
Amilasas	30,1	2,7
DNAsas	13,2	1,2
Lipasas	23,2	2,1
Proteasas	22,5	2,0
Pululanastas	10,9	1,0

IV.2.1. Caracterización taxonómica de las cepas productoras de hidrolasas

De todas las cepas aisladas en el muestreo que producían alguna hidrolasa extracelular, elegimos 125, en base al mayor halo de hidrólisis que se observaba en la correspondiente placa; concretamente se eligieron 25 cepas que mostraban cada una de las actividades hidrolíticas ensayadas. A estas 125 cepas se les realizó un estudio más detallado para determinar su posición taxonómica. Las pruebas efectuadas fueron: Tinción de Gram, crecimiento en anaerobiosis, catalasa, oxidasa, rango salino de crecimiento y pruebas nutricionales mediante el sistema de identificación Biolog.

Los resultados obtenidos nos permitieron identificar dichas cepas según se detalla en la Tabla 30. Hay que destacar que en esta tabla se muestra el resultado de 122 cepas ya que a lo largo de este estudio inicial tres de ellas presentaron problemas de contaminación y fueron eliminadas del estudio.

Tabla 30. Identificación taxonómica de 122 aislados capaces de producir diferentes enzimas extracelulares

Género	AMILASA	DNAsa	LIPASA	PROTEASA	PULULANASA	TOTAL
<i>Salinivibrio</i>	11	9	3	16	16	55
<i>Halomonas</i>	4	3	10	2	6	25
<i>Bacillus-Virgibacillus</i>	7	8	5	5	4	29
<i>Salinicoccus</i>	0	0	1	1	0	2
<i>Marinococcus</i>	0	0	1	0	0	1
No identificado	2	1	1	2	2	8
Total	24	21	23	26	28	122

Otro estudio que se realizó a estas 122 cepas consistió en comprobar si eran capaces de producir más de una de estas enzimas extracelulares. El resultado fue que 4 cepas poseían las 5 actividades (2 pertenecen al género *Salinivibrio*, 1 al género *Halomonas* y la otra pertenece al grupo *Bacillus-Virgibacillus*), 38 poseían 4 actividades, 36 presentaban 3 actividades y 20 poseían 2 actividades. En total 98, de las 125 cepas estudiadas poseían más de una actividad hidrolítica, lo que equivale al 78,4%.

IV.2.2. Selección de una cepa halófila moderada con actividad proteolítica

Llegados a este punto, con el fin de profundizar en el estudio de proteasas extracelulares se eligieron aquellas cepas que producían un halo de hidrólisis mayor en las placas de agar caseína. Seleccionamos 45 cepas que fueron inoculadas de nuevo en agar caseína y aquellas que mostraron su actividad hidrolítica más rápidamente fueron de nuevo seleccionadas para realizarles un ensayo cuantitativo de la actividad proteolítica mediante el método Hide Powder Azure. En base a los resultados obtenidos seleccionamos 17 cepas, cuya actividad proteolítica se muestra en la Tabla 31.

Tabla 31. Cuantificación de la actividad proteolítica de las 17 cepas seleccionadas

Cepa		CP32	CP48	CP52	CP55	CP56	CP63	CP70	CP76
Actividad proteolítica (%)	3,9	5,2	18,0	50,4	29,2	39,6	25,6	1,8	92,4

Cepa		CP81	CP82	CP83	CP84	CP85	CP86	CP96
Actividad proteolítica (%)	4,6	1,2	2,1	11,3	12,9	21,5	6,9	1,3

La actividad proteolítica representa el porcentaje de actividad determinado con relación al valor de actividad obtenido en el ensayo de actividad utilizando tripsina como sustrato y al que se le dio el valor de 100%

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó para un estudio más profundo, a nivel bioquímico y molecular, la proteasa producida por la cepa CP76. Esta cepa procedía del muestreo realizado en Isla Cristina (Huelva), de una muestra de agua cuya salinidad era del 9,7%. Además, esta cepa presenta las actividades extracelulares amilasa, lipasa y DNAsa.

IV.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LA CEPA CP76 PARA LA MÁXIMA PRODUCCIÓN DE LA PROTEASA

Inicialmente, se procedió a la determinación del rango salino de crecimiento de la cepa CP76 a distintas concentraciones de sal (0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 y 25%). Para ello, se utilizó el medio de sales SW líquido, con la concentración salina final adecuada en cada caso, se midió la DO_{600} y se determinó la curva de crecimiento de la cepa CP76 para cada una de las salinidades (Figura 52). Los resultados obtenidos indican que la cepa CP76 es capaz de crecer en un rango de concentraciones salinas que

comprende desde 0 hasta un 17,5% de sales totales. Por otro lado, se estimó un rango salino óptimo de crecimiento para esta cepa comprendido entre 7,5 y 10% de sales, en medio complejo SW, a 37°C. También se observa crecimiento, aunque retrasado en el tiempo, en medio sin sal, en SW0,5 y SW1 al igual que en medios con salinidades mayores, SW15 y SW17,5. Por otra parte, también se estudió el crecimiento a 28°C, obteniendo unos resultados muy similares.

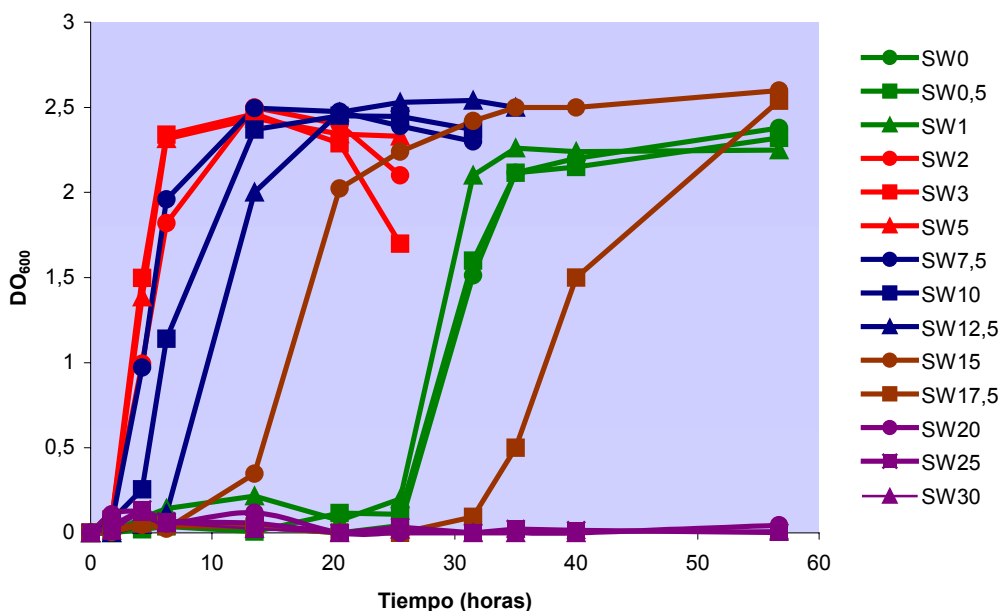


Figura 52. Crecimiento de la cepa CP76 a diferentes concentraciones salinas. A la derecha se muestran las distintas salinidades de los medios de cultivo utilizados desde 0% de sales (SW0) al 30% de sales (SW30)

Con objeto de establecer las condiciones óptimas de cultivo de la cepa CP76 para la máxima producción enzimática, se analizó la influencia de diversos factores tales como: i) las condiciones de oxigenación, ii) la temperatura de cultivo, iii) el tiempo de incubación del cultivo bacteriano (5, 10, 20, 30, 40 y 60 horas), la concentración de sales del medio y por último, iv) la presencia o ausencia de diversos sustratos en el medio. La actividad proteasa se determinó en el sobrenadante de los cultivos celulares incubados en las distintas condiciones, según el método de Hide Powder Azure (Sigma).

i) Condiciones de oxigenación

Hay que destacar que sólo se observó actividad enzimática en el sobrenadante del cultivo bacteriano cuando éste se incubó en condiciones de elevada oxigenación. Por este motivo, siempre se utilizaron matraces, con una capacidad 5 veces mayor que el volumen de cultivo a incubar (50 ml de cultivo en matraces de 250 ml) y se incubaron en un agitador orbital (200 g).

ii) Temperatura

Con respecto a la temperatura no se observaron diferencias significativas en la actividad cuando el microorganismo se incubó a 28 ó a 37°C por lo que elegimos como temperatura de incubación 37°C.

iii) Tiempo de incubación y concentración de sales del medio de cultivo

Utilizando las condiciones de oxigenación y temperatura establecidas, se procedió al estudio de la influencia del tiempo de incubación del cultivo bacteriano y de la salinidad del medio en la actividad del enzima. De los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 53, se aprecia que la concentración de sales totales del medio fue un factor crítico para la actividad proteasa en el sobrenadante de los cultivos. Así, la máxima actividad se obtuvo en el medio que posee un 7,5% de sales. Además, se comprobó que para obtener una óptima actividad eran necesarios cultivos de al menos 12 horas de crecimiento, esto es, cultivos que se encontraban al final de la fase exponencial de crecimiento, detectándose la máxima actividad enzimática en el sobrenadante al cabo de 12 horas, actividad que se mantiene estable hasta 30 horas. No se observó actividad proteolítica en medio sin sales (Figura 53).

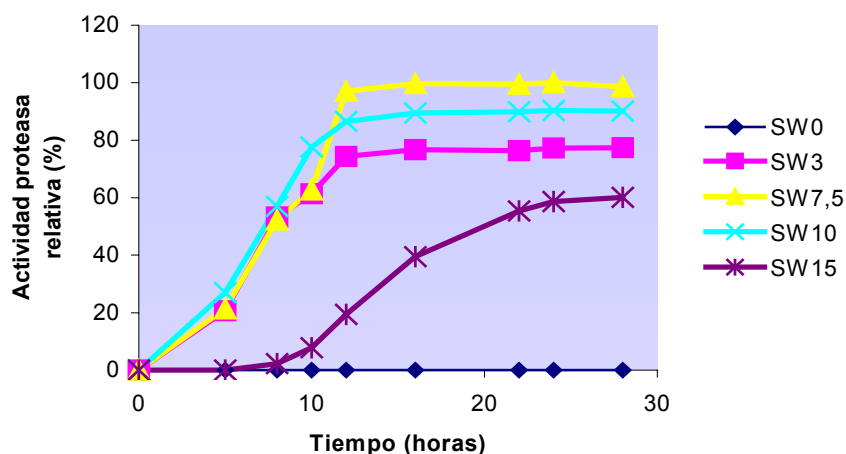


Figura 53. Influencia del tiempo de incubación y de la composición de sales del medio de cultivo en la actividad proteolítica del sobrenadante de la cepa CP76. La actividad proteasa relativa representa el porcentaje de actividad observado con relación al mayor valor de actividad obtenido en el ensayo. A la derecha de la figura se muestra la concentración de sal de cada uno de los medios utilizados desde 0% de sal (SW0) a 15% de sales (SW15)

v) Influencia de la composición del medio

Por último, a fin de determinar la posible influencia de los distintos componentes del medio de cultivo en la producción y secreción de la proteasa, se ensayó y comparó la actividad enzimática en el sobrenadante de cultivos de la cepa CP76 crecidos en distintos medios. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32. Influencia del medio de cultivo en la actividad de la proteasa extracelular de la cepa CP76

Nutriente	Crecimiento celular (DO ₆₀₀)	Actividad proteasa	Producción de ()
Medio SW7,5	1,2	6,3	
Lactosa	1,2	5,8	4,7
Sacarosa	1,2	6,9	6,0
Glicerol	1,2	6,7	5,6
Maltosa	1,3	0,5	0,5
Manitol	1,4	5,0	3,6
Fructosa	1,2	6,7	5,6
Glucosa	1,4	6,6	4,7
NH ₄ Cl	1,4	5,7	4,2
Casaminoácidos	1,6	6,5	4,2
Casaminoácidos + NH ₄ Cl	1,6	4,0	2,4
Caldo nutritivo	1,6	5,2	3,2
Peptona	1,7	6,8	4,0

Para todos los estudios nutricionales se utilizó el medio de cultivo SW7,5 y el nutriente correspondiente (50 mM de cada carbohidrato y NH₄Cl y 1% (p/v) de glicerol, manitol y casaminoácidos). Las muestras fueron obtenidas en la fase estacionaria de crecimiento (24 horas). La actividad proteasa relativa fue determinada asignando el valor de 100% de actividad al ensayo enzimático realizado usando el medio SW7,5. Una unidad de proteasa se define como la cantidad de enzima que produce el equivalente a 1 μ mol de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo definidas

Como se observa en la Tabla 32, al añadir al medio de cultivo sacarosa, glicerol fructosa o glucosa aumenta la actividad proteasa, aunque no varía mucho con respecto al medio SW7,5. Asimismo, cuando se añaden al medio casaminoácidos, peptona o caldo nutritivo, el crecimiento de la cepa CP76 se ve potenciado, aunque la producción de la proteasa se ve disminuida. La maltosa tiene un efecto negativo en la producción enzimática.

Señalaremos que, para obtener una óptima producción enzimática se requieren cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento (cultivos de al menos 12 horas), cultivados en medios con un 7,5% de sales (SW7,5), suplementados con sacarosa (50 mM) y a una temperatura de 37°C.

IV.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA CP76

Una vez determinadas las condiciones experimentales idóneas para el crecimiento de la cepa CP76 que produce la máxima actividad enzimática, se procedió al estudio del sobrenadante. Así, se determinaron los valores óptimos de temperatura, pH y condiciones de salinidad (expresada en % de NaCl) para su actividad (Figura 54).

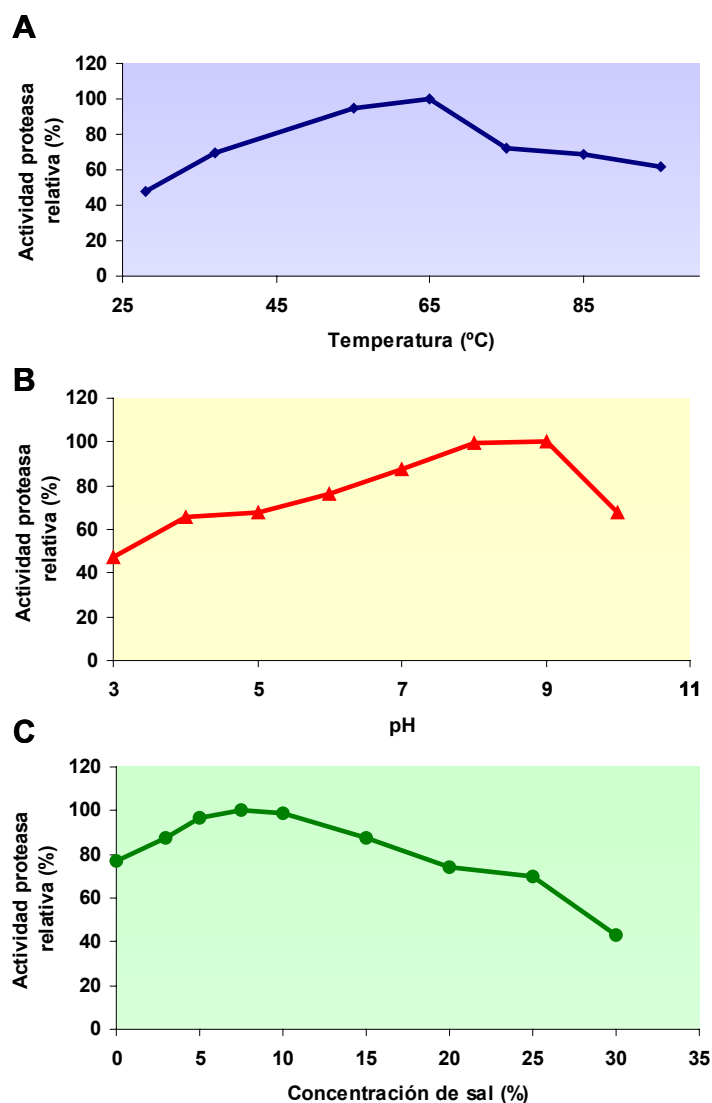


Figura 54. Efecto de la temperatura (A), pH (B) y concentración de sales (C) en la actividad proteolítica del sobrenadante de la cepa CP76

Los cultivos se incubaron en el medio SW7,5 adicionado de sacarosa (50 mM) a 37°C, durante 12 horas y en condiciones de elevada oxigenación. La medida de actividad proteasa se realizó en muestras de sobrenadante y utilizando el método del Hide Powder Azure (Sigma). La actividad proteasa relativa representa el porcentaje de actividad observado con relación al mayor valor de actividad obtenido en el ensayo

Como se muestra en la Figura 54.A se trata de una enzima capaz de actuar en un amplio rango de temperatura, presentando su óptimo de actividad a 65°C. Se observa que a temperaturas más elevadas (95°C) todavía conserva un 60% de actividad, al igual que a temperaturas más bajas. Por otro lado, en relación con el pH (Figura 54.B) el valor óptimo para la actividad enzimática fue de pH 9, pero al igual que sucedía con la temperatura esta enzima es capaz de actuar en un amplio rango de valores de pH, desde 3 hasta 10.

En cuanto a la actividad a las distintas salinidades, se observó que el valor máximo para la actividad proteasa, al igual que para el crecimiento óptimo de la cepa CP76, fue a una concentración de sales de 7,5% (Figura 54C). Asimismo, es importante destacar que se detectó una actividad muy elevada (en torno al 95%) a concentraciones de sales del 5% y 10% así como actividad en ausencia de sal. Por último, a valores altos de salinidad (30%) se detectó una actividad proteasa relativa en torno al 40%.

IV.5. ACTIVIDAD PROTEASA EN LAS DISTINTAS FRACCIONES CELULARES

Se procedió a determinar la actividad proteasa en las distintas fracciones celulares de un cultivo de la cepa CP76 en medio SW7,5 adicionado de sacarosa 50 mM, incubado 24 horas a 37°C en agitación. Los resultados obtenidos indicaron presencia de actividad solamente en la fracción correspondiente al sobrenadante de la muestra, confirmándose así que se trata de una enzima extracelular.

IV.6. PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR PRODUCIDA POR LA CEPA CP76

Una vez determinadas las condiciones de cultivo para la máxima producción de la proteasa (cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento, medio SW7,5 adicionado de sacarosa (50 mM), incubados a 37°C en agitación), la cepa CP76 se cultivó en dichas condiciones. Partimos de dos litros de cultivo que fue centrifugado y el sobrenadante libre de células se dializó para eliminar los restos de sales que podrían interferir en la purificación del enzima. Las proteínas totales se determinaron mediante el Método de Bradford.

Para la purificación de la proteasa se utilizó en primer lugar la columna de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow. Las fracciones activas se concentraron a un menor volumen y como segundo y último paso de purificación se utilizó la columna de filtración en gel Superdex S-200. El manejo y equilibrado de las columnas está descrito en la sección de Material y Métodos.

A la proteína purificada la denominamos haloproteasa CP1.

Los resultados de la purificación se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Purificación de la haloproteasa CP1

Purificación	Proteínas totales (mg)	Actividad total (Unidades) ^a	Actividad específica (Unidades/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadante	30,5	69,2	2,3	1	100
Q-Sepharose	0,162	7,9	48,6	21,4	11,3
Superdex-200	0,015	2,0	133	64,8	2,9

^aUna unidad de proteasa se define como la cantidad de enzima que produce el equivalente a 1 µmol de tirosina por minuto bajo las condiciones de ensayo definidas

Como se observa en la Figura 55, la haloproteasa CP1 presenta un peso molecular de 38 kDa. La confirmación de que la proteína purificada posee actividad proteasa se demuestra a través del correspondiente zimograma, en el que se observa la zona de hidrólisis en la región correspondiente a este peso molecular (Figura 56).

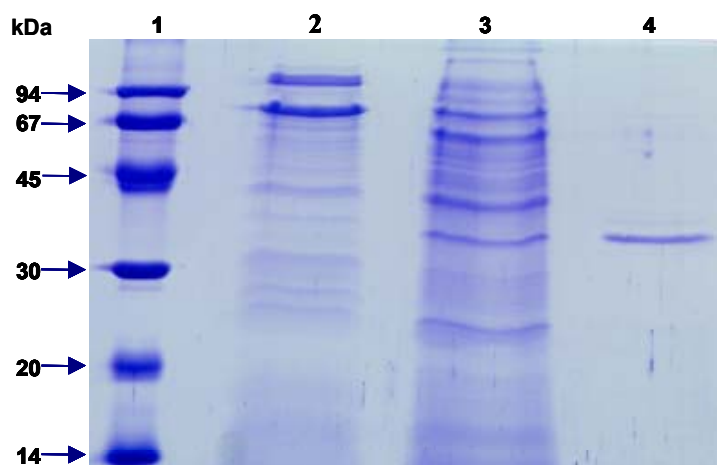


Figura 55. Electroforesis SDS-PAGE de los pasos seguidos en la purificación de la haloproteasa CP1
 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Preparación dializada de extracto crudo del sobrenadante; 3. Preparación de la proteasa después del paso a través de la columna de purificación de Q-Sepharose; 4. Preparación de la proteasa después del paso a través de la columna de purificación de Superdex S-200

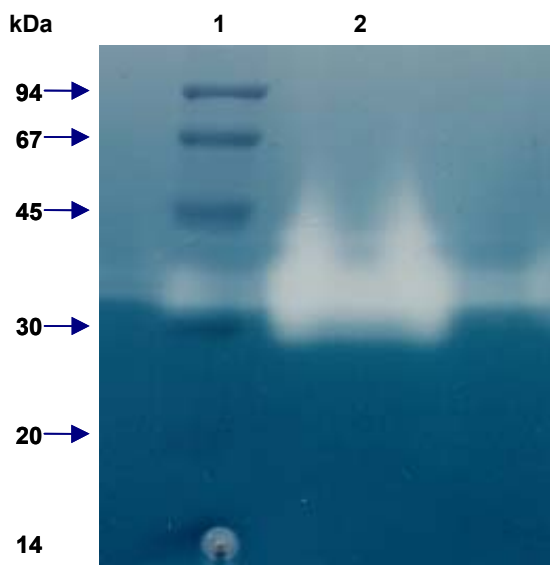


Figura 56. Gel de actividad (zimograma) de la haloproteasa CP1. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Preparación de la proteasa después del paso a través de la columna de purificación de Superdex S-200

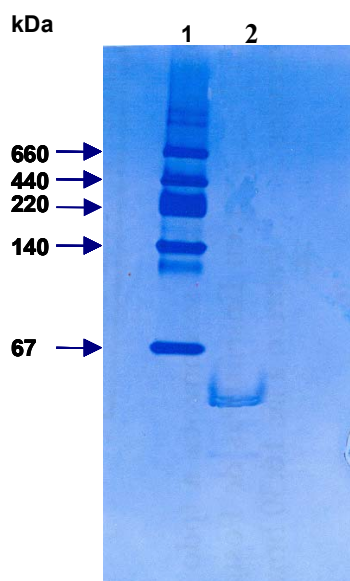


Figura 57. Gel nativo de la haloproteasa CP1.
1. Marcador de pesos moleculares; 2. Haloproteasa CP1

Para determinar la posible estructura cuaternaria de la haloproteasa CP1 se realizó un gel en condiciones nativas (Figura 57) y la presencia de una sola banda nos indicó que se trata de un monómero.

Los estudios cinéticos realizados a la haloproteasa CP1 nos permitieron calcular las constantes cinéticas mediante la aplicación de la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores obtenidos fueron una K_m de $7,1 \mu M$ y una V_{max} de $961 U/mg$. Estos resultados nos indican que la haloproteasa CP1 es muy activa.

IV.7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA HALOPROTEASA CP1

Una vez purificada el enzima procedimos a su caracterización bioquímica. Para ello usamos en ensayo de Kunitz (1947), utilizando siempre $5 \mu l$ ($0,01 U$) de proteína pura y variando en cada caso el parámetro estudiado.

IV.7.1. Determinación de la temperatura óptima de actividad

Para calcular la temperatura óptima de actividad de la enzima variamos la temperatura de incubación de la mezcla de reacción. Se ensayaron las siguientes temperaturas: $25, 37, 45, 55, 65, 75, 85$ y $95^\circ C$. La haloproteasa CP1 es activa en una rango de temperatura comprendido entre 25 y $75^\circ C$. La temperatura óptima de actuación es de $55^\circ C$ (Figura 58.A). El enzima es capaz de retener un 78% y un 30% de actividad a $65^\circ C$ y $70^\circ C$, respectivamente.

IV.7.2. Determinación del pH óptimo de actividad

Para determinar el pH óptimo de actividad se realizó el mismo método de valoración de la actividad proteasa, variándose en este caso el pH de las soluciones tampón utilizadas durante la incubación de la mezcla de reacción. La haloproteasa CP1 presenta actividad en un amplio rango de valores de pH (entre pH $5,5$ y 10), siendo a pH $8,5$ el valor donde ésta actividad es máxima (Figura 58.B). Es interesante destacar que el enzima retenía más de un 50% de su actividad a pH 9 y un 30% a pH 10 .

IV.7.3. Determinación de la concentración de NaCl óptima de actividad

Para determinar la concentración salina óptima de actividad de la enzima, se utilizaron distintas concentraciones de NaCl en la mezcla de reacción, antes de la incubación de la misma. Así, se adicionó NaCl hasta obtener unas concentraciones finales en la mezcla de reacción de 0 a 4 M. Paralelamente se realizó el ensayo sin añadir NaCl.

La haloproteasa CP1 presenta actividad a todas las concentraciones de NaCl ensayadas, presentando un óptimo entre 0 y 1 M (Figura 58C). La enzima presenta más de un 30% de actividad a concentraciones elevadas de NaCl (3 y 4 M).

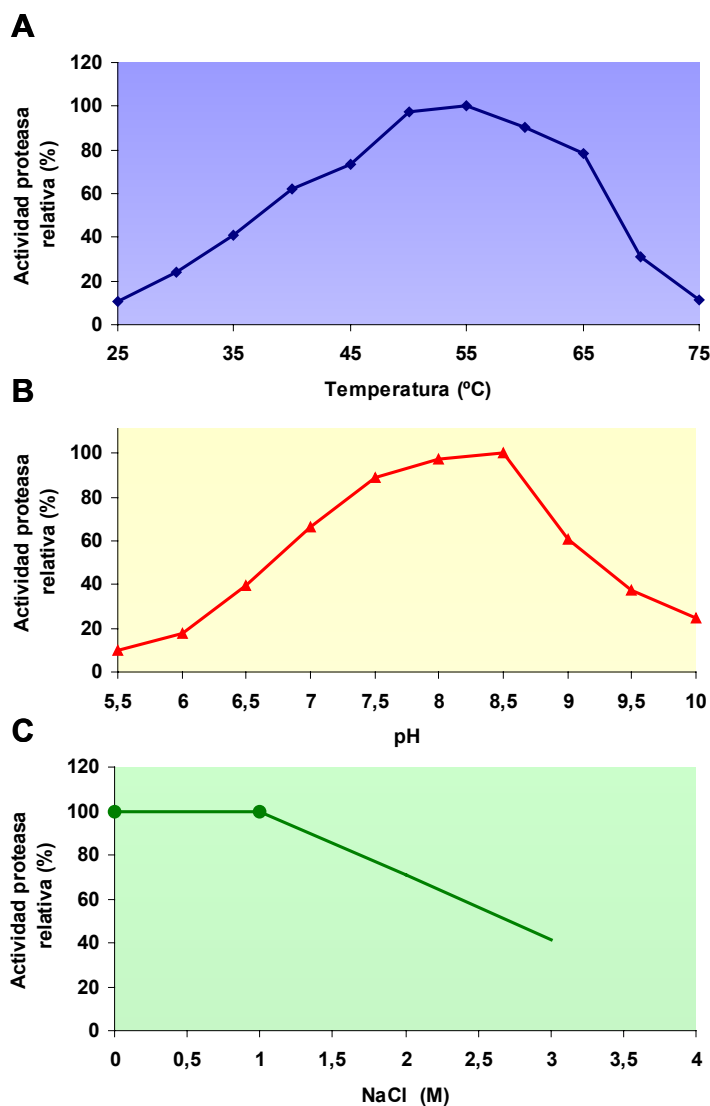


Figura 58. Efecto de la temperatura (A), pH (B) y concentración de NaCl (C) en el tampón de reacción del ensayo enzimático. La actividad relativa representa el porcentaje de actividad observado con relación al mayor valor de actividad en el ensayo

IV.7.4. Estabilidad de la haloproteasa CP1 en diferentes concentraciones de NaCl

Se han realizado estudios de estabilidad del enzima cuando se incubaba a 4°C durante 24 horas en presencia de NaCl a varias concentraciones. Como se deduce de la Figura 59 la haloproteasa CP1 presenta su máxima actividad entre 0 y 2 M de NaCl, conservando hasta un 60% de actividad a 4 M de NaCl, por lo que se trata de una enzima que presenta una alta estabilidad en presencia de sal.

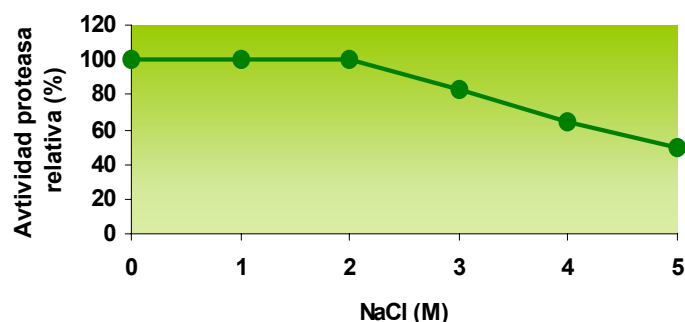


Figura 59. Estabilidad de la haloproteasa CP1 a diferentes concentraciones de NaCl. La actividad proteasa relativa representa el porcentaje de actividad observado con relación al mayor valor de actividad obtenido en el ensayo. Las condiciones del ensayo se detallan en el apartado III.9.4. de Material y Métodos

IV.7.5. Determinación de la termoestabilidad de CP1

Con respecto a la termoestabilidad, la haloproteasa CP1 conserva un 60% de actividad después de 60 minutos a 50°C. Hay que decir que a su temperatura óptima de actividad, 55°C, la haloproteasa no resultó muy termoestable perdiéndose completamente la actividad a las 3 horas de incubación (Figura 60).

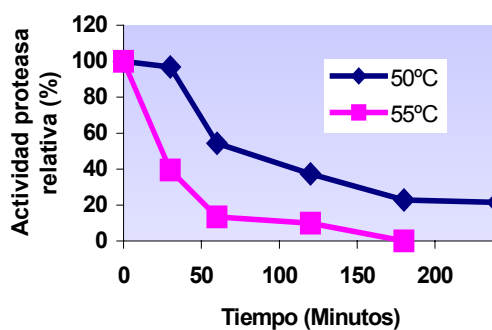


Figura 60. Estabilidad de la haloproteasa CP1 cuando se incubaba a 50 y 55°C. La actividad proteasa relativa representa el porcentaje de actividad observado con relación al mayor valor de actividad obtenido en el ensayo

IV.7.6. Influencia de inhibidores enzimáticos en la actividad de la haloproteasa CP1

Para clasificar la haloproteasa CP1 dentro de algunos de los tipos de proteasas conocidos se realizó el ensayo enzimático usando distintos inhibidores específicos que se describen en Material y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 34. La actividad del enzima fue inhibida hasta un 40% por el quelante de metales EDTA; igualmente la actividad se vio disminuida por PMSF, Pefabloc y aprotinina, inhibidores específicos de serina proteasas.

Tabla 34. Efecto de distintos inhibidores en la actividad de la haloproteasa CP1

Inhibidor	Concentración (mM)	Actividad residual (%) ^a
Control	-	100
Antipaina	1	
Bestatina	0,5	100
Quimostatina	0,5	100
E-64	0,5	
EDTA-Na	10	59
Leupeptina	0,5	100
Pepstatina	0,1	100
Fosforamidón	1	112
Pefabloc		81
		66
PMSF	10	
	20	13
Aprotinina		87

^aLa actividad residual se determinó asignando el valor de 100% de actividad al ensayo enzimático realizado sin ningún inhibidor

IV.7.7. Influencia de metales en la actividad de la haloproteasa CP1

Para estudiar la influencia de los metales en la actividad proteasa se realizó el ensayo enzimático añadiendo al tampón de reacción distintos metales a las concentraciones de 5 y 10 mM (Tabla 35). Ninguno de los metales ensayados provocó un aumento en la actividad. Iones como el níquel, cobre, zinc o manganeso provocaron una drástica pérdida de actividad de la haloproteasa CP1.

Tabla 35. Efecto de distintos metales en la actividad de la haloproteasa CP1

Iones	Concentración (mM)	Actividad residual (%) ^a
Control	-	100
NiCl ₂	5	0
	10	0
CuCl ₂	5	0
	10	0
MgCl ₂	5	80
	10	74
ZnCl ₂	5	10
	10	0
CaCl ₂	5	67
	10	
MnCl ₂	5	15
	10	4
BaCl ₂	5	46
	10	42
CoCl ₂	5	31
	10	24
S ₂ Cl	5	95
	10	73

^aLa actividad residual se determinó asignando el valor de 100% de actividad al ensayo enzimático realizado sin ningún metal

IV.7.8. Capacidad de la haloproteasa CP1 de actuar sobre diferentes sustratos

Para determinar los sustratos sobre los que la haloproteasa CP1 podía actuar se procedió a realizar el ensayo enzimático variando en este caso el sustrato del ensayo. Se utilizó caseína, gelatina, azocaseína, seroalbúmina, ovoalbúmina y queratina. La haloproteasa CP1 mostró su máxima actividad cuando se usó caseína como sustrato. Por otro lado, se observó un 83% de actividad con azocaseína y en torno al 20% con gelatina y albúmina. No se detectó ninguna actividad frente a queratina.

IV.7.9. Influencia de diferentes compuestos en la actividad de la haloproteasa CP1

Siguiendo la caracterización bioquímica de la haloproteasa CP1, se estudió la actividad de la misma en medios de reacción adicionados de distintos compuestos, tales como urea, SDS, sulfato amónico, guanidina HCl, 2-mercaptoetanol y ditioneitol (Tabla 36). La actividad proteolítica de la haloproteasa CP1 fue inhibida por distintas concentraciones de SDS, sulfato amónico y guanidina HCl, al igual que cuando se añade ditioneitol y 2-mercaptoetanol. La adición de 0,8 M de urea produce un leve aumento en la

actividad de la enzima, aunque la adición de urea a una concentración superior (1,6 M) produce una inhibición de la misma (Tabla 36).

Tabla 36. Efecto de distintos sustratos en la actividad de la haloproteasa de CP1

Reactivo	Concentración	Actividad residual (%) ^a
Control	-	100
Sulfato amónico	0,2 M	79
	0,4 M	56
SDS	0,1%	28
	0,5%	13
Urea	0,8%	114
	1,6%	18
Guanidina HCl	0,4 M	82
	0,8 M	51
	1,6 M	27
2-Mercaptoetanol	1 mM	98
	10 mM	60
Ditiotreitol	1 mM	34
	10 mM	0

^aLa actividad residual se determinó asignando el valor de 100% de actividad al ensayo enzimático realizado sin ningún compuesto

IV.7.10. Determinación de la secuencia del extremo N-terminal de la haloproteasa CP1

La identificación del extremo N-terminal de proteínas y péptidos es esencial para la caracterización estructural y funcional de los dominios proteicos. Para la obtención de la secuencia N-terminal de la haloproteasa CP1 se procedió a la realización de un Western Blotting con la enzima purificada. La secuencia N-terminal de proteínas y péptidos se determinó usando repetidas veces los ciclos de degradación de Edman. La secuenciación se realizó en el Laboratorio del Dr. M. Rossi (Instituto de Bioquímica de las Proteínas, Nápoles, Italia).

La secuencia N terminal de la haloproteasa CP1 es la siguiente:

<p>Secuencia N-terminal de la haloproteasa CP1 A-D-A-T-G-P-G-G-N-Q-K-T-G-Q-Y-N-Y</p>

IV.8. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LA CEPA CP76

IV.8.1. Filogenia

Con el fin de determinar la posición filogenética de la cepa CP76, se procedió a la amplificación del gen que codifica el ARNr 16S mediante PCR, usando los cebadores 16F27 y 16R1488 (Figura 61).

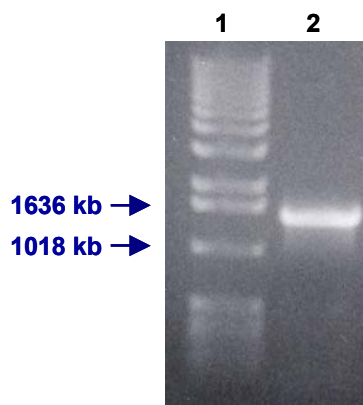


Figura 61. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación del gen ARNr 16S mediante PCR. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Fragmento amplificado correspondiente al gen ARNr 16S de la cepa CP76

La región amplificada, de aproximadamente 1500 pb, se secuenció y se alineó usando como referencias secuencias de estructuras primarias y secundarias conservadas universalmente, utilizando el programa ARB (Ludwig y Strunk, 1996). Después de realizar el correspondiente análisis comparativo del gen que codifica el ARNr 16S de la cepa CP76 con las otras secuencias de ARNr 16S disponibles en las bases de datos se observó que existe una alta semejanza entre la cepa CP76 y especies del género *Pseudoalteromonas*. La topología del árbol filogenético fue muy semejante independientemente del algoritmo utilizado (Neighbour-Joining, Maximum-likelihood y Maximum-parsimony). La Figura 62 corresponde al árbol filogenético que se obtuvo utilizando el algoritmo de Neighbour-Joining en el que se muestra la relación filogenética de la cepa CP76 con otras especies del género *Pseudoalteromonas*.

En la Tabla 37 se muestra la matriz de semejanza de la cepa CP76 y las especies del género *Pseudoalteromonas* más relacionadas filogenéticamente calculada mediante la ecuación de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). La mayor semejanza (99,6%) se obtuvo con la especie *Pseudoalteromonas rutherfordiana*, una bacteria marina aislada de un molusco en Rusia (Ivanova y col., 2002b).

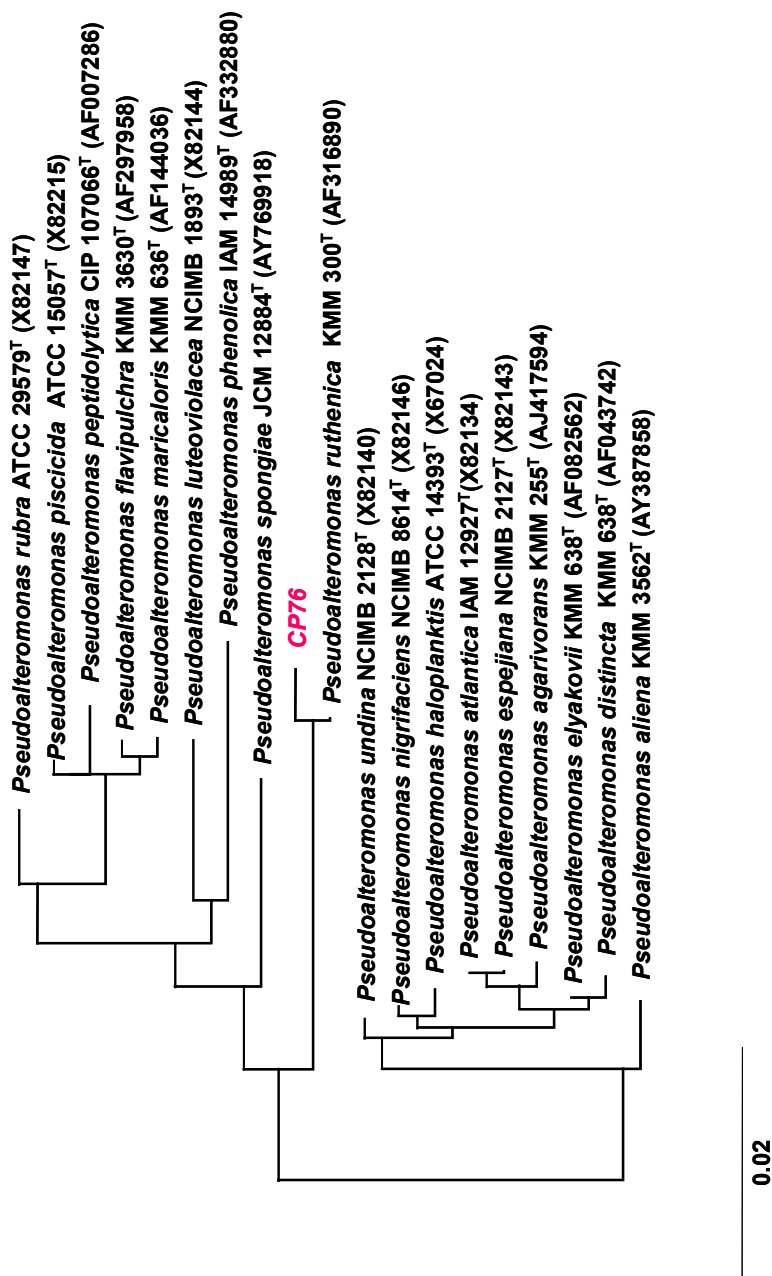


Figura 62. Árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo Neighbour-Joining, mostrando la posición filogenética de la cepa CP76 y las especies del género *Pseudoalteromonas* relacionadas. Entre paréntesis se muestra el número de depósito en las bases de datos de las secuencias utilizadas en el análisis

Tabla 37. Matriz de semejanza de las secuencias de ARNr 16S de la cepa CP76 y otras especies del género *Pseudoalteromonas* relacionadas filogenéticamente

Microorganismo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CP76	1	0,996	0,958	0,941	0,951	0,952	0,952	0,953	0,950	0,950
2. <i>P. ruthenica</i>	0,996	1	0,962	0,944	0,954	0,956	0,955	0,957	0,953	0,954
3. <i>P. spongiae</i>	0,958	0,962	1	0,967	0,974	0,972	0,965	0,967	0,965	0,969
4. <i>P. phenolica</i>	0,942	0,944	0,967	1	0,972	0,968	0,958	0,960	0,958	0,969
5. <i>P. luteoviolacea</i>	0,951	0,954	0,974	0,972	1	0,984	0,974	0,974	0,973	0,981
6. <i>P. rubra</i>	0,952	0,956	0,972	0,968	0,984	1	0,985	0,985	0,982	0,989
7. <i>P. maricalbris</i>	0,952	0,955	0,965	0,958	0,974	0,985	1	0,998	0,992	0,998
8. <i>P. espegiana</i>	0,953	0,957	0,967	0,960	0,974	0,985	0,998	1	0,994	0,998
9. <i>P. peptidolytica</i>	0,950	0,953	0,965	0,958	0,973	0,982	0,992	0,994	1	0,996
10. <i>P. piscicida</i>	0,950	0,954	0,969	0,969	0,981	0,989	0,998	0,998	0,996	1

IV.8.2. Caracterización fenotípica

La cepa CP76 presenta colonias pequeñas de 0,5-1 mm de diámetro, de borde liso, cremosas y con pigmentación anaranjada (Figura 63). Se trata de un bacilo Gram-negativo, aerobio estricto, móvil y que presenta un tamaño de 0,3-0,5 x 1,0-4,0 μm (Figura 64).



Figura 63. Colonias de la cepa CP76 en medio SW7,5

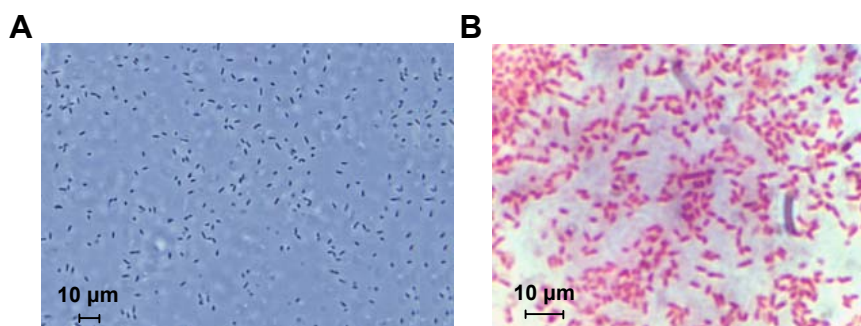


Figura 64. A. Preparación en fresco de la cepa CP76; B. Tinción de Gram de la cepa CP76

Como ya se mencionó anteriormente en el apartado IV.3, esta cepa es capaz de crecer en un amplio rango salino que comprende desde 0 hasta 17,5% de sales (Figura 52), con un crecimiento óptimo entre 7,5-10% de sales. En la Tabla 38 se muestran las principales características de crecimiento de la cepa CP76 y de *Pseudoalteromonas ruthenica*.

Tabla 38. Características de crecimiento de la cepa CP76 y *P. ruthenica*

Característica	CP76	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> LMG 19699 ^T
Requerimiento de NaCl	0-17,5% (óptimo 7,5-10%)	1-9% (óptimo 1-3%)
Temperatura	15-40°C (óptimo 28-37°C)	10-35°C (óptimo 25-30°C)
pH	6-9 (óptimo 7,5)	6-10 (óptimo 7,5-8)

En la Tabla 39 se muestran las características bioquímicas de la cepa CP76 comparadas con las de *P. ruthenica*.

Tabla 39. Características bioquímicas de la cepa CP76 y *P. ruthenica*

Pruebas	CP76	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> LMG 19699 ^T
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	+
Hidrólisis de:		
Almidón	+	+
Caseína	+	+
Gelatina	+	+
DNA	+	+
Tween 80	+	+
Agar	-	-
Quitina	-	-
Producción de indol	-	-
Reducción de nitratos y nitritos	-	-
Rojo de metilo	+	ND
Voges-Proskauer	-	ND
Citrato de Simmons	-	ND
Fosfatasa	-	ND
Ureasa	-	-
Producción de H ₂ S	-	-
Lisina descarboxilasa	-	ND
Ornitina descarboxilasa	-	ND
Fenil alanina desaminasa	-	ND
Producción de ácidos a partir de:		
Glucosa	-	+
Lactosa	-	-
Maltosa	+	-
Glicerol	-	-

ND, no determinado

Con respecto a la resistencia o sensibilidad a diferentes compuestos antimicrobianos, la cepa CP76 resultó ser resistente a todos los agentes ensayados utilizando el método de discos. Estos fueron: ácido nalidíxico (30 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml), eritromicina (15 µg/ml), estreptomycin (10 µg/ml), neomicina (30 µg/ml), novomicina (30 µg/ml), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg/ml) y tetraciclina (30 µg/ml).

Los resultados referentes a las características nutricionales se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40. Características nutricionales de la cepa CP76 determinadas mediante el sistema Biolog. Se muestran sombreados aquellos sustratos que son utilizados por la cepa CP76

α -ciclodextrina ^c	D-melibiosa ^a	γ -hidroxibutirato ^d
Dextrina ^c	β -metil-D-glucósido ^a	p-hidroxifenilacetato ^d
Glucógeno ^c	D-psicosa ^a	Itaconato ^d
Tween-40 ^c	D-rafinosa ^a	α -ketobutirato
Tween-80 ^c	L-ramnosa	α -ketoglutarato ^d
D-sorbitol ^a	α -ketovalerato ^d	Sacarosa ^a
D,L-lactato ^d	adonito ^a	D-trehalosa ^a
Malonato ^d	L-arabinosa ^a	Turanosa ^a
Propionato ^d	D-arabitol ^a	Xilitol ^a
Quinato ^d	Celobiosa ^a	Metil piruvato ^b
D-sacarato ^d	i-eritritol ^a	Mono-metil-succinato ^b
Sebazato ^d	D-fructosa ^a	Acetato ^d
Succinato ^d	L-fucosa ^a	Cis-aconitato ^d
Bromosuccinato ^j	D-galactosa ^a	Citrato ^d
Glucuronamida ^f	Gentiobiosa ^a	Formianato ^d
Alaninamida ^f	α -D-glucosa ^a	Lactona-D-galactonato ^d
D-alanina ^h	m-inositol ^a	D-galacturonato ^d
L-alanina ^h	α -D-lactosa ^a	D-gluconato ^d
L-alanil-glicina ^h	Maltosa ^a	D-glucosaminato ^d
L-asparragina ^h	D-manitol ^a	D-glucuronato ^d
L-aspartato ^h	D-manosa ^a	α -hidroxibutirato ^d
L-glutamato ^h	Glicil-L-aspartato ^h	β -hidroxibutirato ^d
L-histidina ^h	Hidroxi-L-prolina ^h	Glicil-L-glutamato ^h
L-ornitina ^h	L-fenilalanina ^h	L-leucina ^h
L-piroglutamato ^h	D-serina ^h	L-prolina ^h
D,L-carnitina	γ -aminobutirato ^h	L-treonina ^h
Inosina ⁱ	Uridina ⁱ	Urocanato ⁱ
Fenil etilamina ^k	Putrescina ^k	Timidina
2,3-butanodiol ^e	Glicerol ^e	2-amino etanol ^k
Glucosa-1-fosfato ^g	Glucosa-6-fosfato ^g	D,L, α -glicerolfosfato ^g
N-acetil-galactosamina	Lacturosa ^a	N-acetil-D-glucosamina ^a
L-serina ^h	Succinamato ^d	

^aCarbohidratos, ^bésteres, ^cpolímeros; ^dácidos carboxílicos, ^ealcoholes, ^famidas, ^gcompuestos fosforilados, ^haminoácidos, ⁱcompuestos aromáticos y aminas

La cepa CP76 se encuentra depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo y su número de depósito es CECT 5782.

IV.8.3. Caracterización genotípica

IV.8.3.1. Determinación del porcentaje guanina mas citosina (G+C) del ADN

La temperatura media de fusión (Tm) del ADN de la cepa CP76 es de 74,02°C. A partir del valor de Tm obtenido, se calculó el porcentaje de G+C mediante la fórmula de Owen y Hill (1979), siendo el valor calculado de 49,7 moles%.

Debido al alto porcentaje de semejanza obtenido entre el gen que codifica el ARNr 16S de la cepa CP76 y el gen que codifica el ARNr 16S de *Pseudoalteromonas ruthenica* (99% de semejanza) se decidió realizar ensayos de hibridación ADN-ADN que nos permitieran determinar si nuestro aislamiento se podía asignar a la especie *P. ruthenica*, o constituía una especie nueva dentro del género *Pseudoalteromonas*. Para ello, se eligieron las cepas *P. ruthenica* y *P. luteoviolacea* por ser las más cercanas filogenéticamente a la cepa CP76 y *P. haloplanktis* subsp. *haloplanktis* por ser la cepa tipo del género.

Los resultados de estas hibridaciones ADN-ADN entre la cepa CP76 y las cepas tipo de *Pseudoalteromonas ruthenica*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *haloplanktis* y *Pseudoalteromonas luteoviolacea* se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41. Contenido en G+C del ADN y porcentajes de hibridación ADN-ADN entre la cepa CP76 y algunas especies del género *Pseudoalteromonas* relacionadas filogenéticamente

Organismo	Contenido G+C (moles%)	Hibridación con ³ H-ADN de CP76 (%)	Hibridación con ³ H-ADN de <i>P. ruthenica</i> LMG 19699 ^T (%)
	49,7	100	77
<i>P. ruthenica</i> LMG 19699 ^T	48,4-48,9 ^a	100	100
<i>P. haloplanktis</i> subsp. <i>haloplanktis</i> IAM 12915	43,3 ^b	0	4
<i>P. luteoviolacea</i> NCIMB 1893 ^T	42,0 ^b	0	0

^a Ivanova y col. (2002a)

^b Ivanova y col. (2002b)

IV.8.4. Caracterización quimiotaxonómica

En la Tabla 42 se muestra el contenido en ácidos grasos de la cepa CP76 y de las especies de *Pseudoalteromonas* relacionadas.

El ácido graso mayoritario en el caso de la cepa CP76 es C_{16:0} al igual que en *P. ruthenica* y *P. haloplanktis* subsp. *haloplanktis*, mientras que en *P. luteoviolacea* el ácido graso mayoritario es C_{17:1}ω8c.

Tabla 42. Contenido en ácidos grasos (expresados en porcentaje) de la cepa CP76 y algunas especies del género *Pseudoalteromonas* relacionadas

Ácido graso	Cepa CP76	<i>P. ruthenica</i> LMG 19699 ^T	<i>P. haloplanktis</i> subsp. <i>haloplanktis</i> IAM 12915 ^T	<i>P. luteoviolacea</i> NCIMB 1893 ^T
C _{12:0}	3,2	3,8	2,3	<1
C _{13:0}	1,0	3,8	<1	<1
C _{14:0}	5,0	11,2	1,0	1,5
C _{15:0}	3,5	9,3	6,7	4,5
C _{16:0}	21,8	16,0	18,6	7,2
C _{17:0}	4,3	3,8	6,7	3,3
C _{18:0}	1,6	<1	1,4	<1
C _{14:0 iso}	<1	1,2	<1	<1
C _{16:0 iso}	1,3	<1	<1	<1
C _{15:1 ω6c}	<1	1,1	<1	1,1
C _{15:1 ω8c}	1,7	2,4	3,2	3,3
C _{16:1 ω9c}	2,1	1,8	<1	<1
C _{17:1 ω6c}	<1	<1	<1	1,3
C _{17:1 ω8c}	7,7	5,0	12,1	15,9
C _{18:1 ω7c}	6,4	2,5	1,2	9,0
C _{18:1 ω9c}	1,2	<1	<1	<1
C _{10:0 3-OH}	<1	<1	<1	1,9
C _{11:0 3-OH}	<1	1,2	1,0	5,5
C _{12:0 3-OH}	5,8	7,1	4,7	7,0
C _{12:0 iso 3-OH}	1,3	1,1	<1	1,0

En base a los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica, quimiotaxonómica y genotípica, así como a la estrecha relación filogenética de la cepa CP76 y *Pseudoalteromonas ruthenica*, concluimos que dicha cepa pertenece a ésta especie, por lo que a partir de este momento nos referimos a la cepa CP76 como *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76.

IV.9. CLONACIÓN DEL GEN DE SÍNTESIS DE LA HALOPROTESA CP1

IV.9.1. Obtención de mutantes de *P. ruthenica* CP76 con fenotipo proteasa negativo

IV.9.1.1. Mutagénesis con el transposón Tn1732

Para la clonación del gen que codifica la síntesis de la haloproteasa CP1 se intentó la obtención de mutantes con fenotipo proteasa negativo. Se procedió a obtener, en primer lugar, diversos mutantes resistentes a la rifampicina de la cepa *P. ruthenica* CP76 (*P. ruthenica* Rif^R) tal y como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Seguidamente se utilizó la técnica de mutagénesis al azar mediante el uso del transposón Tn1732, perteneciente a la familia de los transposones Tn3, cuya efectividad ha sido demostrada en las especies halófilas moderadas *H. elongata* y *H. meridiana* (Kunte y Galinski, 1995; Cánovas y col., 1997a, Coronado y col., 2000b). Para ello, se realizaron conjugaciones biparentales entre *E. coli* SM10, como cepa donadora del plásmido suicida pSUP102-Gm::1732 y la cepa *P. ruthenica* CP76 Rif^R como receptora. De estas conjugaciones se obtuvieron un total de 6.775 transconjugantes. A pesar de intentar el experimento en repetidas ocasiones, variando las proporciones de donador:receptor en las conjugaciones, no se consiguió ningún mutante con fenotipo proteasa negativo.

IV.9.2. Construcción de un banco de genes de *P. ruthenica* CP76

También se ha trabajado en la construcción de una genoteca de *P. ruthenica* CP76. Como cósmidos de clonación se usaron 3 diferentes. En primer lugar se utilizó el vector pVK102 (Knauf y Nester, 1982), un plásmido de amplio rango de hospedador resistente a la kanamicina y a la tetraciclina. Otro cósmido usado es el pHc79, derivado del vector pBR322 de un tamaño de 6 kb y resistente a la ampicilina (Hohn y Collins, 1980). Por último, también se ha utilizado el cósmido SuperCos1, un vector de un tamaño de 7,9 kb y resistente a la ampicilina (Stratagene). Con respecto al ADN total, se procedió a digerirlo con diferentes enzimas de restricción (*Hind*III, *Sal*I, *Pst*I, *Sau*3AI). Para la selección de los fragmentos de tamaño adecuado (30-40 kb) se utilizaron diferentes procedimientos como la electroelución directa del gel, así como mediante gradiente de sacarosa o su digestión optimizando el tiempo y la cantidad de enzima. Como sistema de empaquetamiento se han utilizado dos diferentes: Packagene® Lambda DNA Packaging System (Promega) y Gigapack® III Gold Packaging extract (Stratagene). A pesar de todos los esfuerzos realizados, si bien lográbamos obtener algunos clones, en ninguno de los casos estos eran representativos del genoma de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76.

IV.9.3. Clonación de la haloproteasa CP1 mediante PCR inversa

IV.9.3.1. Obtención de una sonda de la haloproteasa CP1

En primer lugar se realizó un análisis (BLAST) con la secuencia de aminoácidos derivada del extremo N-terminal de la haloproteasa CP1, usando el servidor y las bases de datos del NCIB. Una vez seleccionadas las proteínas (Tabla 43) que mostraban una mayor similitud, se procedió a realizar un alineamiento mediante el programa MegAlign (DNASTar), con las secuencias de proteínas que mostraban mayor similitud con el extremo N-terminal de la haloproteasa CP1. En el diseño de los cebadores se tuvo en cuenta el uso de codones más frecuente en especies del mismo género. De esta manera, se diseñaron los cebadores Aminoprol y Aminoproll. Por otro lado, en base a las regiones más conservadas del alineamiento se diseñaron los cebadores ProL y ProR (Figura 65).

Tabla 43. Proteasas de diferentes bacterias Gram-negativas utilizadas para el alineamiento con el extremo N-terminal de la haloproteasa CP1

Especie bacteriana	Proteína	Longitud (aa)	Nº de acceso	Referencia
<i>Aeromonas punctata</i>		595	BAA95457	Kawakami y col. (2000)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Elastasa AhpB	588	AAF07184	Cascón y col. (2000)
<i>Aeromonas punctata</i>	Proteasa ProAC	590	BAA82875	Nirasawa y col. (1999)
<i>Listonella anguillarum</i>	Metaloproteasa EmpA	611	P43147	Milton y col. (1992)
<i>Vibrio proteolyticus</i>	Proteasa NprV	609	Q00971	David y col. (1992)
<i>Vibrio cholerae</i>	Proteasa Hap	609	P24153	Hase y Finkelstein (1991)
<i>Vibrio vulnificus</i>	Metaloproteasa	606	AAC45343	Jeong y col. (2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Elastasa LasB	491	P14756	Bever y col. (1988)

Utilizando combinaciones de estos cuatro cebadores, se realizaron diversas reacciones de PCR utilizando como molde el ADN genómico de *P. rutherfordiana* CP76 para la amplificación de un fragmento que correspondiese al gen que codifica la haloproteasa CP1. Con los cebadores Aminoproll y ProR esperábamos un fragmento de aproximadamente 500 pb y con los cebadores ProL y ProR un fragmento de aproximadamente 325 pb, que se observan en la Figura 66.

El fragmento amplificado de 503 pb, CPA, fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO y al plásmido resultante se le denominó pCP1. Para confirmar que habíamos amplificado el extremo N-terminal de la haloproteasa CP1, se secuenció el inserto y se realizó una comparación (BLAST) con las secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos.

La secuencia de aminoácidos correspondiente a dicho fragmento CPA presentó homología con diversas metaloproteasas depositadas en las bases de datos. La mayor similitud (85%) la mostró con la Metaloproteasa I producida por *Alteromonas* sp O-7 (Miyamoto y col., 2002).

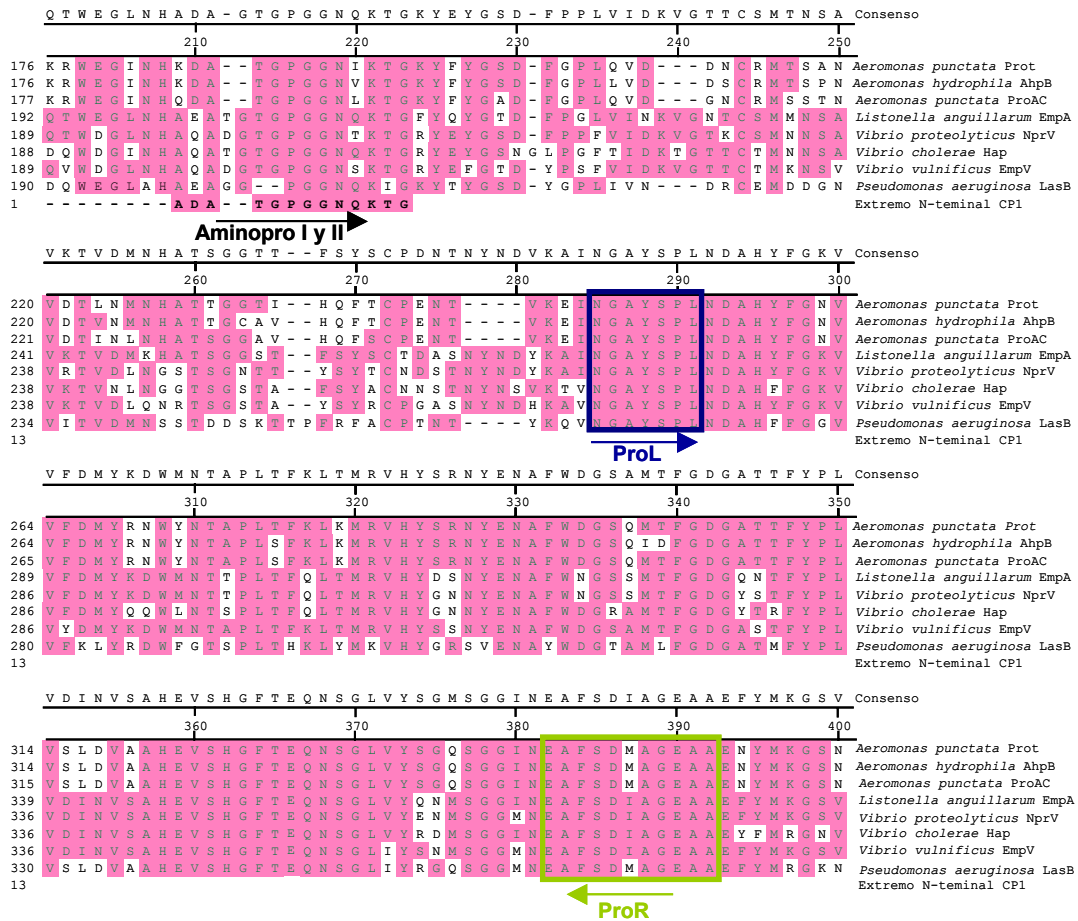


Figura 65. Alineamiento de la secuencia N-terminal de la haloproteasa CP1 y las proteínas de mayor similitud depositadas en las bases de datos, utilizando el programa MegAling (DNASTar). Los aminoácidos idénticos aparecen sombreados en rosa. Las flechas indican las zonas utilizadas para el diseño de los correspondientes cebadores. La referencia de las proteínas utilizadas en el alineamiento se muestra en la Tabla 43

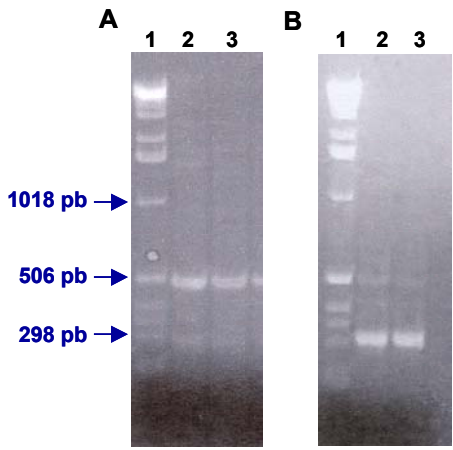


Figura 66. A. Fragmento de ADN amplificado utilizando los cebadores Aminoprolyl y ProR. 1, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; 2 y 3. Fragmento amplificado de 503 pb (CPA). B. Fragmento de ADN amplificado utilizando los cebadores ProL y ProR. 1, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; 2 y 3. Fragmento amplificado de 327 pb. En ambos casos se utilizó como molde ADN de *Pseudoalteromonas rutenica* CP76

IV.9.3.2. PCR inversa para la obtención del gen *cp1*

Para obtener el gen completo de la haloproteasa CP1 se utilizó la técnica de PCR inversa, a partir del fragmento ya conocido de la misma incluido en el clon pCP1. Para ello se utilizó dicho fragmento de 503 pb como sonda marcada con digoxigenina (Sonda CPA). El ADN total de *P. ruthenica* CP76 se digirió con diferentes restrictasas que se conocía que no cortaban a la sonda CPA. Después de realizar la correspondiente transferencia mediante Southern blot, el ADN total de la cepa digerido con cada una de las enzimas seleccionadas (*Bam*HI, *Bgl*I, *Clal*, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Mlu*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I y *Xba*I) se hibridó con la sonda CPA, para elegir un fragmento de restricción de tamaño apropiado, para ser posteriormente amplificado por PCR inversa. Tras el revelado de la membrana que se muestra en la Figura 68, se eligieron los fragmentos originados con *Dra*I, de aproximadamente 3,8 kb (carril G) y *Sal*I, de aproximadamente 2,6 kb (carril Ñ).

Para amplificar estos fragmento por PCR inversa se diseñaron unos cebadores específicos a partir de la secuencia de CPA, en sentido divergente, que se denominaron CP1inv1, CP1inv2, CP1inv3 y CP1inv4 (Figura 67). Se procedió a realizar la PCR inversa digiriendo el ADN total de *P. ruthenica* CP76 con las enzimas elegidas (*Dra*I y *Sal*I) tal y como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Los cebadores que dieron resultado en ambos casos fueron CP1inv2 y CP1inv4. Los fragmentos obtenidos, de 2.603 pb a partir del ADN total digerido con *Sal*I y de 3.838 pb, a partir del ADN total digerido con *Dra*I, se muestran en la Figura 68.2.

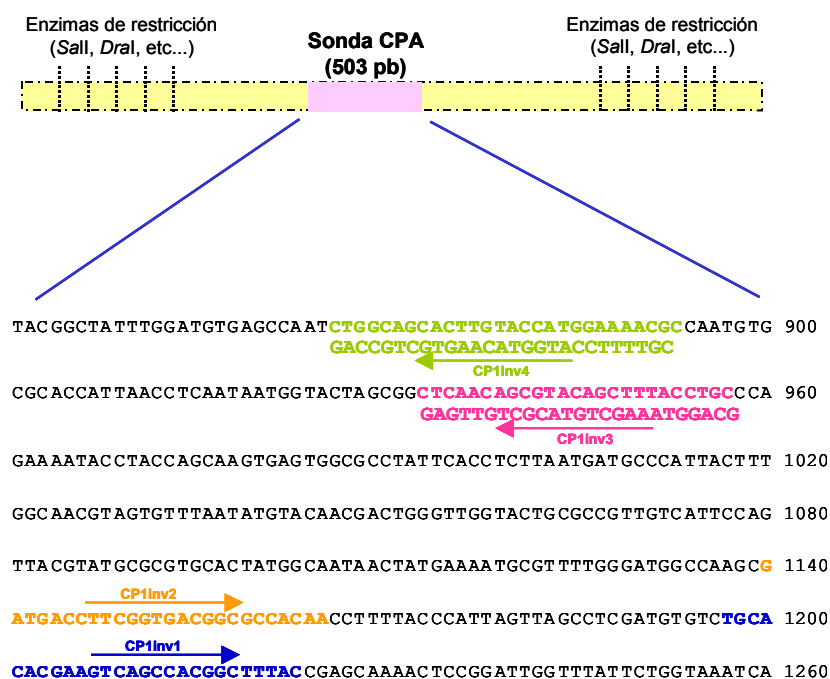


Figura 67. Diseño de los cebadores para la PCR inversa a partir del fragmento CPA

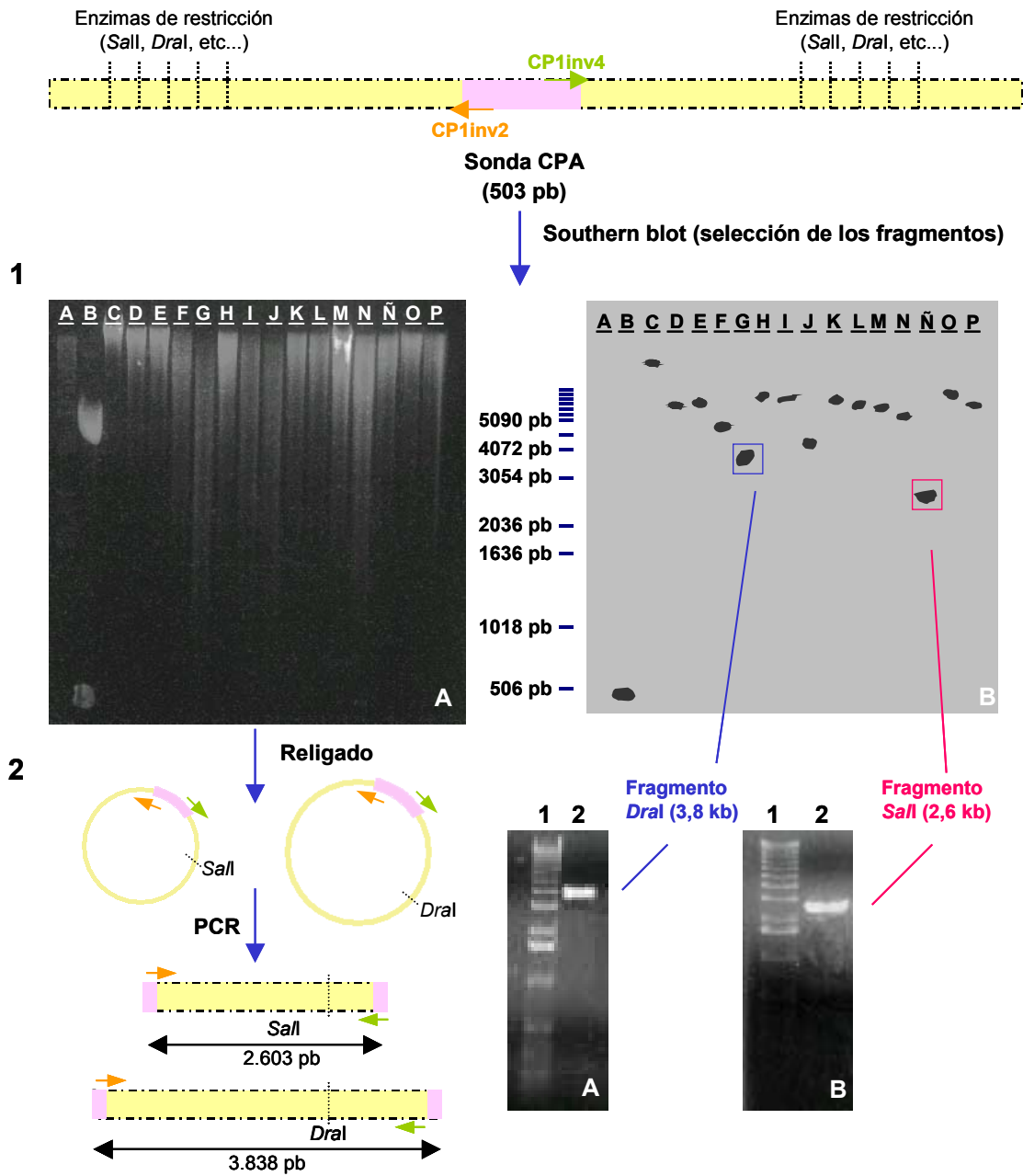


Figura 68. Estrategia de PCR inversa utilizada para amplificar zonas de secuencia desconocida corriente arriba y corriente abajo del fragmento CPA. 1. Digestiones del ADN genómico de *P. rutenica* CP76 con diferentes enzimas de restricción y revelado de la membrana tras la hibridación con la sonda CPA. A, Marcador de pesos moleculares; B, Fragmento de 503 pb (Sonda CPA); C, ADN genómico de *Pseudoalteromonas rutenica* CP76; Las digestiones se realizaron con: D, *Bam*HI; E, *Bgl*II; F, *Cla*I; G, *Dra*I; H, *Eco*RI; I, *Eco*RV; J, *Hind*III; K, *Kpn*I; L, *Mlu*I; M, *Pst*I; N, *Sac*I; Ñ, *Sal*I; O, *Sma*I y P, *Xba*I. 2. Amplificación mediante PCR inversa utilizando los cebadores CP1inv2 y CP1inv4. 2A, Fragmento *Dra*I: 1, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; 2, Fragmento de 3,8 kb; 2B, Fragmento *Sal*I: 1, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; 2, Fragmento de 2,6 kb

Para secuenciar ambos fragmentos se clonaron en el vector pBC KS(+) cortado con *EcoRV* (genera extremos romos), ya que los fragmentos se han originado con *Pfu* que al amplificar genera también extremos romos, obteniéndose los plásmidos pCP2 (6 kb) y pCP3 (7,2 kb), respectivamente (Figura 69). Posteriormente, se procedió a su secuenciación utilizando para ello tanto los cebadores universales T3 y T7 como cebadores diseñados a partir de la secuencia obtenida (Figura 70).

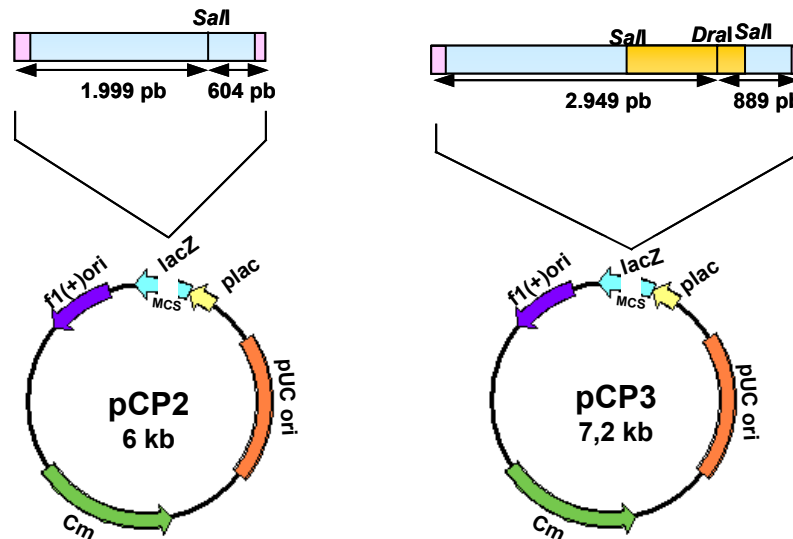


Figura 69. Esquemas de los plásmidos pCP2 y pCP3. Las zonas de secuencia desconocida de pCP2 y pCP3 (que incluye a pCP2) se muestran en azul y naranja respectivamente

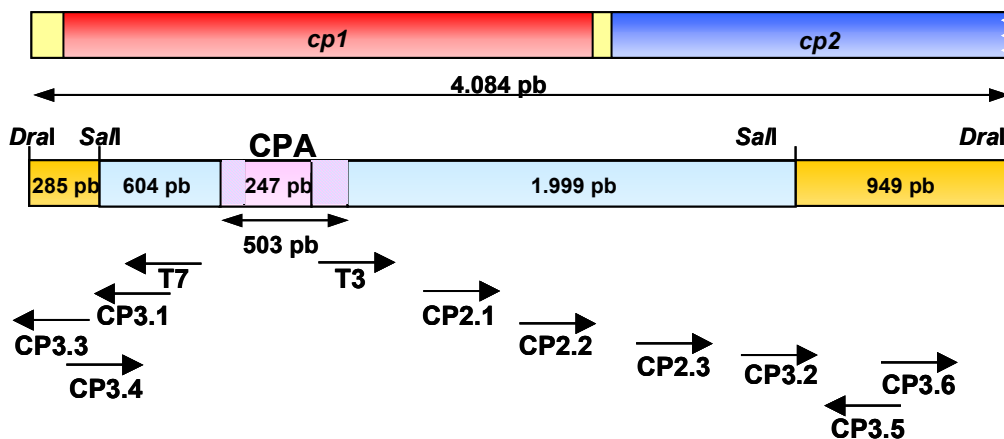


Figura 70. Estrategia de secuenciación de los fragmentos adyacentes a la sonda CPA contenidos en los plásmidos pCP2 y pCP3. □ Región clonada mediante PCR inversa del clon pCP2. ■ Región clonada mediante PCR inversa del clon pCP3. En la parte superior se representa la correspondencia de estas regiones con las proteínas CP1 y CP2

Hasta el momento conocemos la secuencia de un fragmento de 4.084 pb. El análisis de la misma determinó la presencia del gen que codifica la haloproteasa CP1, denominado *cp1*. Además, corriente abajo de *cp1* existe otro ORF incompleto, que muestra alta homología con proteasas microbianas. Para obtener el fragmento completo que contiene este segundo gen se utilizó la misma técnica de PCR inversa.

IV.9.4. Clonación, secuenciación y análisis de la región corriente abajo de *cp1*

En primer lugar diseñamos unos cebadores (Pro2L y Pro2R en las posiciones 3646-3663 y 4029-4011 del fragmento de 4.084 pb) a partir de la región terminal de la secuencia conocida para obtener mediante PCR un fragmento que podamos utilizar como sonda para realizar la segunda PCR inversa. La sonda se denominó sonda CPB. A su vez diseñamos también cebadores en sentido divergente para realizar la PCR inversa a partir de este fragmento (CP2inv1 y CP2inv2) (Figura 71).

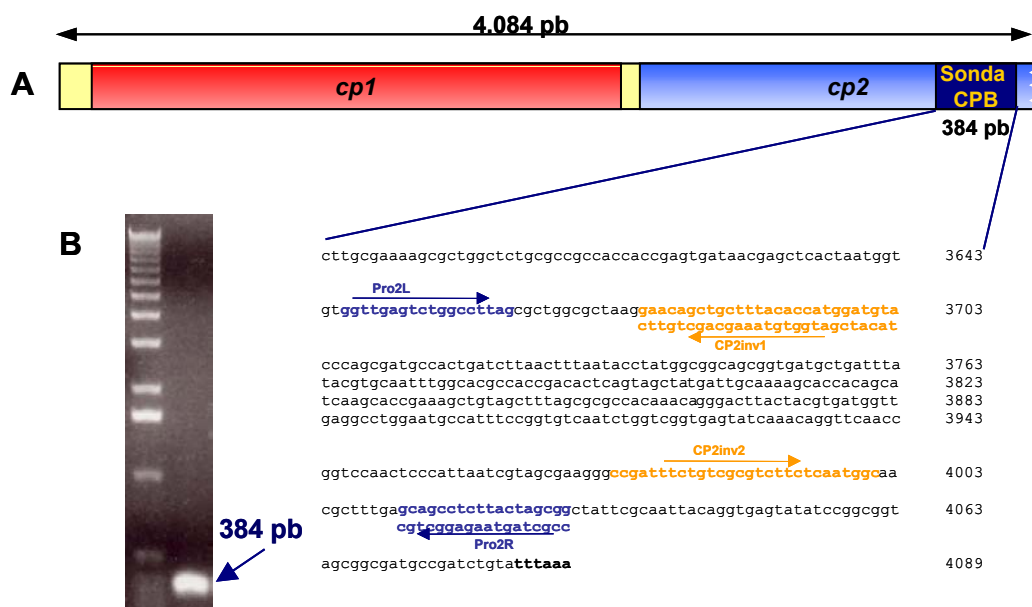


Figura 71. A. Diseño de los cebadores para la obtención de la sonda CPB. B. Gel de electroforesis al 1% en el que se muestra la banda amplificada de 384 pb correspondiente a la sonda CPB. Se muestran también los cebadores CP2inv1 y CP2inv2 utilizados en la PCR inversa de la región corriente abajo de *cp1*

El ADN total de *P. ruthenica* CP76 se digirió con diferentes restrictasas. Después de realizar la correspondiente transferencia mediante Southern blot, el ADN total de la cepa digerido con cada una de las enzimas seleccionadas (*Acd*, *Apal*, *Aval*, *Bgl*, *Clal*, *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI*, *NheI*, *SacI*, *SalI*, *XbaI* y *XhoI*) se híbrido con la sonda CPB para elegir un fragmento de restricción de tamaño apropiado para ser posteriormente amplificado por PCR inversa. Tras el revelado de la membrana que se muestra en la Figura 72, se eligió el fragmento originado con *SacI*, de aproximadamente 2,3 kb (carril L).

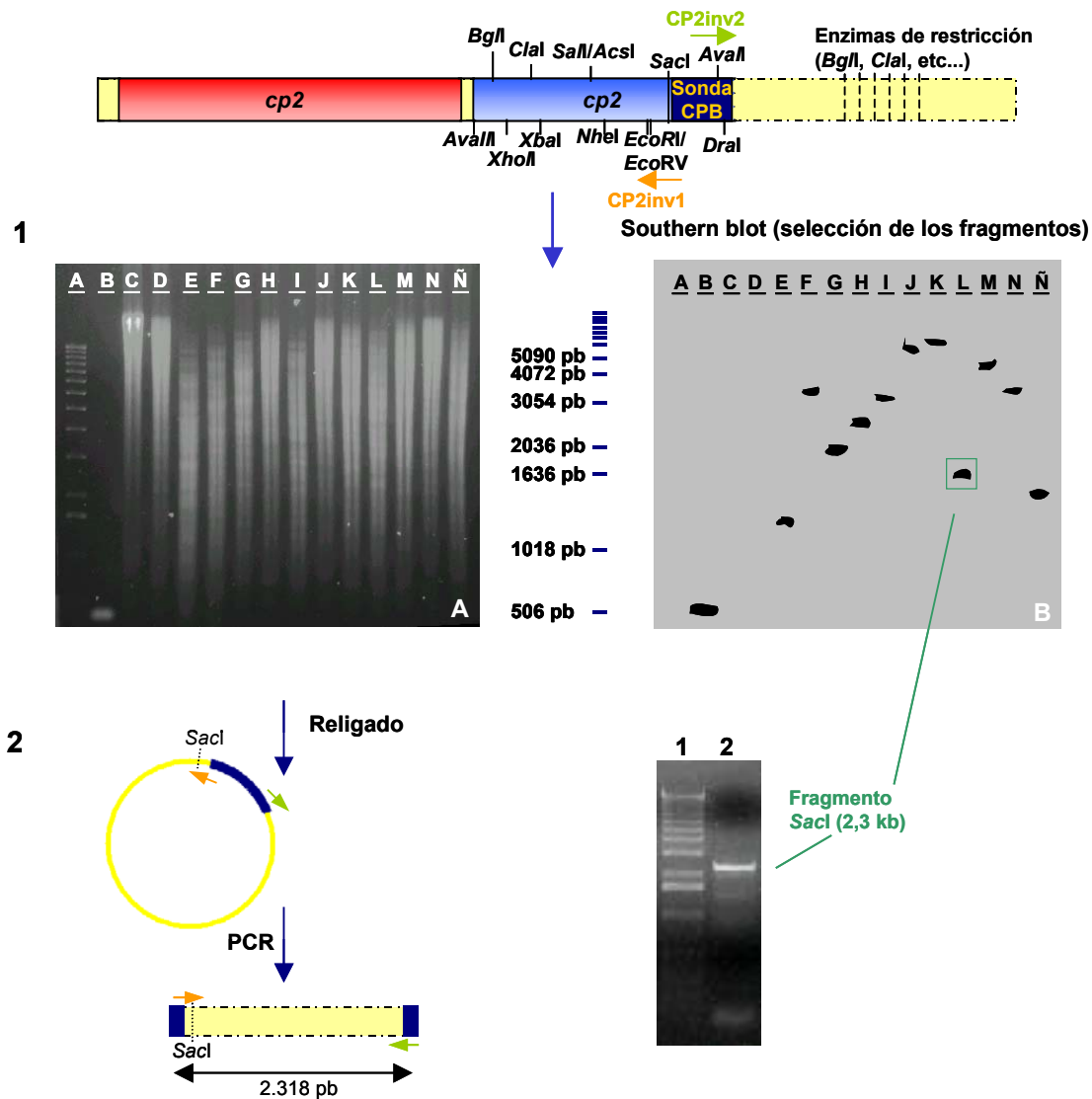


Figura 72. Estrategia de PCR inversa utilizada para amplificar zonas de secuencia desconocida corriente abajo del gen *cp1*. 1. Digestiones del ADN genómico de *P. ruthenica* CP76 con diferentes enzimas de restricción y revelado de la membrana tras la hibridación con la sonda CPB; A, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; B, Fragmento de 384 pb (Sonda CPB); Las digestiones se realizaron con: C, *AccI*; D, *Apal*; E, *Aval*; F, *BglI*; G, *ClaI*; H, *EcoRI*; I, *EcoRV*; J, *KpnI*; K, *NheI*; L, *SacI*; M, *SalI*; N, *XbaI* y Ñ *XhoI*. 2. Amplificación mediante PCR inversa utilizando los cebadores CP2inv1 y CP2inv2 del fragmento *Sad* 2, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; 2, Fragmento de 2,3 kb

El fragmento *Sad* de 2,3 kb se clonó en el vector pBC KS(+) cortado con *EcoRV*, obteniéndose el plásmido pCP4 (5,7 kb) (Figura 73). Para secuenciar el inserto se utilizaron tanto los cebadores universales T3 y T7 como cebadores diseñados a partir de la secuencia obtenida (Figura 74).

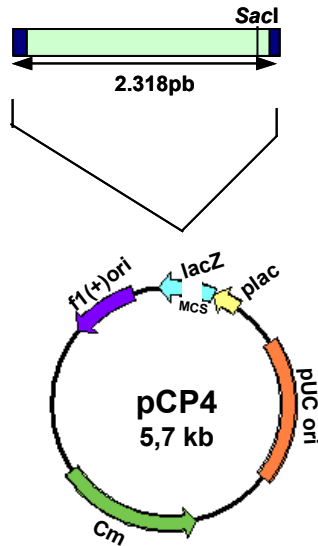


Figura 73. Esquema del plásmido pCP4. Las zonas de secuencia desconocida del inserto de 2,3 kb se muestran en verde claro

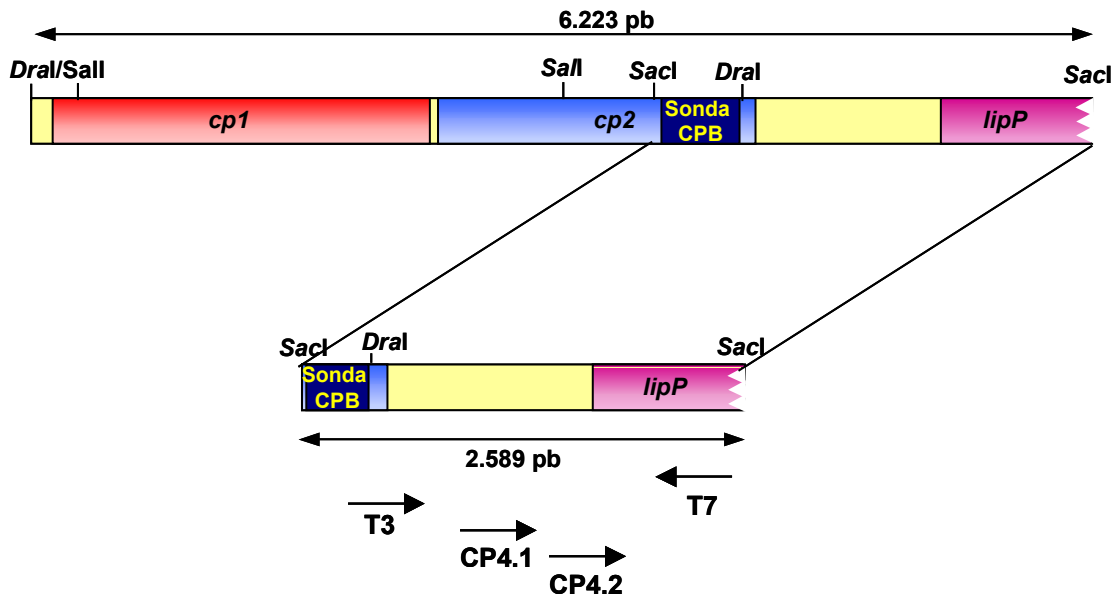


Figura 74. Estrategia de secuenciación de los fragmentos adyacentes a la sonda CPB contenidos en el plásmido pCP4. En la parte superior se representa la correspondencia de estas regiones con los genes *cp1*, *cp2* y *lipP*

IV.9.5. Análisis molecular de la región secuenciada

La secuencia completa comprende una región de 6.223 pb (Figura 75) con un contenido en G+C de 49 moles%, porcentaje similar al establecido para *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 (49,7 moles%). Mediante el programa EditSeq (DNASTar), se localizaron 3 posibles regiones codificantes orientadas en el mismo sentido, una de las cuales está incompleta. El ORF1 denominado *cp1*, consta de 2.202 pb y se

extiende desde la posición 148 a la 2349 del fragmento analizado. Encontramos una posible secuencia de unión al ribosoma representada por $5'GGGAG^3'$ que precede al triplete de inicio de la traducción (ATG) de *cp1* (Figura 75). Por otro lado, localizamos la presencia de un posible promotor, cuyas secuencias $-10 (5'TATTAG^3')$ y $-35 (5'TTGGAG^3')$ son similares a las secuencias consenso para el factor σ^{70} de *E. coli*. La secuencia de 733 aminoácidos deducida de este ORF1, denominado CP1, se comparó con las bases de datos de proteínas mediante el programa BLAST (Altschul y col., 1997) presentando homología con metaloproteasas de diversas bacterias Gram-negativas.

El ORF2 denominado *cp2*, consta de 1.845 pb y se extiende desde la posición 2409 a la 4252 del fragmento analizado (Figura 75). Se localiza un posible sitio de unión al ribosoma $5'AAGGA^3'$ corriente arriba del inicio de traducción. La secuencia de 614 aminoácidos deducida de este ORF2, denominada CP2, se comparó con las bases de datos de proteínas, presentando también homología con metaloproteasas de bacterias Gram-negativas.

Entre *cp1* y *cp2* existe una región intergénica de 59 pb donde se localiza una pequeña secuencia palindrómica que podría formar una secuencia terminadora de la transcripción. De la misma manera inmediatamente después del codón de terminación (TTA) de *cp2* se encuentra otra región palindrómica que podría formar secuencias terminadoras.

Las características de CP1 y CP2 se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44. Características bioquímicas de CP1 y CP2

	CP1	CP2
Nº aminoácidos	733	614
Aa básicos (%)^a	6,1	5,0
Aa ácidos (%)^b	9,5	9,6
	29,7	32,1
Aa polares (%)^d	36,15	
Peso molecular (kDa)	78,8	65,8
Punto isoelectrico	4,77	4,62
Carga a pH 7	-22,97	-25,80

^aAminoácidos básicos: K y R

^bAminoácidos ácidos: D y E

^cAminoácidos hidrofóbicos: A, I, L, F, W y V

^dAminoácidos polares: N, C, Q, S, T, y Y

El ORF3 denominado *LipP*, aunque está incompleto (solamente se han determinado 296 aminoácidos), comienza en la posición 5.336 y presenta homología con proteínas de la familia de las α/β hidrolasas. La mayor similitud se encontró con las esterasas de *Dechloromonas aromatica* (63%), *Rubrivivax gelatinosus* (59%) y *Microbulbifer degradans* (56%).

```

ttaaattaatatTTTTactTTtattttacattagtagccatTTtgactagattagaat 60
cgctcgctttggagaagtttgcaggatcaaacgagtagcggtgctcagcaccacca 120
ttcgggaaactaatcgggagcaacaATGAATAAACC TCAAGATTATGCTATCAACC 180
M N K P Q G F M L S T 11
TTATCAATAGCCGTGTCACTGGCAGCAA TTTG CCGCAACGAGTATTGCGGC GCAAAA 240
L S I A V S L A A I L P A T S I A ↓ A Q K 31
ACCTACCTAAGTGAACAAAATCAAATTAAGATATTATGATGGCAAAGTCGACTGCCGTT 300
T Y L S E Q N Q I K D I M M A K S T A V 51
TCAGCCTCCCTGCTGCAACGGTACTCGGCCTTGATACTCAGGATGGTATCAGTGTGTGA 360
S A S P A A T V L G L D T Q D G I S V V 71
AAGCAGTACAACAGTCAAACGGCGATAAAACGTTTCGCTATCAGCAAATGCACAAAGGC 420
K Q Y N S Q N G D K T F R Y Q Q M H K G 91
ATTCCTGTATCGGCGATCATGCCATTCTAACTTACAACAAAGATGATCAGCTTATTCGT 480
I P V I G D H A I L T Y N K D D Q L I R 111
GCCATGGCGCCGTGGTCAATAACATCGCTGCCGACGTCCCCTCGGTAAACGC CAAGGTA 540
A H G A V V N N I A A D V P S V N A K V 131
AGTAAGAAGCAAGTAGGCAAACTAGTGC GCGCCATGCA TCGTAAATGCATCAAGCAAA 600
S K K Q V G K L V R A M H R K M H Q G K 151
GCAGCGCTGCCATCGAGAATGAGCAATCTCGCTTAGTCATTTGGTTAGACGATGCGAAT 660
A A P A I E N E Q S R L V I W L D D A N 171
AAAGCGCACCTTGCTTATGAGGTGACCTACAACAGTTATGGTGATACCCCGTCGCGTCCC 720
K A H L A Y E V T Y N S Y G D T P S R P 191
TACATGATATCGACGCCAAAAGCGGTAATGTATTGCA TCAATTCGACAATTTACAGCAT 780
Y M I I D A K S G N V L H Q F D N L Q H 211
GCTGATGCCACCGGCCAGGCGGCAACCAGAAAACCGGACAATACAATTACGGAACCGAC 840
A D A T G P G G N Q K T G Q Y N Y G T D 231
TACGGCTATTTGGATGTGAGCCAATCTGGCAGCACTTG TACCATGGAAAACGCCAATGTG 900
Y G Y L D V S Q S G S T c T M E N A N V 251
CGCACCATTAACCTCAATAATGGTACTAGCGGC TCAACAGCGTACAGCTTTACCTGCCA 960
R T I N L N N G T S G S T A Y S F T c P 271
GAAAATACCTACCAGCAAGTGAGTGGCGCCTATTCACC TCTTAATGATGCCATTACTTT 1020
E N T Y Q Q V S G A Y S P L N D A H Y F 291
GGCAACGTAGTGTTAATATGTACAACGACTGGGTTGG TACTGCGCCGTTGTCATTCCAG 1080
G N V V F N M Y N D W V G T A P L S F Q 311
TTACGTATGCGCGTGCACCTATGGCAATAACTATGAAAA TCGGT TTTGGGATGGCCAAGCG 1140
L R M R V H Y G N N Y E N A F W D G Q A 331
ATGACCTTCGGTGACGGCGCCACAACCTTTTACC CATTAGTTAGCCTCGATGTGTCTGCA 1200
M T F G D G A T T F Y P L V S L D V S A 351
CACGAAGTCAGCCACGGCTTTACCGAGCAAAC TCCGGATTGGTTTAT TCTGGTAAATCA 1260
H E V S H G F T E Q N S G L V Y S G K S 371

```

GGCGGCTTAAATGAAGCGTTCTCCGATA TGGCCGGTGAAGCTGCGGAAGCTTACATGCTG 1320
G G L N E A F S D M A G E A A E A Y M L 391
GGTAGTAATGATTGGCTC GTCGGTGAGCAAATC TTCAAAGGTAATGGT GCGTTACGATAC 1380
G S N D W L V G E Q I F K G N G A L R Y 411
ATGGCTAATCCTCCACAAGACGGCCGCT CCATTGGTAA TCAATCTGATTACTACTCAGGC 1440
M A N P P Q D G R S I G N Q S D Y Y S G 431
ATGGATGTGCATTACAGCTCAGGGGTGTACAAC AAGGCATTCTATTTGTTGGCAACCACC 1500
M D V H Y S S G V Y N K A F Y L L A T T 451
AGCGGCTGGGATACACAAAAGGCCTTTAAGACCATGGCACGTGCTAAC CAGCTTTATTGG 1560
S G W D T Q K A F K T M A R A N Q L Y W 471
ACAGCGAGCACTAACTGGGACTTAGCAGGTAACGGTGTGATGGACGCCGCGTGCGATCTT 1620
T A S T N W D L A G N G V M D A A C D L 491
GGTTATGAGCCAAATGATGTTAAAGCAGCCCTC GCGGCCGTAGGGGTAACATCAAGCCTA 1680
G Y E P N D V K A A L A A V G V T S S L 511
AGCGCGGGTAGTGACTGTGGTTC AACTACGCCAATACC CGACGAAGAAATCACCAACGGC 1740
S A G S D C G S T T P I P D E E I T N G 531
GTGCCACGCACAGGTATT TCCGGTGCGGCGAAA GAACAATGT TCTTCGTTATGAATGTG 1800
V P R T G I S G A A K E Q M F F V M N V 551
CCCGCAGGTGCAACGAACCTTACCTTTAACACC TCAGGTGGTT CAGGTGATGCTGATTTA 1860
P A G A T N L T F N T S G G S G D A D L 571
TACGTGAAATACGGTTACGTCC AACGCTTAAC GATTACGATT GTAACAGCACGTCATCA 1920
Y V K Y G S R P T L N D Y D C N S T S S 591
ACCAGTACTGAGTCATGTGCAAT TAGCC CCGTT CAAGGCGGCGAGTAC TATGTCATGGTC 1980
T S T E S C A I S P V Q G G E Y Y V M V 611
GAAGCGTGAACCAGATCAGTAA TGTGACCTTA GAAGGTAAC TATGACGATGGTAGCACC 2040
E A W N Q I S N V T L E G N Y D D G S T 631
GGGCCAACGCCGATTGATCGCAC CGAGAGCAAC ATCAGTGTTA ACCAAGGCGGCTGGGCT 2100
G P T P I D R T E S N I S V N Q G G W A 651
CGTTTTAGCCAAGACATTGGCAG TGGCTACAGT AACCTCACGGTA ACCATTAGCGGTGGT 2160
R F S Q D I G S G Y S N L T V T I S G G 671
AGCGGCGATGCCGATCTGTATGT CAACTTTGGT TCGCAATCAA ACCAGCGACTGGGAT 2220
S G D A D L Y V N F G S Q S T T S D W D 691
TGTCGTCCATATCGCAATGGCAA CTCAGAAACC TGTAACCTTTAGCAATCCGCAAGCAGGT 2280
C R P Y R N G N S E T C T F S N P Q A G 711
ACATGGCATATGGATTTACGTGGCTACC GCGCAGCAAG TGGTGTCA ACCCTAACCATCCAA 2340
T W H M D L R G Y R A A S G V T L T I Q 731
GCAGACTAAatcattctcctgagtaggggccagctactggccctttttcgtttaagga 2400
A D . 733
cccatcttATGAAATATTCTTACCTCGCCATCGGTGCGGCGCTTGCTTGCCTACGAACA 2460
M K Y S Y L A I G A A L A C A T N 17
GCGCCTTAGCGGCACCGGAAAAGGCATGGATCACGGTCCGAGGCCATGCCATGGCGCACT 2520
S A L A ↓ A P E K A W I T V E A H A M A H 37

ATCAAAAA CAGCAAAAA CACAGTGGCAAAGCGCTGCAACGCAATCAA TCGCTGGCACAG 2580
 Y Q K Q Q K T Q W Q S A A T Q S I A G T 57
 CAGTTGATGTTATCGCTATAGATCCTAAGCATA TACATCGGCTAAGCGACTTTATGCACC 2640
 A V D V I A I D P K H I H R L S D F M H 77
 ATGAGTACAAACGCTGTGGCGGCTTTATTTATCATGAA TCTGAGCAAGCGGCGAAAGCCT 2700
 H E Y K R C G G F I Y H E S E Q A A K A 97
 ACTTGCAA CAGGCTCAAGTCAATAACACGCAAA CAGTTGCCAC TGTTAATTACAGCATCG 2760
 Y L Q Q A Q V N N T Q T V A T V N Y S I 117
 ATAACCCCGCAGCAGCCAGGCGCTGCTGGCTGAGCTGAGCAC CACTCGTCTAGATAACA 2820
 D N P A A A Q A L L A E L S T T R L D N 137
 CCGTAAGTACCCTAGCAGCATTTCATAACCGTTATTATTCACAACAAAGCGGTGTCGATG 2880
 T V S T L A A F H N R Y Y S Q Q S G V D 157
 CAGCAGATTGGTTACGCACCCAC TGGCAACAAA TCACCAGTAGTCGCAGTGACATCACCG 2940
 A A D W L R T H W Q Q I T S S R S D I T 177
 TGCAAAGTTACAACCATAGCTGGGCTCAAGATT CCGTGTTGGTGACAA TCGCCGGACAAG 3000
 V Q S Y N H S W A Q D S V V V T I A G Q 197
 AGTTAAGTGATGAAGTGGTGATCATTGGCGGTC ACTTAGACTCGATTAACCAATCATCAC 3060
 E L S D E V V I I G G H L D S I N Q S S 217
 CCAGCCAAGGTCGTGCACCGGGAGCTGATGATAATGCCAGCGGCATTG CAGTATTAACAG 3120
 P S Q G R A P G A D D N A S G I A V L T 237
 AAACGCTGCGAGCGGTCGTCGACAGTGACTTTAAGCCTAAACGCACCA TCAAAATTATGG 3180
 E T L R A V V D S D F K P K R T I K I M 257
 GCTTTGCGGCTGAGGAAGTGGGACTCAGAGGCTCCGGCGCTATAGCTAGCGATTACAAAA 3240
 G F A A E E V G L R G S G A I A S D Y K 277
 GCCAAGGCATCAATGTGGTGGGCATGGCGCAGT TGGATATGACCGGTAATAACGGCTCAG 3300
 S Q G I N V V G M A Q F D M T G N N G S 297
 CTGAAGATATTGTATTGATGACC GACTATACCAATAGCGCCAGAATCAATTTATGGCAA 3360
 A E D I V L M T D Y T N S G Q N Q F M A 317
 ACC TTGCCAGCAC TTATCTCAGT GACCTGGTTATTGGC TATGATCAATGTGGTTACGGAT 3420
 N L A S T Y L S D L V I G Y D Q C G Y G 337
 GCTCGGATCATGCCTCTTGGCAT AACCAAGGCTTTGCCGCCTCAATGCCGTTTTGAATCAA 3480
 C S D H A S W H N Q G F A A S M P F E S 357
 AAATGAGTGATATCAACTACCGAATTCA CACCAAGTAGTGATGACCAGTTTGGATGCCAGTC 3540
 K M S D I N Y R I H T S S D D Q F D A S 377
 ATGCCATCAATTTTGCACGCTTGGCCAGTGTTTATCTCGCTGAGCTTGC GAAAAGCGCTG 3600
 H A I N F A R L A S V Y L A E L A K S A 397
 GCTCTGCGCCGCCACCACCGAGTGATAACGAGCTCACTAATGGTGTGGTTGAGTCTGGCC 3660
 G S A P P P P S D N E L T N G V V E S G 417
 TTAGCGCTGGCGCTAAGGAACAGCTGCTTTACACCATGGATGTACCCAGCGATGCCACTG 3720
 L S A G A K E Q L L Y T M D V P S D A T 437

ATCTTAAC TTAATACCTATGGC GGCAGCGGTGATGCTGATTTATACGTGCAATTTGGCA 3780
 D L N F N T Y G G S G D A D L Y V Q F G 457
 CGCCACCGACTCAGTAGCTATGATTG CAAAAGCACCACAGCATCAAGCACC GAAAGCT 3840
 T P P T L S S Y D C K S T T A S S T E S 477
 GTAGCTTTAGCGCGCCACAAACAGGGACTTACTACGTGATGGTTGAGGCCTGGAATGCCA 3900
 C S F S A P Q T G T Y Y V M V E A W N A 497
 TTTCCGGTGTCAATCTGGTCGGTGAGTATCAAACAGGTTCAACCGGTCCTCAACTCCCATTA 3960
 I S G V N L V G E Y Q T G S T G P T P I 517
 ATCGTAGCGAAGGGCCGATTTCTGTCGCGTCTTCTCAA TGGCAACGCTTTGAGCAGCCTC 4020
 N R S E G P I S V A S S Q W Q R F E Q P 537
 TTA CTAGCGGCTATTCGCAATTA CAGGTGAGTATATCCGGCGGTAGCGGCGATGCCGATC 4080
 L T S G Y S Q L Q V S I S G G S G D A D 557
 TGTATTTAAACCTTGGCTCACCGTCGAGTCAGTCGCAA TGGCAATGCCGTCCATACAAAA 4140
 L Y L N L G S P S S Q S Q W Q C R P Y K 577
 ATG GTAACAATGAAACCTGTACCATTAGCAACC CGCAAAGTGGAACTTGGTACATTGATT 4200
 N G N N E T C T I S N P Q S G T W Y I D 597
 TGTACGGCTATAATAGCGCCACGGGTGTAAATTATCGATCACCGCCAATTA Gtaataaa 4260
 L Y G Y N S A T G V N L S I T A N . 614
 aaaggggcccgatggcccctttttttcacgaaagttgaattaatccaattctgcgcgcagc 4320
 ttcttcaacaccgccttttaccttctcaacattctctggccccatgcgtaatagctgcttc 4380
 tgagcgggtggtaaattctcccattcgggaataagcatacttataggtgactgaatctcgt 4440
 aataaggggacctgagtagtcatttcgggagtcctctaaaagcaagtcaatcgactgcttt 4500
 aagcgcgcctcaaaactactgttaggatcgccaacttcaccataggcctgttcaatcagc 4560
 ggttcatattgttcatacagtgccaccaactgatcggtattcatcgagggtcaaaaatacca 4620
 acatacgggtcatagcgcctcaaagctcttcggatccatcgtcagcacatcgccctcttcc 4680
 acggtgaaaggctgctcgagtttttccactgggtgagtggtttgtggccacacgcccctcg 4740
 gcgagattattgacaaacaccactgtgcggeggatcaagtcattaccagcaaatca 4800
 gcgctagattgagccagcgattggttgcaagctggcgctgacctctcatcgctatcgctcc 4860
 aaggctggcaactcgggttgcggtcgggctgttcgtcttcacgagactgtggacgctgt 4920
 tgctgctcatcggggttgctcacgtctgtggttgctcggecggttggggtttactttca 4980
 ggctcgggctctgcaacaggctgaggtttgtcttccactggcaactgcgcaggctcaggg 5040
 gtggcctcaagtggtaagggtggttgagattggttgctgacgataaaaattaccaccaca 5100
 gccagcaccactaacaccaccaatgctaggatgatggtggttacggctgggtccgcggtta 5160
 ctctcatgttcggttaggttgttcaactcataaaggctccggttatgaaaaagtcaaaatcgc 5220
 caatcttcaaaaagtaatctgccctaattgctgcgagtatactcgccggttgagcatatct 5280
 ttttattttagaatctttttacattaacactatgtgtccatttaagt gcaaaataca **ATGCG** 5340
 M R 2
 AAAGCAA ACTAATTGCGGTGCGCTGGAACAGCGTTGCTACTGAGCGGCGGCGGCCCG 5400
 K Q T N C G R A G T A L L L S G G G A R 22
 AGCCGCTTATCAAGTAGGTGTCCTCAGCGCTAACACAAAGCCTTCCAAGAACGGCGCCAC 5460
 A ↓ A Y Q V G V L S A N T K P S K N G A T 42
 TGCCATTTACGTATTACAGGCACCTCTGCCGGAGCAATTA ACTCTGTGGCGCTTGGGTG 5520
 A I Y V F T **G T S A G** A I N S V A L G C 62

```

TTGGGCTTCGTGTTGCTCATTGGCGAGCCGCAAGCTTACCAAGTCTGGGGACAGTTTCA 5580
W A S C C S F G E P Q A Y Q V W G Q F H 82
CACCAGCGATGTCAATCGCAGTGATTTTGGCCACCTTATAAAAAATAT 5640
T S D V N R S D F A H V F G H L I K N I 102
TTTATCGAGCTTTCGCTCTGGGCACGCCAACCATGCCCCAGCGAGCTTATTCAACAATGC 5700
L S S F R S G H A N H A P A S L F N N A 122
CCCTCTGCGGCAGTTATTAGCCGAAGTGCTGCCTATGGAGCGTATCGACCGTAACATTCA 5760
P L R Q L L A E V L P M E R I D R N I H 142
CCGTGGTGTGCTCGATGCGTTAGCAGTCACTGCGTCTAACTACAGTACCGGTGACTCCGT 5820
R G V L D A L A V T A S N Y S T G D S V 162
TACCTTCTATCAAAGCAATGAGGCCAAACCCTGGCGGCGGGCCAAACGTCAGGGTGTCAA 5880
T F Y Q S N E A K P W R R A K R Q G V K 182
AGCTCGCATCCATTTAGAACACCTGATGGCCTCCAGTGCTATTCCCCTGGTCTTTCCCAG 5940
A R I H L E H L M A S S A I P V V F P S 202
CGTAAAGATTCGACACCAATACTATGGTGATGGTTCCATTCACCAGATGTCTCCCCTGTC 6000
V K I R H Q Y Y G D G S I H Q M S P L S 222
CAGCGCCATTCACCTTGGTGCCGAGCGTATCTTTGTTATCGGTGTTGAACAGCCCAAAGA 6060
S A I H L G A E R I F V I G V E Q P K E 242
GGAACATCGTAAATATGCGCCGCACTATCCGGGCATTTGCGCATATCGCGGGGCATCTGTT 6120
E H R K Y A P H Y P G I S H I A G H L L 262
GGACAGTGTGTTTGTGACACACTGCATGGTGATTTAGAGCGTCTTGAGCGCATTAACCG 6180
D S V F A D T L H G D L E R L E R I N R 282
TACGGTGGGGTTGTTGAGCGCGAAAGATAAACATCGTGAGCTC 6223
T V G L L S A K D K H R E L 296

```

Figura 75. Secuencia de 6.223 pb amplificada mediante PCR inversa, incluida en los plásmidos pCP1, pCP2, pCP3 y pCP4. Cada uno de los ORFs encontrados se encuentra señalado con colores diferentes: ORF1 (*cp1*) en rojo; ORF2 (*cp2*) en azul y el ORF3 (*LipP*) en morado. Los codones de iniciación y terminación se encuentran señalados en negrita. Los posibles sitios de unión al ribosoma o secuencias Shine-Dalgarno (RBS) aparecen sombreados en morado. Las posibles regiones -10 y -35 se encuentran encuadradas en azul. Las regiones donde se encuentran las secuencias palindrómicas que podrían constituir los terminadores transcripcionales se encuentran señaladas con flechas. Asimismo, se muestra la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas. Los aminoácidos que forman parte de los dominios PCC se encuentran señalados en negrita. Las cisteínas que podrían participar en la formación de puentes disulfuro en CP1 se encuentran sombradas en verde. En CP1 se encuentra recuadrado en rojo el extremo N-terminal de la proteína y recuadrados en azul los dominios característicos de la familia M4 de las metaloproteasas. En la proteína CP2 se encuentran recuadrados en verde los dominios característicos de la familia de las aminopeptidasas. Por último, en la esterasa LiP se encuentra recuadrado en marrón el dominio característico de la familia de las α/β hidrolasas

Los porcentajes de similitud de CP1 con sus proteínas homólogas disponibles en las bases de datos (BLAST) se recogen en la Tabla 45. Asimismo, se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa MegAling (DNASTar) (Figura 76). Se muestra en este alineamiento los dominios conservados de las metaloproteasas de la familia M4 como son los motivos ³⁵²HEVSH³⁵⁶ y ³⁷²GGLNEAPSD³⁸⁰.

Tabla 45. Similitud entre la haloproteasa CP1 y proteasas de diferentes microorganismos

Espece bacteriana	Proteína	Longitud (aa)	% de identidad (% similitud) ^b	solapamiento (aa) ^c	Nº acceso
	Metaloproteasa Empl		69 (80)	724	BAB85124
<i>Alteromonas</i> sp. O-7		727	66 (78)	724	JC7818
Bacteria antártica cepa 643	Metaloproteasa ProM	729	63 (76)	726	AAF78076
	Proteasa ProAC	590	54 (68)	529	BAA82875
<i>Aeromonas veronii</i>	Proteasa Aps	523	52 (69)	523	BAD22597
<i>Aeromonas punctata</i>	Proteasa Pro	595	53 (68)	505	BAA95457
<i>Vibrio vulnificus</i>	Proteasa Vvp	609	50 (66)	557	BAC22940
<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	Metaloproteasa Met	636	50 (66)	557	NP937521
<i>Vibrio fluvialis</i>	Metaloproteasa VfpA	610	51 (65)	555	BAB86344
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Elastasa AhpB	588	51 (65)	531	AAF07184
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Metaloproteasa Met	701	45 (60)	658	NP800265
<i>Vibrio vulnificus</i>	Metaloproteasa Met	606	51 (66)	555	AAC45343
<i>Listonella anguillarum</i>	Metaloproteasa Emp	611	44 (62)	599	AAL03940
<i>Vibrio harveyi</i>	Proteasa VhpA	780	43 (56)	647	AAT68711
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Metaloproteasa LasB	489	51 (66)	476	AAQ57737
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Elastasa LasB	498	53 (68)	438	AAG07111
<i>Legionella longbeachae</i>	Metaloproteasa MspA	529	40 (55)	521	CAA58144
<i>Legionella pneumophila</i>	Metaloproteasa Met	543	38 (53)	530	AAU26564
<i>Alteromonas</i> sp. O7	Metaloproteasa II	609	57 (68)	242	BAB79616

^aExtensión en aminoácidos de la proteína

^bPorcentaje de residuos idénticos encontrados en la región de solapamiento

^cEn el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento, se incluyen los "huecos" que introduce el programa BLAST para optimizar el alineamiento

Resultados

M N K S - - - - K - - - - - T L A T A A A L A V T - A - - - - A A - K - Y L N F Q A S I N A - - - Q G K A - - V L - - - -										Consenso										
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Aeromonas punctata ProAc Aeromonas veronii Aps Alteromonas sp. MetI Bacteria antártica ProM Chromobacterium violaceum LasB Listonella anguillarum Emp Pseudoalteromonas sp. EmpI Pseudomonas aeruginosa Zmet Vibrio vulnificus Vvp Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP1
- - - - L - O N G L V V V K S I K L P N G K V T V R Y Q Q M Y O G L P V I G D A V V A T K G - A - - - G O L K R A H										Consenso										
40	1	52	46	52	53	1	51	57	40	1	52	46	52	53	1	51	57	40	1	Aeromonas punctata ProAc Aeromonas veronii Aps Alteromonas sp. MetI Bacteria antártica ProM Chromobacterium violaceum LasB Listonella anguillarum Emp Pseudoalteromonas sp. EmpI Pseudomonas aeruginosa Zmet Vibrio vulnificus Vvp Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP1
G A A V Y N I A A D V - - S V S P A L S K K Q A - S L A K A L - - - - A - - - K A - G L K T E N E Q S O L A V R L D E N										Consenso										
97	30	109	110	102	100	110	31	99	114	97	30	109	110	102	100	110	31	99	114	Aeromonas punctata ProAc Aeromonas veronii Aps Alteromonas sp. MetI Bacteria antártica ProM Chromobacterium violaceum LasB Listonella anguillarum Emp Pseudoalteromonas sp. EmpI Pseudomonas aeruginosa Zmet Vibrio vulnificus Vvp Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP1
N V A Q L V Y L V S F V V Y G D E P S R P F V I I D A N S G E V L K S W E G L N H A D A - - T G P G G N Q K T G K Y I Y										Consenso										
144	77	163	166	153	159	166	83	156	171	144	77	163	166	153	159	166	83	156	171	Aeromonas punctata ProAc Aeromonas veronii Aps Alteromonas sp. MetI Bacteria antártica ProM Chromobacterium violaceum LasB Listonella anguillarum Emp Pseudoalteromonas sp. EmpI Pseudomonas aeruginosa Zmet Vibrio vulnificus Vvp Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP1
G T D F G P L I V D Q - G S T C T M T N A N V K T I N L N G G T S G S - - T A Y S E T C P E - - - N T Y K E I N G A Y										Consenso										
202	135	221	224	211	219	224	141	216	229	202	135	221	224	211	219	224	141	216	229	Aeromonas punctata ProAc Aeromonas veronii Aps Alteromonas sp. MetI Bacteria antártica ProM Chromobacterium violaceum LasB Listonella anguillarum Emp Pseudoalteromonas sp. EmpI Pseudomonas aeruginosa Zmet Vibrio vulnificus Vvp Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP1
S P L N D A H Y F G N V V F N M Y N D W V G T A P L T F O L K M R V H Y S S N Y E N A F W D G S A M T F G D G A N T F Y										Consenso										
253	186	275	278	262	277	278	194	274	283	253	186	275	278	262	277	278	194	274	283	Aeromonas punctata ProAc Aeromonas veronii Aps Alteromonas sp. MetI Bacteria antártica ProM Chromobacterium violaceum LasB Listonella anguillarum Emp Pseudoalteromonas sp. EmpI Pseudomonas aeruginosa Zmet Vibrio vulnificus Vvp Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP1
P L V S L D V S A H E V S H G F T E Q N S G L V Y S G S G L N E A F S D M A G E A A F Y M K G S N D W L V G A D I										Consenso										
313	246	335	338	322	337	338	254	334	343	313	246	335	338	322	337	338	254	334	343	Aeromonas punctata ProAc Aeromonas veronii Aps Alteromonas sp. MetI Bacteria antártica ProM Chromobacterium violaceum LasB Listonella anguillarum Emp Pseudoalteromonas sp. EmpI Pseudomonas aeruginosa Zmet Vibrio vulnificus Vvp Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP1

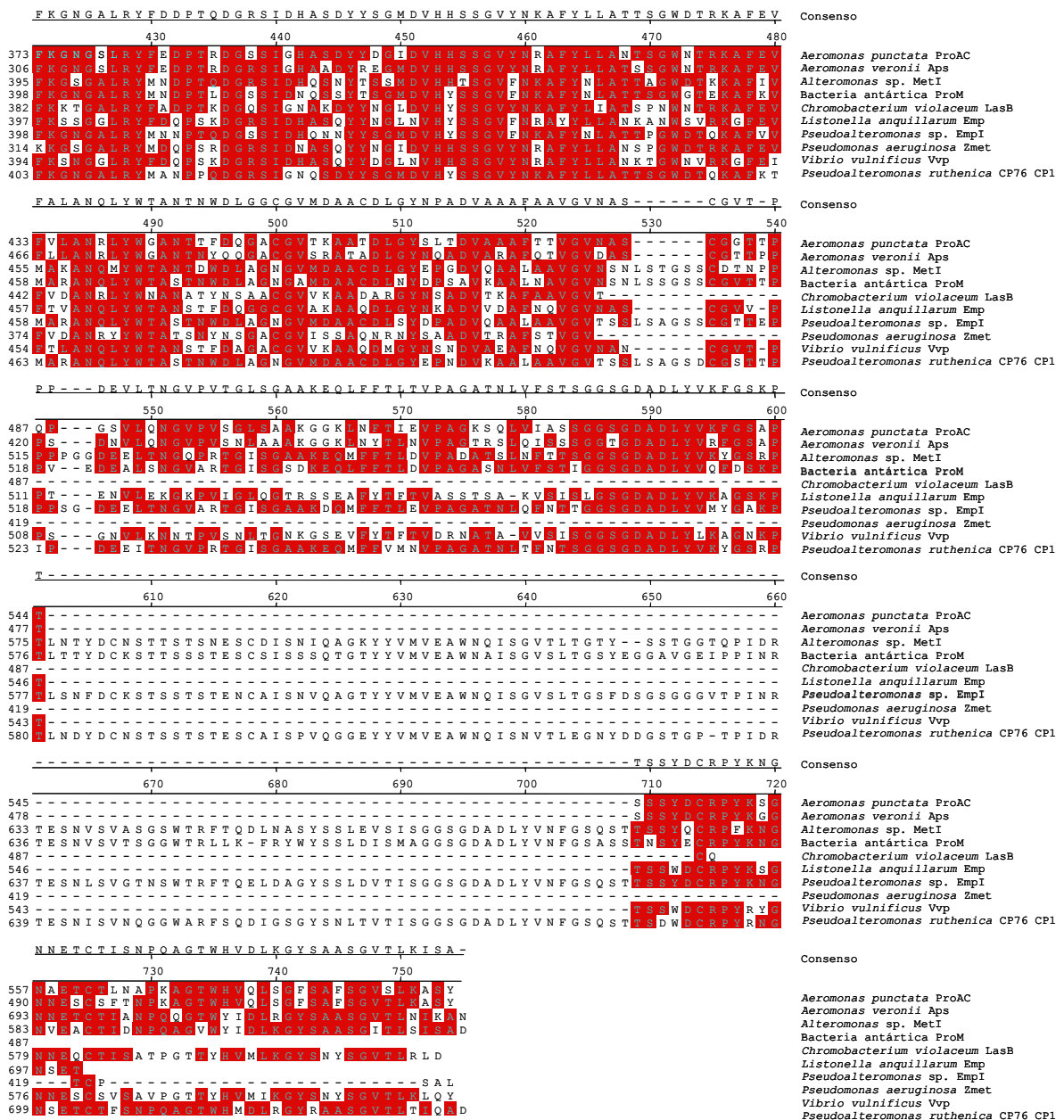


Figura 76. Alineamiento de la haloproteasa CP1 con proteínas homólogas depositadas en las bases de datos utilizando el programa MegAlign (DNASTar). Los fragmentos idénticos aparecen sombreados en rojo. Los dominios típicos de las metaloproteasas de la familia M4 se encuentran sombreados en amarillo. Las proteínas utilizadas en los diferentes alineamientos fueron: *Aeromonas punctata* ProAC (Nirasawa y col., 1999); *Aeromonas veronii* Aps (Song y col., 2004); *Alteromonas* sp. 0-7 MetI (Miyamoto y col., 2002); bacteria antártica cepa 643 ProM (no publicado); *Chromobacterium violaceum* LasB (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003); *Listonella anguillarum* Emp (no publicado); *Pseudoalteromonas* sp. A28 EmpI (Lee y col., 2002); *Pseudomonas aeruginosa* LasB (Cahan y col., 2001); *Vibrio vulnificus* Vvp (Watanabe y col., 2004)

En la Tabla 46 y la Figura 77 se encuentran los porcentajes de similitud de CP2 con sus proteínas homólogas y el alineamiento de las mismas mediante el programa MegAlign (DNASTar). Este alineamiento muestra distintos motivos que se encuentran conservados en la familia de las metaloproteasas M28 como el motivo HXH en las posiciones ²⁰⁹HLD²¹¹, dos residuos de aspártico ²²⁸D, ²⁹⁰D, dos residuos de glutámico consecutivos ²⁶²EE²⁶³ y un residuo de histidina ³⁶⁷H.

Tabla 46. Similitud entre la proteasa CP2 y proteasas de diferentes microorganismos

Especie bacteriana	Proteína	Longitud (aa) ^a	% de identidad (% similitud) ^b	Región de solapamiento (aa) ^c	Nº acceso
<i>Alteromonas</i> sp. 0-7	MetII	609	58 (75)	587	JC7819
<i>Vibrio cholerae</i>	Amp	501	40 (58)	481	AAF96711
<i>Vibrio proteolyticus</i>	Amp	432	41 (69)	427	AAA21940
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Amp	415	43 (62)	364	AAQ57736
<i>Vibrio harveyi</i>	VhpB	504	35 (51)	499	AAT68712
<i>Aeromonas punctata</i>	ApcAC	393	42 (59)	368	BAA31158
<i>Burkholderia cepacia</i>	Amp	417	40 (58)	379	ZP00213828
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. A28	Empl	731	62 (80)	209	BAB85124
<i>Alteromonas</i> sp. 0-7	MprI	727	65 (78)	207	BAB79615
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Amp	408	39 (58)	372	YP110584
Bacteria antártica	ProM	729	61 (77)	208	AAF78076
<i>Agaricus bisporus</i>	Ape	384	39 (55)	310	CAC85297

^aExtensión en aminoácidos de la proteína

^bPorcentaje de residuos idénticos encontrados en la región de solapamiento

^cEn el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento, se incluyen los "huecos" que introduce el programa BLAST para optimizar el alineamiento

	M---KPTLLSAAL--G--LILAAAAEPVWITVGD-A---LO--DASAGAQLSTTL-A--	Consenso
1	1	Aeromonas punctata Apac
1	1	Alteromonas sp. MetII
1	1	Burkholderia cepacia Amp
1	1	Chromobacterium violaceum Amp
1	1	Pseudoalteromonas sp. EmpI
1	1	Vibrio cholerae Amp
1	1	Vibrio proteolyticus Amp
1	1	Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP2
	---SAGETVHVVEVDASL-----LGELSHAM-----HEEHGRCGG--YVVHDS	Consenso
43	51	Aeromonas punctata Apac
51	51	Alteromonas sp. MetII
59	59	Burkholderia cepacia Amp
56	56	Chromobacterium violaceum Amp
59	59	Pseudoalteromonas sp. EmpI
43	43	Vibrio cholerae Amp
2	2	Vibrio proteolyticus Amp
53	53	Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP2
	LQDARAAI-----QALPPTLAKFAAPSVY-ISNOAQVNALLPOLASNIIVGTISLS-	Consenso
86	90	Aeromonas punctata Apac
102	102	Alteromonas sp. MetII
99	99	Burkholderia cepacia Amp
102	102	Chromobacterium violaceum Amp
86	86	Pseudoalteromonas sp. EmpI
17	17	Vibrio cholerae Amp
92	92	Vibrio proteolyticus Amp
92	92	Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP2
	-SFTNRYYYTSSGVQASDWLALQWQQLAGSRADVTVEQFAHSGYPQKSVVLTIKGSELA-	Consenso
134	141	Aeromonas punctata Apac
141	141	Alteromonas sp. MetII
154	154	Burkholderia cepacia Amp
150	150	Chromobacterium violaceum Amp
154	154	Pseudoalteromonas sp. EmpI
134	134	Vibrio cholerae Amp
65	65	Vibrio proteolyticus Amp
144	144	Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP2
	--DETUVVIGGHLIDSTVGSSTNEOSRAPGAD--DDASGIASLTEA-	Consenso
192	198	Aeromonas punctata Apac
198	198	Alteromonas sp. MetII
212	212	Burkholderia cepacia Amp
208	208	Chromobacterium violaceum Amp
212	212	Pseudoalteromonas sp. EmpI
192	192	Vibrio cholerae Amp
123	123	Vibrio proteolyticus Amp
201	201	Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP2
	----LRVLVANNYKPKRTIKF-----MGVAAEE-----VGLR-GSKAIAKQYKYSQGAN	Consenso
232	236	Aeromonas punctata Apac
236	236	Alteromonas sp. MetII
251	251	Burkholderia cepacia Amp
248	248	Chromobacterium violaceum Amp
251	251	Pseudoalteromonas sp. EmpI
232	232	Vibrio cholerae Amp
163	163	Vibrio proteolyticus Amp
240	240	Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP2
	VV-----GALOLDMTNYKGS AEDIVLITD-----YTNSGQNOFLTNL A-	Consenso
275	279	Aeromonas punctata Apac
279	279	Alteromonas sp. MetII
294	294	Burkholderia cepacia Amp
291	291	Chromobacterium violaceum Amp
294	294	Pseudoalteromonas sp. EmpI
275	275	Vibrio cholerae Amp
206	206	Vibrio proteolyticus Amp
283	283	Pseudoalteromonas ruthenica CP76 CP2

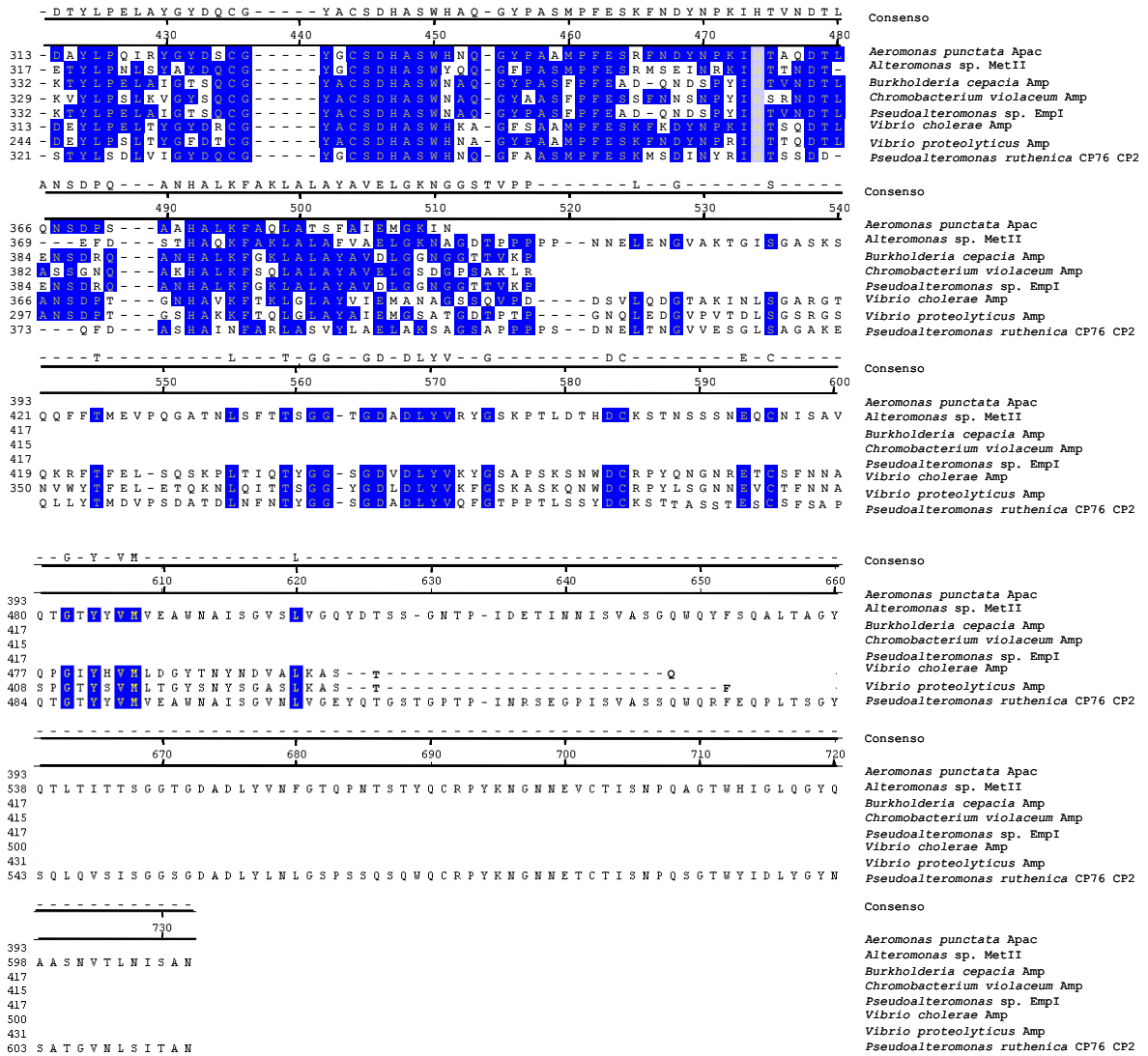


Figura 77. Alineamiento de la proteasa CP2 con proteínas homólogas depositadas en las bases de datos utilizando el programa MegAlign (DNASTar). Los fragmentos idénticos aparecen sombreados en azul. Los dominios característicos de las metaloproteasas de la familia M28 se encuentran sombreados en azul claro. Las proteasas utilizadas en los diferentes aislamientos fueron: *Aeromonas punctata* ApAc (Izawa y Hayashi, 1996); *Alteromonas* sp. 0-7 MetII (Miyamoto y col.,2002); *Burkholderia cepacia* Amp (no publicado); *Chromobacterium violaceum* Amp (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003); *Pseudoalteromonas* sp. A28 Empl (Lee y col., 2002); *Vibrio cholerae* Amp (Heidelberg y col., 2000); *Vibrio proteolyticus* Amp (Van Heeke y col., 1992)

La búsqueda de dominios conservados en la haloproteasa CP1 utilizando la base de datos CDD (Conserved Domain Database) (Marchler-Bauer y Bryant, 2004) en el servidor del NCBI revela que la haloproteasa CP1 está compuesta por un péptido señal, una secuencia pro-N-terminal, la proteína madura y dos dominios PCC que constituyen la región pro-C-terminal (Figura 78). Estos dominios se encuentran conservados en el extremo C-terminal de otras proteasas bacterianas extracelulares. Su función no está clara, aunque podrían estar implicados en el proceso de secreción. Estos dominios pueden sufrir un procesamiento durante la maduración de la proteína.

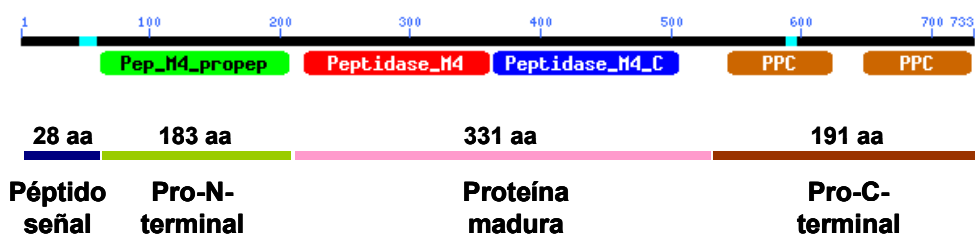


Figura 78. Dominios conservados de la haloproteasa CP1

De la misma manera, se ha realizado la búsqueda de dominios conservados en la proteasa CP2 en la base de datos CDD (Marchler-Bauer y Bryant, 2004). El análisis de la secuencia mostró la presencia de un péptido señal, la proteína madura y dos dominios PCC, que constituyen el dominio pro-C-terminal (Figura 79).

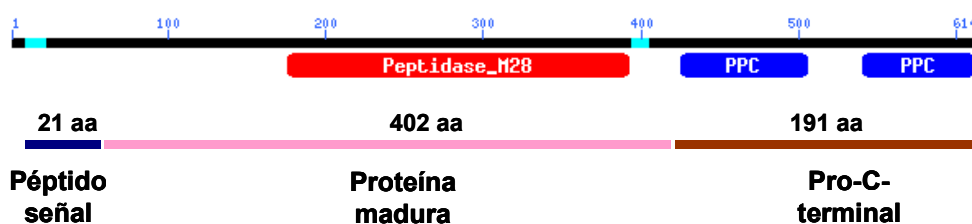


Figura 79. Dominios conservados de la proteasa CP2

En la Tabla 47 se muestran los porcentajes de similitud de los dominios pro-N- y C-terminales conservados en la haloproteasa CP1 y la proteasa CP2 con otros dominios homólogos pro-N y C-terminales de proteasas relacionados.

Tabla 47. Similitud entre los dominios conservados de CP1 y CP2 y dominios homólogos de proteasas de diferentes microorganismos

	Pro-N-terminal	Pro-C-terminal	Pro-C-terminal de CP2
(BAB85124)	60%	83%	80%
<i>Alteromonas</i> sp. 0-7 MetI	58%	80%	79%
<i>Alteromonas</i> sp. 0-7 MetII (JC7819)		74%	79%
Bacteria antártica ProM (AAF78076)	58%	75%	
<i>Vibrio vulnificus</i> Met (AAC45343)	54%	58%	72%
(JT0903)	51%	56%	56%
<i>Alteromonas</i> sp. 0-7 April (AAC60459)	-	61%	62%

Además, se ha analizado la presencia de péptidos señal en las tres proteínas, la haloproteasa CP1, la proteasa CP2 y la esterasa LipP, mediante el programa informático Signal P (Bendtsen y col., 2004) utilizando el método de Hidden Markov Models (HMM). Las tres proteínas, poseen péptido señal. La posición de corte más probable de la peptidasa señal en la haloproteasa CP1 es entre los aminoácidos 28 y 29; en la proteasa CP2 entre los aminoácidos 21 y 22 y en la esterasa LipP entre los aminoácidos 23 y 24 (Figura 80).

También se muestran los resultados obtenidos mediante el programa SOSUI (Hirokawa y col., 1998; Mitaku e Hirokawa, 1999; Mitaku y col., 1999; 2002), que analiza la hidrofobicidad de las proteínas y detecta las posibles regiones o hélices transmembranas. Tanto CP1 como CP2 parecen ser proteínas solubles con un promedio de hidrofobicidad de $-0,406957$ y $-0,325775$ respectivamente. No se detectan regiones transmembrana a excepción de la zona correspondiente a los péptidos señal de ambas proteínas (Figura 81). Además la predicción del programa informático PSORTb (Gardy y col., 2005) confirma que se trata de proteínas extracelulares.

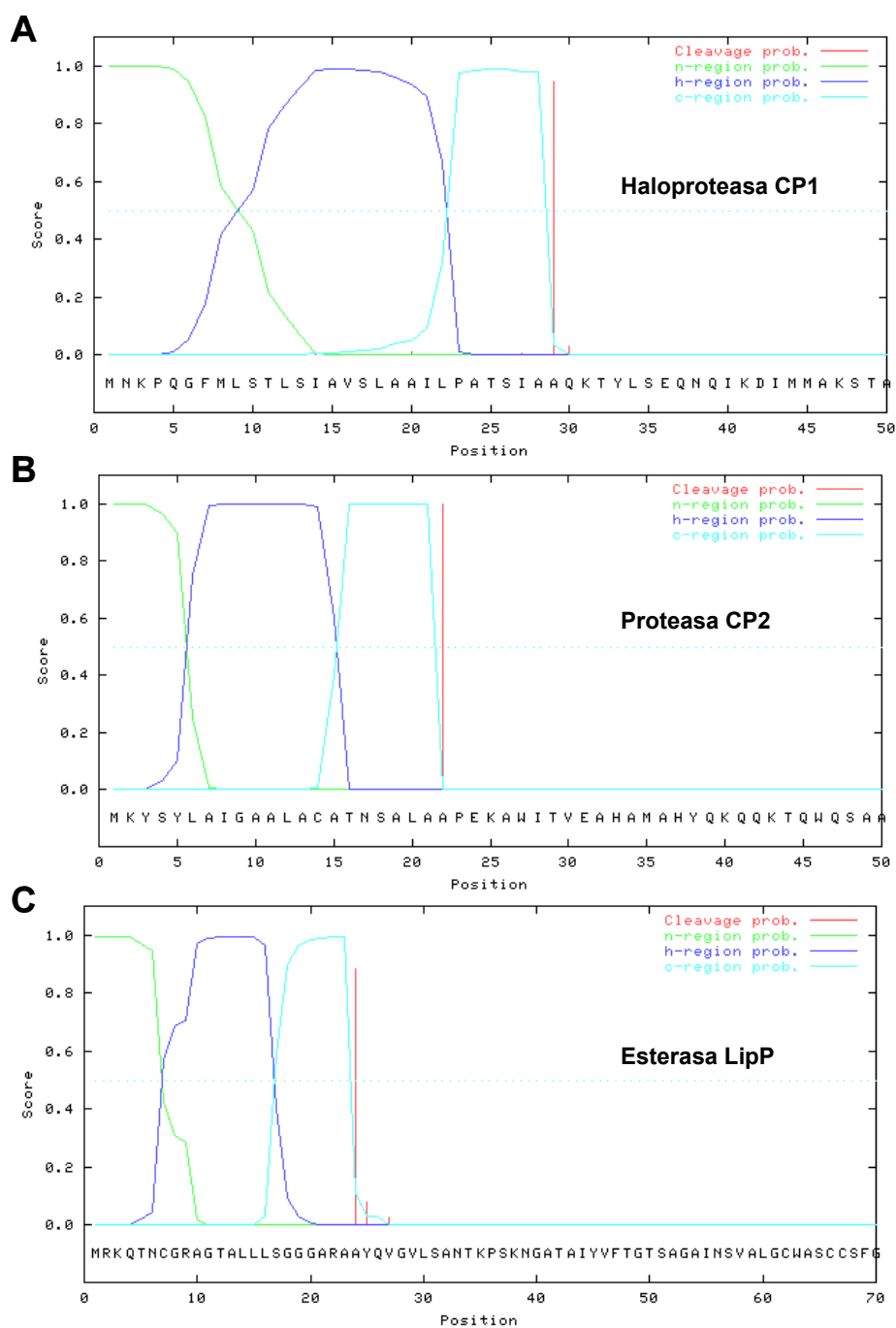


Figura 80. Predicción del péptido señal de la haloproteasa CP1 (A), proteasa CP2 (B) y esterasa LipP (C) usando el programa Signal P.

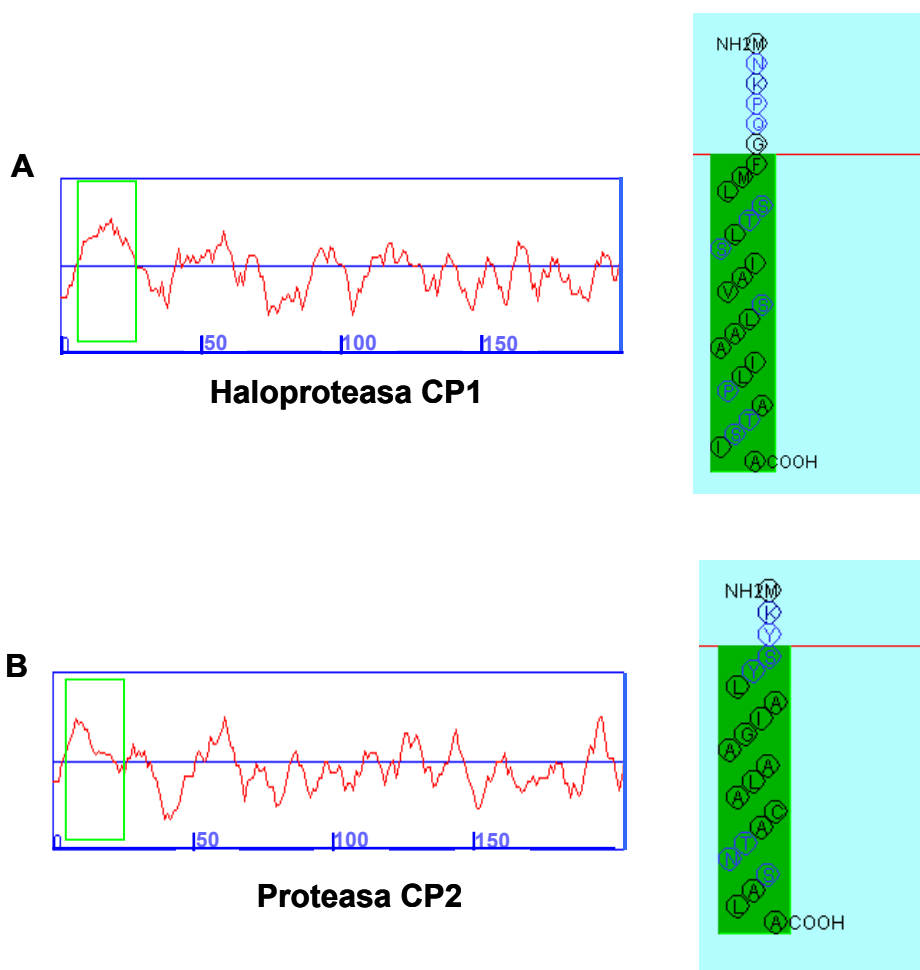


Figura 81. Perfiles de hidrofobicidad de la haloproteasa CP1 (A) y de la proteasa CP2 (B), calculados mediante el programa de predicción de regiones transmembrana SOSUI. A la derecha se muestra con más detalle la región transmembrana enmarcada en verde

En la Figura 82 se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos de ambas proteasas CP1 y CP2. Mientras que no se observa una gran similitud en el extremo N-terminal, ésta aumenta notablemente en el extremo C-terminal.

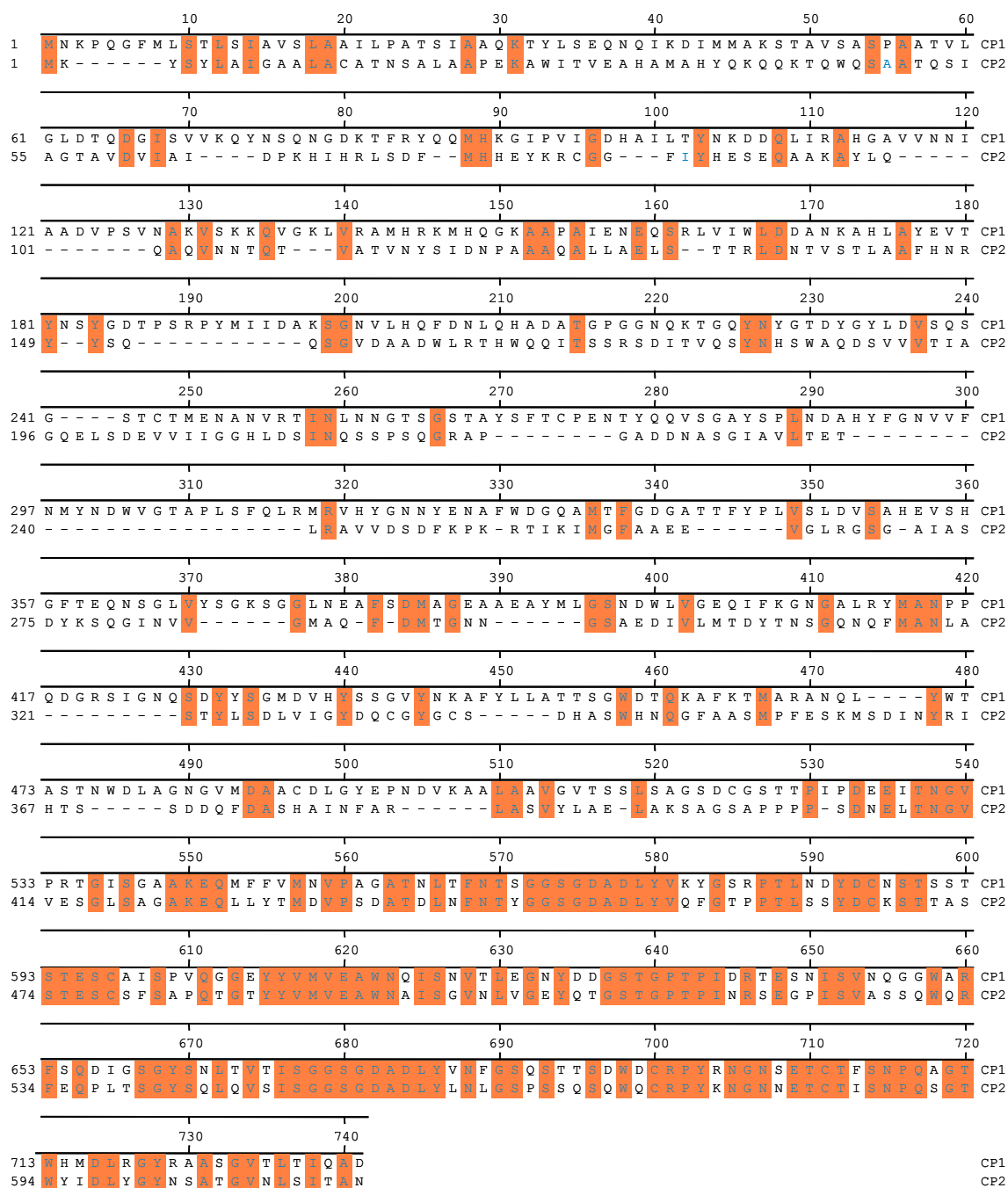


Figura 82. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la haloproteasa CP1 y la proteasa CP2 utilizando el programa MegAlign (DNASTar)

En la Tabla 48 se muestra una comparación de las proteínas CP1 y CP2 con proteasas de diversos microorganismos. En la Figura 83 se representa la posición filogenética de las proteínas CP1 y CP2 de *P. ruthenica* CP76 con respecto a las proteasas de otras bacterias y haloarqueas relacionadas. Se realizó un alineamiento previo utilizando la aplicación MegAlign (DNASTar), mediante el programa Clustal W que sirvió como base para la construcción del árbol filogenético.

Tabla 48. Comparación de las principales características de las proteasas CP1 y CP2 y diversas proteasas depositadas en las bases de datos de diferentes microorganismos

Especie bacteriana	Nº aa	Aa básicos (%) ^a	Aa ácidos (%) ^b	hidrofóbicos (%) ^c	Aa polares (%) ^d	Peso molecular (kDa)	isoelectrico	Carga a pH 7
	733	6,1	9,5	29,7	36,2	78,813		-22,98
2	614	5,0	9,6	32,1	37,6	65,871	4,6	-25,80
3	590	7,1	8,3	35,5	30,7	62,562	6,1	
4	727	6,9	9,5	30,5	36,7	78,365	5,1	-17,17
5	609	5,1	9,2	30,7	39,2	65,681	4,8	-22,79
6	729	5,9	9,3	31,7	36,5	77,680	4,7	-23,48
7	591	3,9	5,1	33,8	36,7	57,793	5,2	-6,077
8	417	8,2	8,9	36,0	30,4	44,500	6,8	-0,98
9	489	9,4	8,6	35,2	31,1	52,975	8,4	5,12
10	478	6,1	11,5	30,8	35,1	51,147	4,3	-24,73
11	588	4,4	9,9	43,9	22,8	61,260	4,3	-31,03
12	519	6,2	12,1	30,2	34,1	53,489	4,3	-29,84
13	529	8,7	11,2	30,0	31,4	58,711	5,9	-10,40
14	611	7,2	8,7	32,1	35,2	66,725	5,9	-7,43
15	380	10,3	13,4	32,9	26,8	42,122	5,1	-10,98
16	247	5,7	16,6	30,4	27,5	26,064	4,0	-26,29
17	700	5,6	9,3	31,3	37	74,488	4,6	-24,61
18	424	8,7	10,4	32,5	29,5	46,185	6,1	-5,36
19	432	5,1	9,9	30,1	37,5	46,574	4,6	-19,55
20	609	7,2	9,0	32,5	33,5	66,000	6,0	-8,61

1. *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 CP1 (este trabajo)
2. *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 CP2 (este trabajo)
3. *Aeromonas punctata* ProAC (BAA82875)
4. *Alteromonas* sp. MetI (JC7818)
5. *Alteromonas* sp. MetII (JC7819)
6. Bacteria antártica ProM (AAF78076)
7. *Brucella melitensis* Esp (NP_541126)
8. *Burkholderia cepacia* (ZP_00213828)
9. *Chromobacterium violaceum* LasB (AAQ57737)
10. *Erwinia chrysanthemi* Met (A36137)
11. *Haloarcula marismortui* Met (AAV47876)
12. *Haloferax mediterranei* Hal (BAA10958)
13. *Legionella longbeachae* MspA (CAA58144)
14. *Listonella anguillarum* Emp (AAL03940)
15. *Methanosarcina acetivorans* Prt (AAM05912)

16. *Natrialba magadii* Nep (AAV66536)
17. *Pseudoalteromonas* sp. Empl (BAB85124)
18. *Pseudomonas aeruginosa* Zmet (ZP_00137118)
19. *Vibrio proteolyticus* Amp (CAA78039)
20. *Vibrio vulnificus* Vvp (BAC22940)

^aAminoácidos básicos: K y R

^bAminoácidos ácidos: D y E

^cAminoácidos hidrofóbicos: A, I, L, F, W y V

^dAminoácidos polares: N, C, Q, S, T, y Y

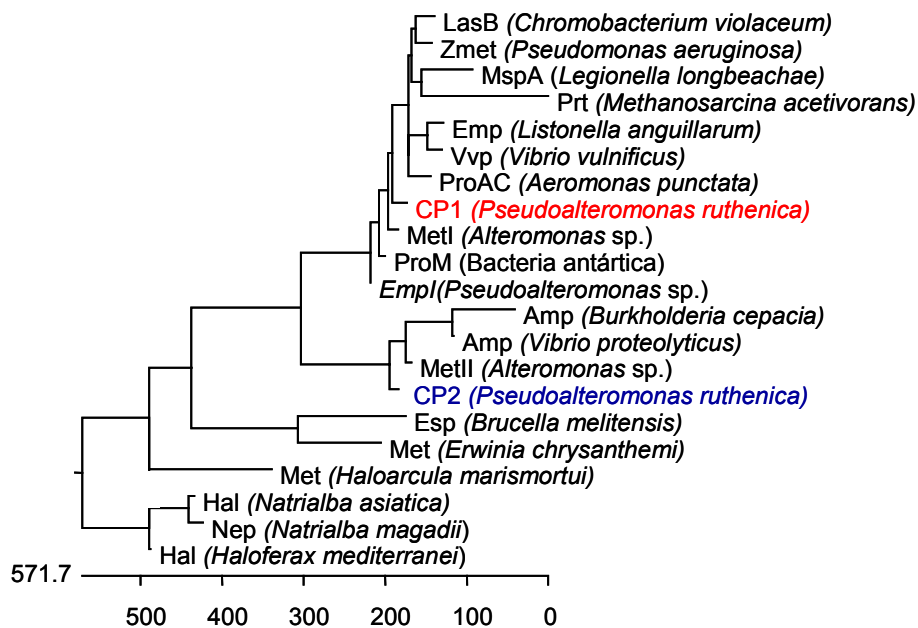


Figura 83. Árbol filogenético que muestra la posición de las proteasas CP1 y CP2 de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 con otras proteasas depositadas en las bases de datos

IV.9.5.1. Análisis predictivo de la estructura tridimensional de CP1 y CP2

Cuando una secuencia de estructura desconocida tiene un homólogo claro de estructura conocida se puede modelar basándose en esta estructura, siempre que la similitud sea alta y el alineamiento de ambas proteínas sea correcto, ya que las proteínas que poseen secuencias de aminoácidos similares muestran una tendencia a adoptar estructuras tridimensionales parecidas (Lecks y col., 1996).

Se realizó el alineamiento de las secuencias entre las proteasas CP1 y CP2 y las enzimas cuyas estructuras cristalinas están resueltas. Para ello, se introdujo la secuencia de ambas proteínas por separado en el servidor Expaty Molecular Biology, en la base de datos Swiss-Model Repository.

El programa informático Swiss-Model realiza un modelo teórico para la secuencia mediante algoritmos de homología. Permite la construcción del modelo de forma totalmente automática y el programa asociado Swiss-Pdb-viewer permite el refinamiento manual del modelado.

También se ha utilizado el programa Cn3 del servidor NCIB, que permite la identificación de los dominios conservados de las proteínas. Este programa utiliza el programa BLAST y la base de datos CCD para predecir la estructura terciaria de la proteína.

En las Figuras 84 y 85 se presentan los modelos teóricos obtenidos mediante los programas Cn3 (haloproteasa CP1) y Swiss-Model (proteasa CP2).

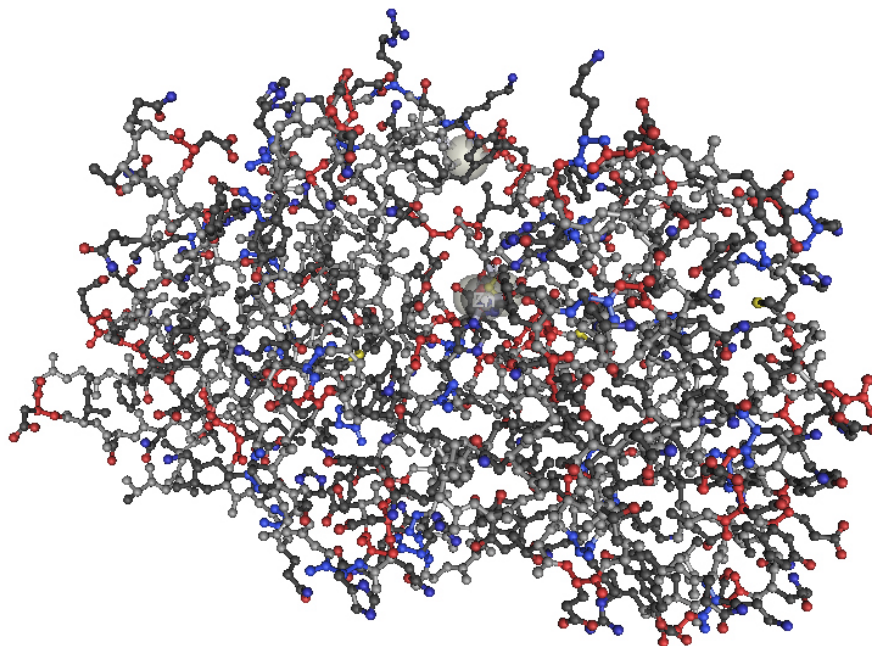


Figura 84. Predicción de la estructura tridimensional de la haloproteasa CP1. Los aminoácidos ácidos se muestran en color rojo y los básicos en color azul

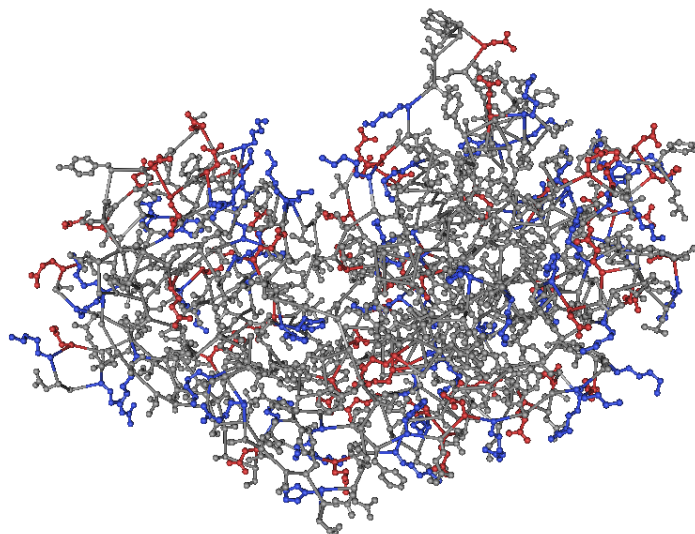


Figura 85. Predicción de la estructura tridimensional de la proteasa CP2. Los aminoácidos ácidos se muestran de color rojo y los básicos en color azul

IV.10. EXPRESIÓN DE LOS GENES *cp1* Y *cp2*. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Una vez identificados los genes *cp1* y *cp2*, procedimos a su expresión en *E. coli* con dos objetivos, en primer lugar, comparar la actividad en diferentes condiciones de la proteína recombinante CP1 con la proteína nativa y estudiar sus características. En segundo lugar, su expresión en *E. coli* nos permitirá obtener la proteína a mayor escala, y utilizarla en la obtención de anticuerpos específicos anti-CP1 y anti-CP2 para realizar posteriores estudios sobre la secreción de dichas proteínas.

IV.10.1. Clonación en el vector pET22b(+)

Para la expresión de los genes *cp1* y *cp2* en *E. coli* se eligió el vector de expresión pET22b(+), que permite, sin romper el marco de lectura, insertar la secuencia del gen que se pretende expresar e incorporar seis unidades de histidina en el extremo C-terminal. Además, está presente la secuencia que codifica el péptido líder de la proteína periplásmica pelB, por lo que la proteína sintetizada es conducida al espacio periplásmico. De esta manera se realiza un acoplamiento traduccional entre el marco de lectura del gen y la secuencia de ADN que codifica las 6 histidinas. La secuencia de ADN que codifica las proteínas CP1 y CP2 se obtuvo mediante PCR. Para ello, se diseñaron dos pares de cebadores CP1E/CP1X y CP2H/CP2X para la amplificación de los genes *cp1* y *cp2*, respectivamente (Figura 86). Los cebadores se diseñaron incluyendo las secuencias de restricción *EcoRI* (extremo N-terminal) y *XhoI* (extremo C-terminal) para *cp1* y las secuencias *HindIII* (extremo N-terminal) y *XhoI* (extremo C-terminal) para *cp2*, con el fin de dirigir el inserto en el proceso de clonación. Los cebadores CP1X y CP2X, que amplifican en los extremos C-terminales de ambas proteínas, fueron diseñados de forma que eliminaban el codón de terminación. Las enzimas de restricción elegidas no cortaban en ningún punto de la secuencia de los respectivos genes.

Ambos productos de PCR (Figura 87) se insertaron en el vector pBC KS(+) digerido con *EcoRV* y se obtuvieron los plásmidos pProt1 y pProt2, respectivamente. Las construcciones se trataron con las enzimas de restricción *EcoRI/XhoI* (pProt1) y *HindIII/XhoI* (pProt2), para extraer los genes, subclonarlos en el vector pET22b(+) digerido con las mismas enzimas y obtener de esta manera los plásmidos pEProt1 y pEProt2 (Figuras 88 y 89). Ambos genes recombinantes se secuenciaron para comprobar que la amplificación era correcta y que las secuencias estaban en fase de lectura correcta; para ello, se utilizaron tanto los cebadores universales como cebadores diseñados a partir de la secuencia.

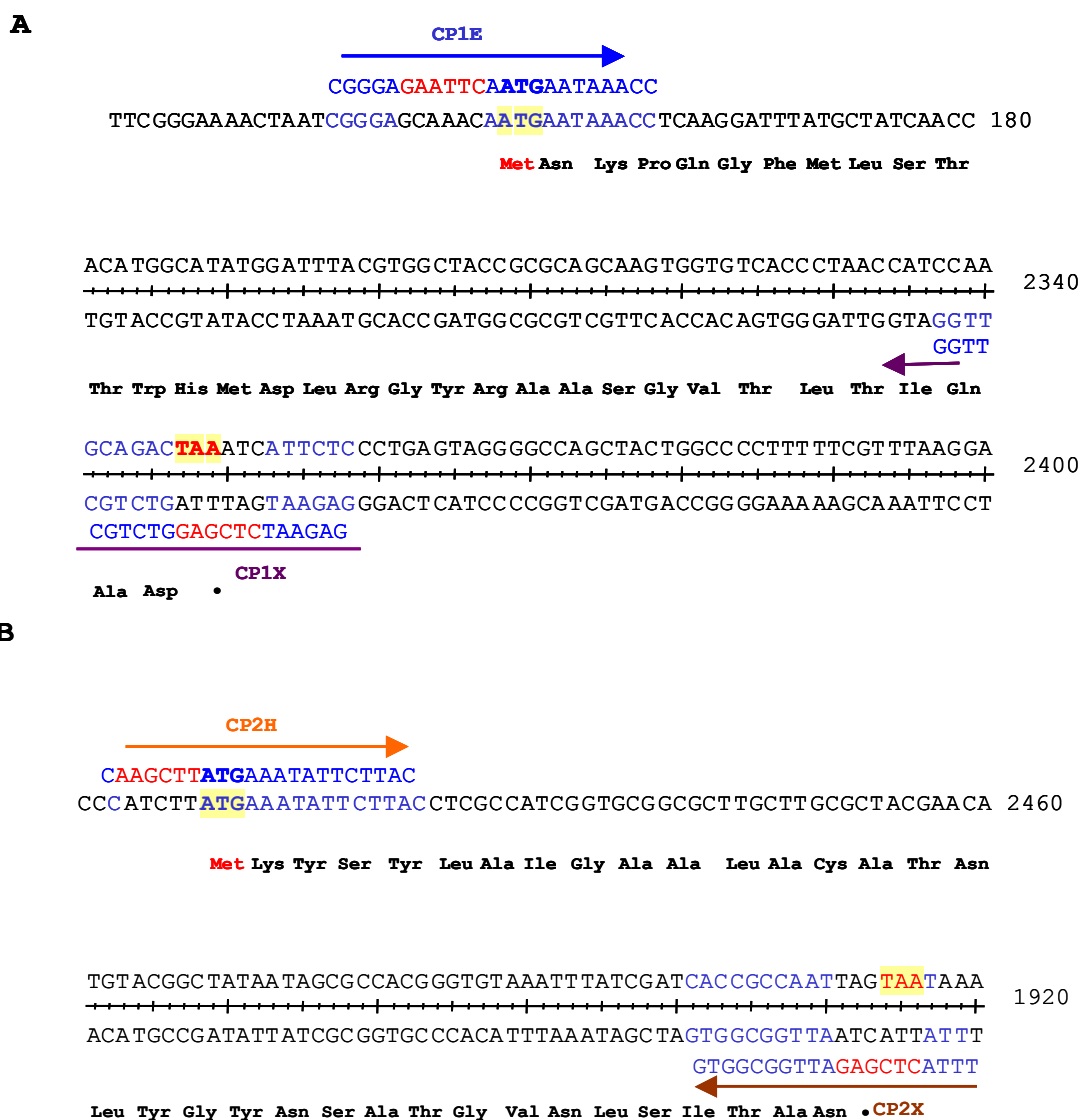


Figura 86. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes *cp1* y *cp2*. Los codones de inicio y terminación de ambos genes se representan sombreados en amarillo. A. Diseño de los cebadores CP1E y CP1X, utilizados para amplificar el gen *cp1*. En rojo se representa la secuencia de corte para las enzimas *EcoRI* (GAATTC) y *XhoI* (CTCGAG); B. Diseño de los cebadores CP2H y CP2X utilizados para amplificar el gen *cp2*. En rojo se representa la secuencia de corte para las enzimas *HindIII* (AAGCTT) y *XhoI* (CTCGAG)

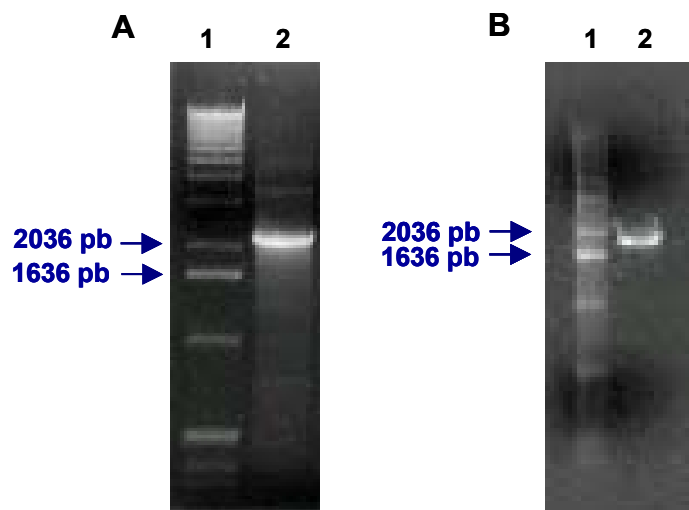


Figura 87. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las reacciones de amplificación de los genes *cp1* y *cp2* que codifican CP1 y CP2, respectivamente, utilizando ADN total de *P. ruthenica* CP76 como molde. A. 1, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; 2, Reacción de amplificación de *cp1* (2.202 pb); B. 1, Marcador de pesos moleculares 1 kb ladder; 2, Reacción de amplificación de *cp2* (1.845 pb)

IV.10.2. Expresión y purificación de las proteasas recombinantes CP1 y CP2

Los plásmidos pEProt1 y pEProt2 se transformaron en *E. coli* BL21(DE3) para llevar a cabo la expresión de estos genes según se explica en el apartado III.15.3.

Se procedió a la expresión de ambas proteínas en *E. coli*, si bien no se ha obtenido un resultado positivo en el caso de la proteína recombinante CP2, por lo que a partir de ahora todos los resultados se refieren únicamente a la proteína CP1.

En primer lugar, se procedió a analizar las distintas fracciones del cultivo, para ver dónde se encontraba la proteína expresada. Las fracciones que se analizaron fueron: fracción celular total, fracción del medio extracelular, fracción periplásmica, fracción citoplasmática soluble y fracción citoplasmática insoluble o cuerpos de inclusión.

Las muestras analizadas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE mostraron que se obtenía expresión de la proteína en la fracción celular total (que incluye todas las fracciones) y en la fracción citoplasmática insoluble, por lo que se deduce que la proteína recombinante CP1 forma cuerpos de inclusión (Figura 90).

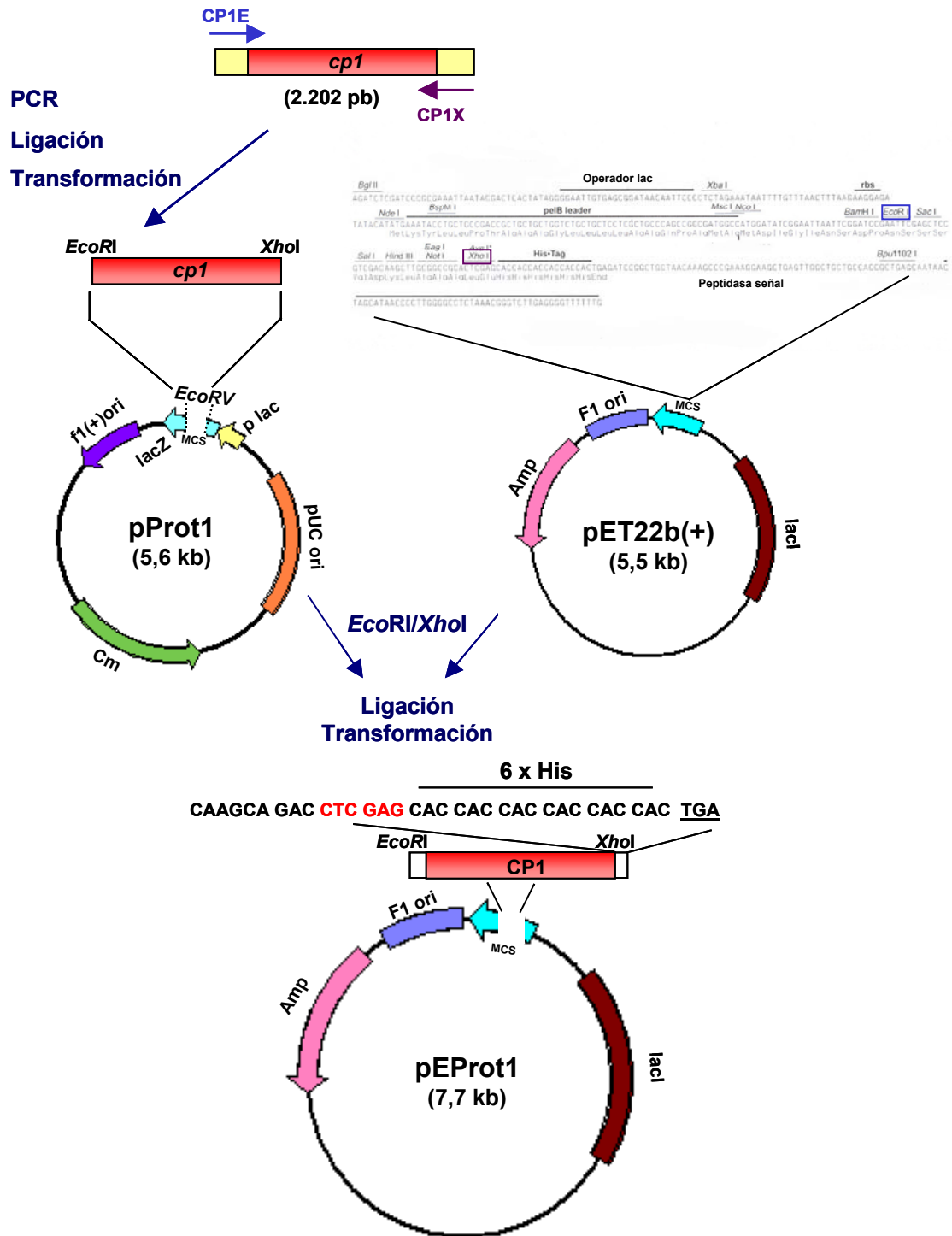


Figura 88. Estrategia seguida para la clonación del gen *cp1* en el vector de expresión pET22b(+), incluyendo una fusión de seis unidades de histidina en su extremo C-terminal. De esta manera se obtuvo el plásmido pEProt1 de un tamaño de 7,7 kb

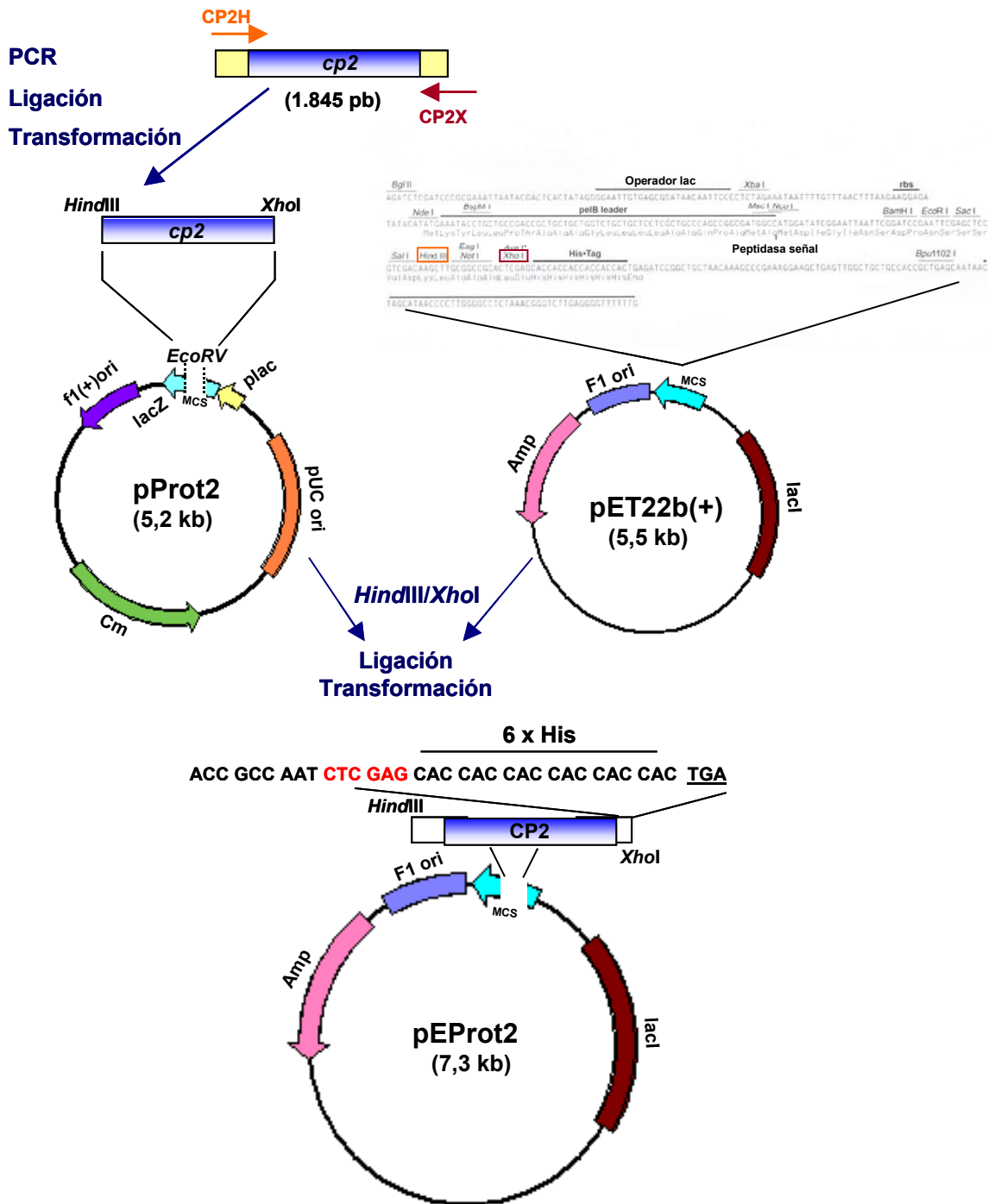


Figura 89. Estrategia seguida para la clonación del gen *cp2* en el vector de expresión pET22b(+), incluyendo una fusión de seis unidades de histidina en su extremo C-terminal. De esta manera se obtuvo el plásmido pEProt2 de un tamaño de 7,3 kb

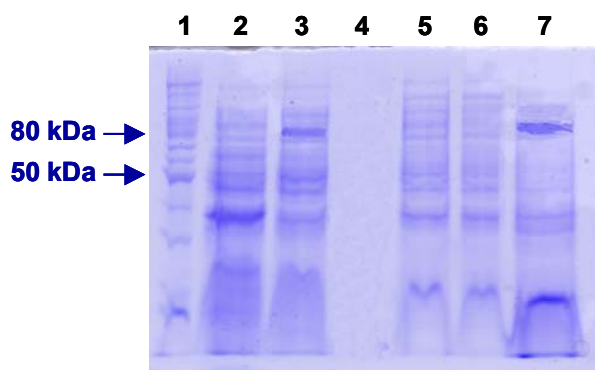


Figura 90. Análisis en gel SDS-PAGE de las fracciones inducidas con 0,5 mM de IPTG de la proteína recombinante CP1 mediante electroforesis tras la tinción con azul de Coomassie. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Fracción celular total sin inducir; 3. Fracción celular total; 4. Fracción de medio extracelular; 5. Fracción periplásmica; 6. Fracción citoplasmática soluble; 7. Fracción citoplasmática insoluble

IV.10.2.1. Solubilización de los cuerpos de inclusión

Una vez comprobado que la sobreexpresión de la proteína CP1 recombinante se producía en la fracción citoplasmática insoluble, se procedió al tratamiento de los cuerpos de inclusión y posterior plegamiento de la proteína para su renaturalización. En un primer término se trató de solubilizar la proteína en el interior de la célula durante el proceso de crecimiento e inducción; para ello, el microorganismo se cultivó a 37°C y una vez añadido el inductor IPTG se mantuvo a 25°C, ya que de esta forma es posible, en determinados casos, dirigir la expresión proteica a la fracción soluble. En este caso no fue así, ya que la proteína se continuaba encontrando en la fracción insoluble.

La solubilización de los cuerpos de inclusión se llevó a cabo utilizando urea 8 M como agente solubilizante. Como se observa en la Figura 91 la expresión de la proteína es mayor a las concentraciones de IPTG 0,5 y 1 mM, por lo que a partir de este momento decidimos utilizar 0,5 mM de IPTG para inducir los cultivos.

Una vez solubilizados los cuerpos de inclusión, medimos la actividad de la proteína expresada, siguiendo el Método de Kunitz y no detectamos actividad. Procedimos, por tanto, a renaturalizar la proteína y recuperar su actividad. Para ello, realizamos numerosos ensayos variando en cada uno de ellos el tampón donde adicionamos la proteína, con el fin de determinar las condiciones óptimas de plegamiento de la misma. La proteína CP1 solubilizada en el tampón de urea fue adicionada, a concentraciones crecientes de 10, 20 y 40 µg/ml, en diferentes tampones de renaturalización TrisHCl 20 mM en los que variamos la concentración de NaCl (1-3 M), DTT (0-50 mM) y MgCl₂ (0-20 mM) con el fin de encontrar las condiciones óptimas que favorecieran el plegamiento de la proteína. Además

se ensayaron diferentes temperaturas 4°C, 25°C y 37°C ya que se ha descrito que la temperatura es un factor importante en el proceso de plegamiento de proteínas.

Seguidamente se procedió a su concentración con ayuda de un filtro Pellicon XL Biomax 30 (Millipore) asociado a una bomba de vacío. Se realizó el ensayo de actividad al filtrado que se obtenía después del tratamiento en las distintas condiciones mencionadas, no detectándose actividad en ninguna de las condiciones ensayadas.

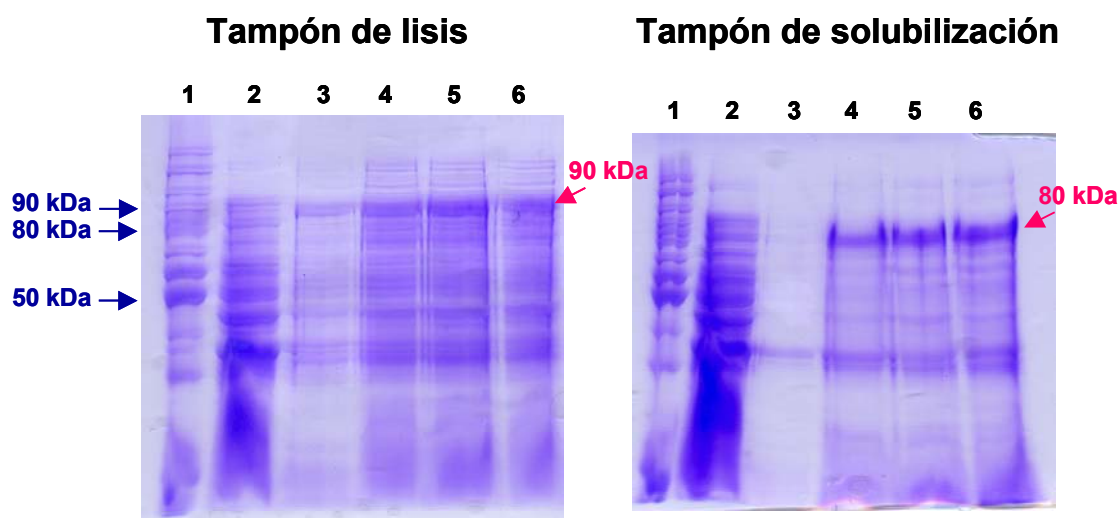


Figura 91. Expresión de la proteasa CP1 recombinante mediante electroforesis en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. Las muestras de la izquierda están resuspendidas en tampón de lisis (la proteína no es soluble en este tampón) y las muestras de la derecha están resuspendidas en

IV.10.2.2. Purificación mediante columnas de afinidad de la proteasa CP1 recombinante

La presencia de la cola de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína nos permitió purificarla por cromatografía de afinidad, utilizando una resina de níquel (HiTrap Chelating HP, Amersham), metal afín a las histidinas de la proteína. Para ello se partió de extractos de *E. coli* BL21(DE3) que contenían la proteína CP1 sobreexpresada. Dichos extractos se trataron, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, para solubilizar los cuerpos de inclusión y este solubilizado se mantuvo en contacto con la resina. Tras eluir la columna con 100 mM de imidazol, obtuvimos la proteína CP1 purificada (Figura 92).

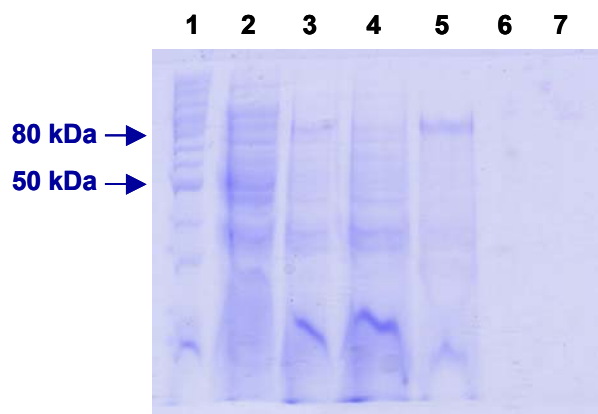


Figura 92. Gel de SDS-PAGE correspondiente a la purificación de la haloproteasa CP1 recombinante mediante cromatografía de afinidad. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Proteínas totales de *E. coli* BL21(D3) silvestre; 3. Muestra inducida y solubilizada antes de ponerla en contacto con la columna; 4. Fracción no unida a la columna; 5. Elución con 100 mM de Imidazol; 6. Elución con 200 mM de Imidazol; 7. Elución con 300 mM de Imidazol

Este método nos permite obtener cantidades suficientes de la haloproteasa CP1 para poder realizar posteriores estudios entre los que destacamos la inmunización de conejos para la obtención de anticuerpos específicos de la misma y poder realizar un estudio detallado de su secreción.

IV.11. ESTUDIOS DE SECRECIÓN

Las proteasas CP1 y CP2 mostraron homología con metaloproteasas aisladas de distintas especies del género *Vibrio*, como *V. vulnificus*, *V. fluvialis* o *V. cholerae*, además de con proteasas aisladas de especies de los géneros *Aeromonas* y *Pseudoalteromonas*. En estos géneros bacterianos la mayoría de los sistemas de secreción de proteínas se han descrito como pertenecientes al Sistema General de Secreción (GSP) de tipo II. La alta similitud que presentan dichas proteasas CP1 y CP2 con las enzimas de los géneros antes mencionados nos indujo a pensar que el sistema de secreción más probable que utilizase *Pseudoalteromonas rutherfordiana* CP76 fuese dicho sistema GSP de tipo II, que por otra parte, es el más extendido y utilizado por bacterias Gram-negativas. El aparato de secreción de tipo II está compuesto por 12-16 genes diferentes (dependiendo de las especies) que forman un complejo multiproteico localizado en el espacio periplásmico y es esencial para la translocación a través de la membrana externa. La mayoría de estos genes están muy conservados entre las distintas especies y se transcriben en un sólo operón, aunque existen algunas excepciones (Sandkvist 2001a; 2001b; Thanassi, 2002). Así, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes* los genes que codifican las proteínas C y D están localizados en un operón diferente (de Groot y col., 2001). La supresión de

algunos de estos genes produce como resultado una inhibición de la secreción acumulándose la proteína en el interior de la célula (Filloux, 2004).

Debido a que algunos genes que forman parte de la maquinaria de secreción de tipo II como los genes que codifican las proteínas C, D y E (este sistema está ampliamente descrito en el apartado I.4.2.1 de Introducción) se encuentran muy conservados entre las distintas especies bacterianas, nos propusimos amplificar dichos genes utilizando la técnica de PCR.

IV.11.1. Detección y amplificación mediante PCR del gen que codifica la proteína D en *P. ruthenica* CP76

Una de las proteínas más importantes y que se encuentran muy conservadas en este tipo de secreción es la proteína D. Esta proteína pertenece a una gran familia de proteínas homólogas llamadas secretinas y es la encargada de formar el poro en la membrana externa (Bitter y col., 1998; Bitter, 2003).

Con el fin de seleccionar unas regiones conservadas en las proteínas D que nos permitieran el diseño de cebadores para amplificar por PCR esa región nucleotídica, se procedió a realizar un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diversas proteínas D de microorganismos Gram-negativos disponibles en las bases de datos (Tabla 49). Para ello, se utilizó el programa MegAlign (DNASTar) (Figura 93). De esta manera, a partir de las regiones más conservadas se diseñaron los cebadores WmpDL y WmpDR.

Tabla 49. Selección de proteínas D de diversos microorganismos Gram-negativos

Especie bacteriana	Proteína	Longitud (aa)	Nº de acceso secuencia	Referencia
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	WmpD	689	AAL76242	Egan y col. (2002)
<i>Vibrio cholerae</i>	EpsD	674	P45779	Heidelberg y col. (2000)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ExeD	678	CAA56668	Karlyshev y MacIntyre (1995)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ExeD	678	P31780	Jiang y Howard (1992)
<i>Escherichia coli</i>	GspD	616	AAL60184	Tauschek y col. (2002)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PulD	660	AAA25126	D'Enfert y col. (1989)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	OutD	712	B47021	Linderberg y Collmer (1992)
<i>Peptobacterium carotovorum</i>	OutD	650	P31701	Reeves y col. (1993)

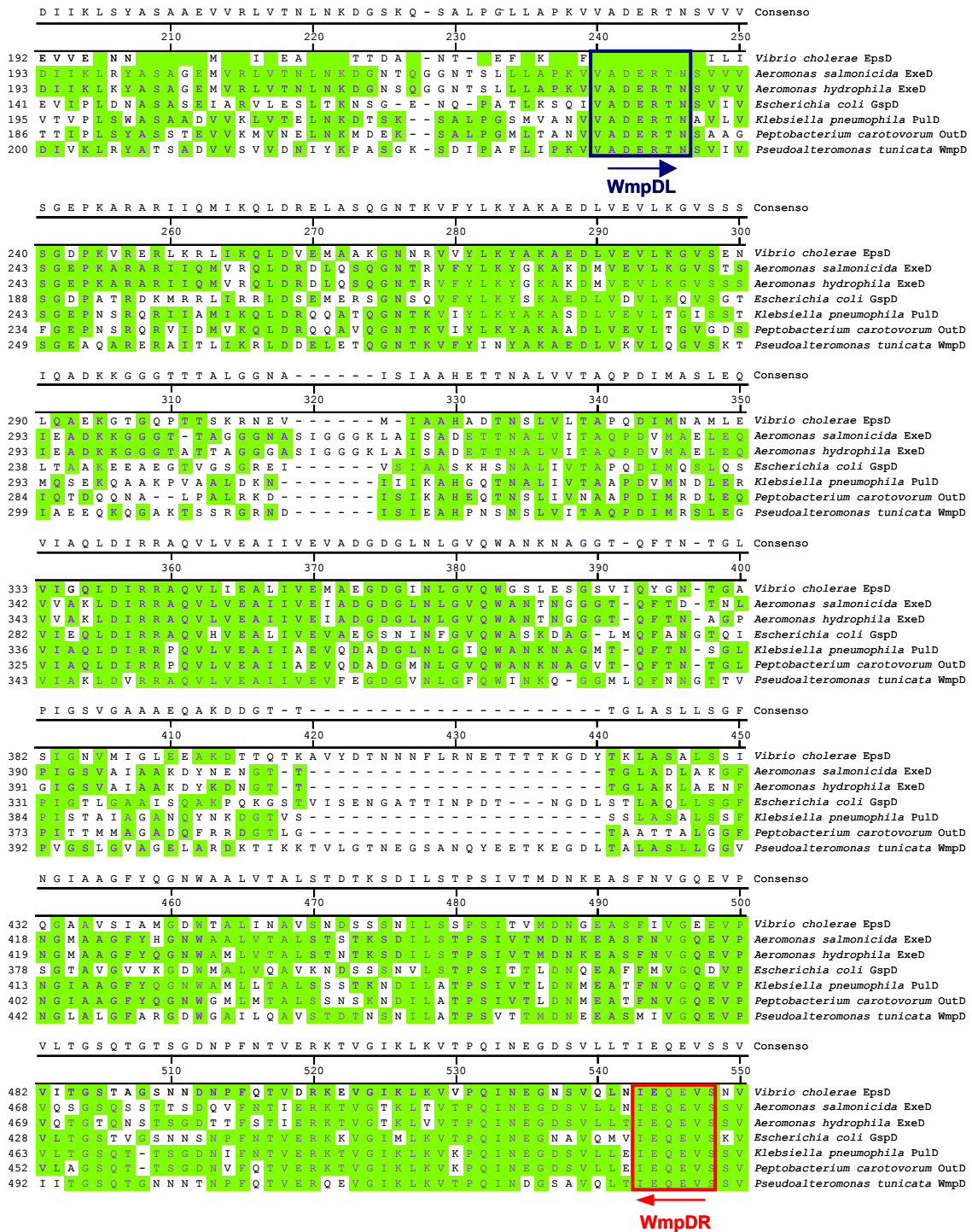


Figura 93. Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas D de diversas bacterias Gram-negativas depositadas en las bases de datos. Los aminoácidos idénticos aparecen sombreados en verde. Las flechas indican las regiones conservadas utilizadas para el diseño de los correspondientes cebadores WmpDL (en azul) y WmpDR (en rojo). La referencia de las proteínas utilizadas en el alineamiento se encuentra en la Tabla 49

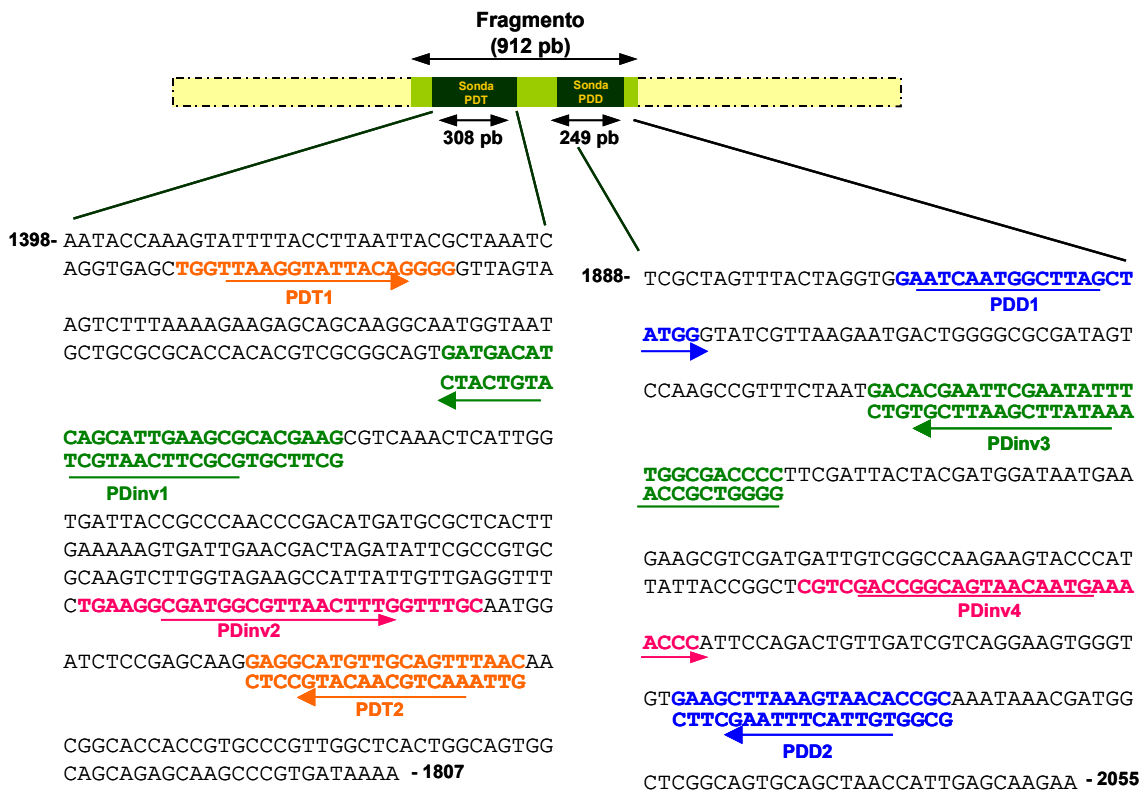
Utilizando los cebadores WmpDL y WmpDR se amplificó mediante PCR un fragmento de 912 pb, que se clonó en el vector pCR 2.1-TOPO y al plásmido resultante se le denominó pPD1. Para confirmar que el fragmento amplificado era el correcto, éste se secuenció y se realizó una comparación (BLAST) con las secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos. La secuencia proteica correspondiente a estas 912 pb presentó una alta similitud con diversas proteínas D depositadas en las bases de datos. La mayor similitud (76%) la presentó con la proteína WmpD de *Pseudoalteromonas tunicata* (Egan y col., 2002).

Este mismo procedimiento se realizó con las proteínas C y E, no obteniéndose resultados positivos en estos casos.

IV.11.2. PCR inversa para la obtención del gen completo que codifica la proteína D

Para obtener el gen completo que codifica la proteína D se utilizó la técnica de PCR inversa, que nos ha permitido amplificar zonas adyacentes a la ya conocida (912 pb). Para ello, se amplificaron dos regiones distintas por PCR del fragmento de 912 pb, con el fin de utilizarlas como sondas y se marcaron con digoxigenina tal y como se describe en el apartado III.13 de Material y Métodos. Para amplificar las sondas se diseñaron cebadores de las zonas terminales de la secuencia conocida. Se diseñaron dos parejas de cebadores, PDT1 y PDT2, que amplificaban un fragmento de 308 pb, constituyendo la sonda "corriente arriba", denominada PDT y la pareja de cebadores PDD1 y PDD2, que amplificaron un fragmento de 249 pb, constituyendo la sonda "corriente abajo", denominada PDD.

El ADN total de *P. ruthenica* CP76 se digirió con diferentes enzimas de restricción que se conocía que no cortaban a las respectivas sondas PDT y PDD. Después de realizar las correspondientes transferencias por Southern blot, el ADN total de la cepa digerido con cada una de las enzimas seleccionadas, *AclI*, *Avall*, *BamHI*, *ClaI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *PstI*, *SacI*, *SalI*, *XbaI* y *XhoI* para la zona corriente arriba de la sonda PDT y *Avall*, *AvlI*, *BamHI*, *BglII*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HpaI*, *PstI*, *SacI*, *SalI*, *XbaI* y *XhoI* para la zona corriente abajo de la sonda PDD, se hibridó con sus sondas respectivas para elegir un fragmento de restricción de tamaño apropiado, para ser posteriormente amplificado por PCR inversa. Tras el revelado de las membranas que se muestran en las Figuras 95 y 96 se eligieron los fragmentos *AclI* y *HinfI*, de aproximadamente 1,7 kb, correspondientes a la sonda PDT (corriente arriba) y el fragmento *EcoRV*, de aproximadamente 2,2 kb, correspondiente a la sonda PDD (corriente abajo).



F

Los fragmentos correspondientes a la sonda PDT se amplificaron con los cebadores PDIn1 y PDIn2 y el fragmento correspondiente a la sonda PDD se amplificó con los cebadores PDIn3 y PDIn4. Los fragmentos así obtenidos se muestran en la Figuras 95 y 96.

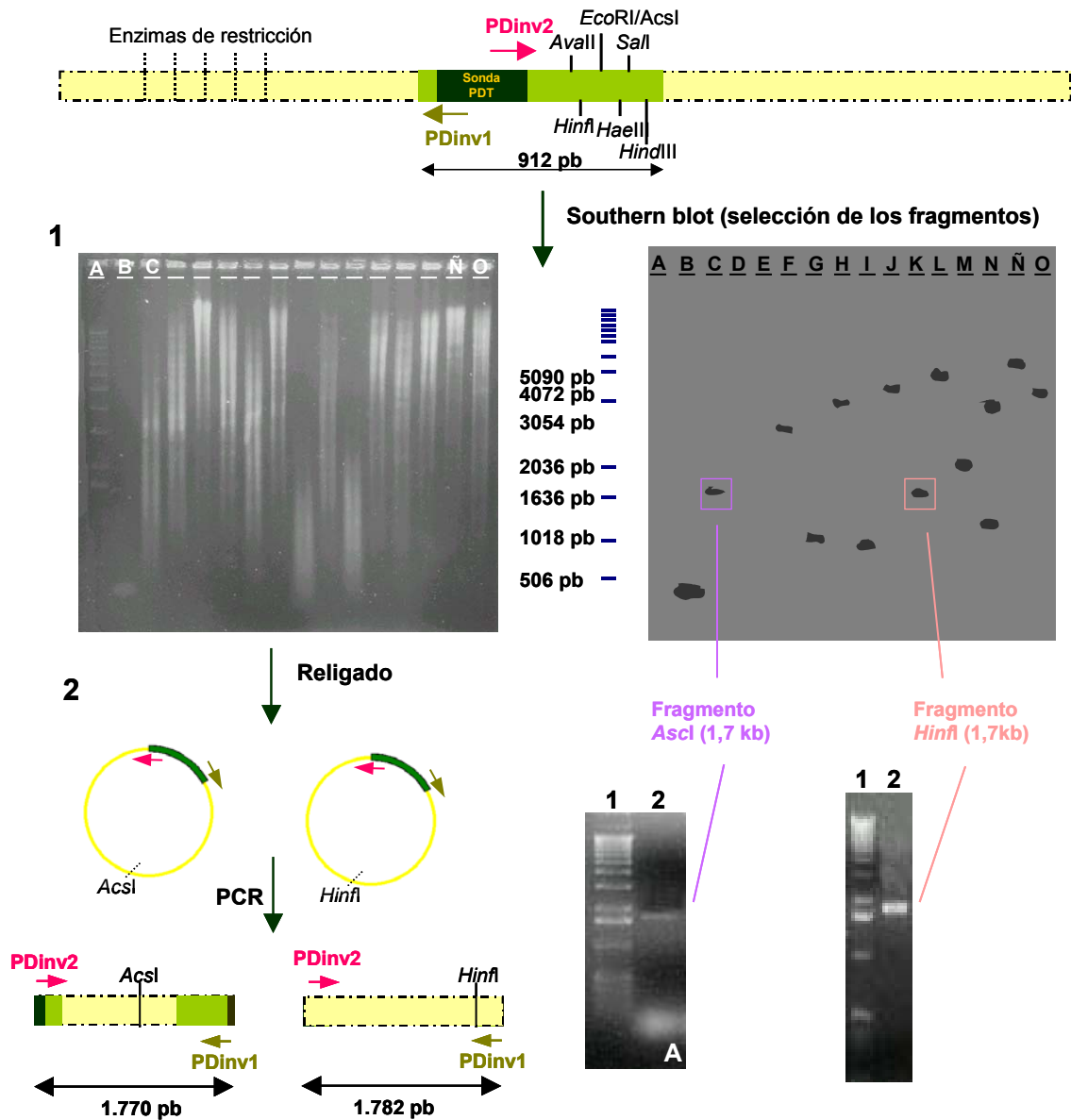


Figura 95. Técnica de PCR inversa utilizada para la amplificación de la zona de secuencia desconocida corriente arriba del fragmento incluido en el clon pPD1. 1. Digestiones del ADN genómico de *P. ruthenica* CP76 con diferentes enzimas de restricción y revelado de la membrana tras la hibridación con la sonda PDT. A, Marcador de pesos moleculares; B, Fragmento de 308 pb de la sonda PDT. Las digestiones se realizaron con: C, *Ascl*; D, *Aval*; E, *BamHI*; F, *Clal*; G, *DraI*; H, *EcoRI*; I, *HaeIII*; J, *HindIII*; K, *Hinfl*; L, *PstI*; M, *Sacl*; N, *Sall*; Ñ, *XbaI* y O, *XhoI*. 2. Amplificación mediante PCR inversa utilizando los cebadores PDInv1 y PDInv2. A, Fragmento *Acsl*. 1, Marcador de pesos moleculares; 2, Amplificación del fragmento de 1,7 kb; B, Fragmento *Hinfl*. 1, Marcador de pesos moleculares; 2, Amplificación del fragmento de 1,7 kb

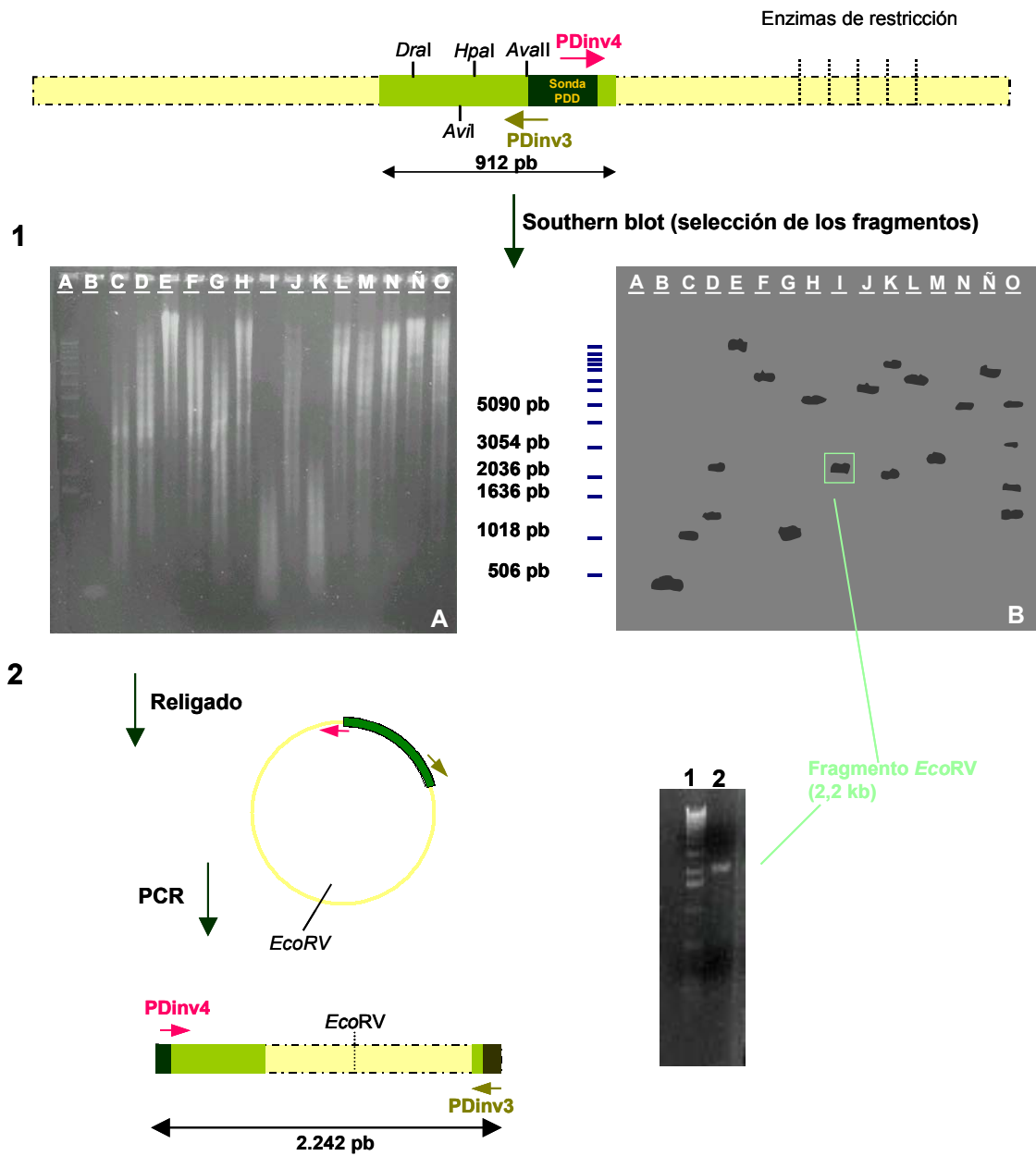


Figura 96. Técnica de PCR inversa utilizada para amplificar zonas de secuencia desconocida corriente abajo del fragmento incluido en el clon pPD1. 1. Digestiones del ADN genómico de *P. rutenica* CP76 con diferentes enzimas de restricción y revelado de la membrana tras la hibridación con la sonda PDD. A, Marcador 1 kb DNA ladder; B, Fragmento de 249 pb de la sonda PDD. Las digestiones se realizaron con: C, *Avall*; D, *Avil*; E, *BamHI*; F, *BglI*; G, *DraI*; H, *EcoRI*; I, *EcoRV*; J, *HindIII*; K, *HpaI*; L, *PstI*; M, *SacI*; N, *Sall*; Ñ, *XbaI* y O, *XhoI*. 2. Amplificación mediante PCR inversa del fragmento *EcoRV* utilizando los cebadores *PDinv3* y *PDinv4*. 1. Marcador de pesos moleculares; 2. Amplificación del fragmento de 2,2 kb

Para secuenciar los fragmentos *AcsI* (1,7 kb), *HinI* (1,7 kb) y *EcoRV* (2,2 kb), se clonaron en el vector pBC KS(+) cortado con *EcoRV* (genera extremos romos), obteniéndose los plásmidos pPD2 (5,1 kb), pPD3 (5,1 kb) y pPD4 (5,6 kb), respectivamente (Figura 97). Posteriormente, se procedió a su secuenciación utilizando para ello tanto los cebadores universales T3 y T7 como cebadores diseñados a partir de la secuencia obtenida (Figura 98).

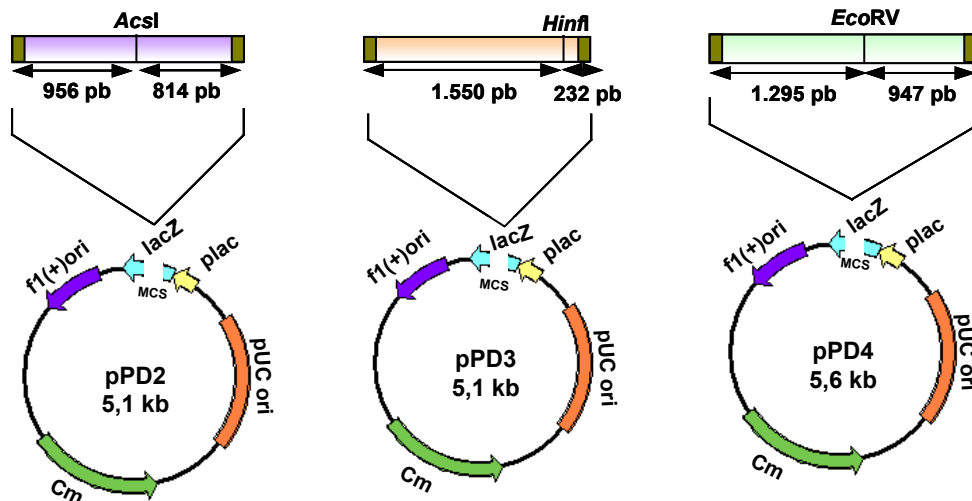


Figura 97. Esquema de los plásmidos pPD2, pPD3 y pPD4, portadores de los fragmentos de ADN genómico de 1,7 kb (pPD2), 1,7 kb (pPD3) y 2,2 kb (pPD4). La zona de secuencia desconocida de pPD2 se muestra en morado, la de pPD3 en rosa y la de pPD4 en verde

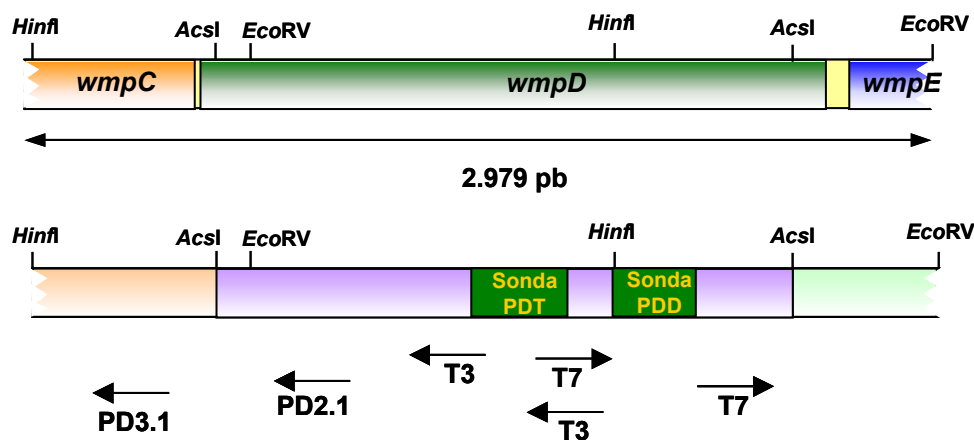


Figura 98. Estrategia de secuenciación de los fragmentos adyacentes a la sondas PDT y PDD, contenidos en las plásmidos pPD2, pPD3 y pPD4. En la parte superior del esquema se representa la correspondencia de estas regiones con los genes *wmpC*, *wmpD* y *wmpE*

IV.11.3. Análisis molecular de la región secuenciada

La secuencia completa comprende una región de 2.979 pb con un contenido en G+C de 48 moles% (Figura 99). El análisis de la secuencia mediante el programa EditSeq (DNASTar) mostró la presencia de 3 posibles regiones codificantes orientadas en el mismo sentido, dos de las cuales están incompletas. El ORF2, denominado *wmpD* está completo, consta de 2.067 pb y se extiende entre las posiciones 586 a 2652 del fragmento analizado. La secuencia de aminoácidos deducida de este ORF, denominada WmpD, se comparó con las bases de datos de proteínas mediante el programa BLAST (Altschul y col., 1997), presentando homología con proteínas D implicadas en el sistema de secreción de tipo II de diversos microorganismos. Las características de la proteína WmpD se muestran en la Tabla 50. El ORF1, denominado *wmpC*, y el ORF3, denominado *wmpE*, aunque están incompletos, muestran homología con proteínas C y proteínas E respectivamente, implicadas también en el sistema de secreción de tipo II. La mayor similitud la presentan frente a la proteína WmpC de *Pseudoaltheomonas tunicata* (62%) y la proteína WmpE de *Idiomarina loihiensis* (49%).

Tabla 50. Características bioquímicas de la proteína WmpD

Nº aminoácidos	688
Aminoácidos básicos (K y R) (%)	10,4
Aminoácidos ácidos (D y E) (%)	13,3
Aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V) (%)	35,7
Aminoácidos polares (N, C, Q, S, T, Y) (%)	25,3
Peso molecular (kDa)	74,85
Punto isoeléctrico	4,9
Carga a pH 7	-18,82

GAATCCCAAGGGCGCCAAGAGCCTACGGTTTGAAGGTTTTTCAAAGGAACCGCGCTAA 60
 R I P R A P R A Y G L K V F Q R N R A L
 ACGGGCAAAGTACTTCTGACGGAGTTATTTGGAAGTCGGGGCGCGTTTGAACACTGT 120
 N G Q K Y F L T E L F G S R G A F E T L
 TGCTTGACGGCTTGAGCTCCACTAAAACCGTATCTATGCCTGTGCCAGCAAGTCGGCCAC 180
 L L D G L S S T K T V S M P V P A S R P
 AAGCTGATAATGCTCCCAAAGCGAGTGCCGTAAGCCGAAAACCATCAATGCCACAGCCA 240
 Q A D N A P K A S A G K P K T I N A T A
 GTGCCGAGGCCAAGCAAGCTCTACAGCAAACACGCAAACAAATTCTTGCCGACCCAGGAA 300
 S A E A K Q A L Q Q T R K Q I L A D P G
 AGTTATCGGAGTATCTACGTATCACTCCGGCACGTAACCAAGGTCGTCTACAAGGGTATA 360
 K L S E Y L R I T P A R N Q G R L Q G Y
 AATTAAGCCCTGAAAAGATCCGGCCCTATTTAAACAAATGGGCCTTGAAAATAATGACA 420
 K L S P G K D P A L F K Q M G L E N N D
 TCGCCATTGCTATAAATGGTTATCAGCTAACCGATATGAAACAAGCCATGGCAGCATTGC 480
 I A I A I N G Y Q L T D M K Q A M A A L
 AAGAGCTGCGCAATAGCACCGACGCATCTATTACCGTGAACCGCAACGGGCAACTGTTCCG 540
 Q E L R N S T D A S I T V N R N G Q L F
 ATGTGCAATTTAGCCTGCAATAATcacacgtttggagtaagaacaATGGGCGCGAAATTT 600
 D V Q F S L Q . M G A K F
 CGCACAAAAATAATAAAGGGGCTTGCCAAGTATGGCGCGCTACTTTTCGCCGCTGGGGTA 660
 R T K I I K G L A K Y G A L L F A A G V
 AGTTTAAATCTATACGCAGTCGAATATGCGGCAAACCTTAAGGGCACAGATATCAACGAG 720
 S L N L Y A V E Y A A N F K G T D I N E
 TTTATCAATATCGTTGGTAAAAACCTTAACAAGACGGTGATCATTGACCCCAATGTACGT 780
 F I N I V G K N L N K T V I I D P N V R
 GGCAAATTAATGTGCGTAGCTACGAGCTCATGGATGAACAGCTGTACTATCAATTCTTC 840
 G K I N V R S Y E L M D E Q L Y Y Q F F
 CTCAACGTTCTCGAAGTACACGGCTATGCTGCTGTCGAAATGCCAAGTGGTATCATTA 900
 L N V L E V H G Y A A V E M P S G I I K
 GTAGAGAAAAGCTCAGACGCGAAAAAGTCTAATGTGCCAGTCATCGGTGAAGATGACGGC 960
 V E K S S D A K K S N V P V I G E D D G
 ATGGGCGGTGATATGCTGGTAACTCGGGTTGTGCGAGTGAAAAATGTAACCGTCCAAGAG 1020
 M G G D M L V T R V V R V K N V T V Q E
 TTGGGTCCACTGATCCGTCAGTTTAGTGACCAAAAAGATGGCGGCCATGTTACCAACTTT 1080
 L G P L I R Q F S D Q K D G G H V T N F
 AACCCCTCTAACGTCATGATGCTGACCGGTCATGCCGAGTCGGTAAACCGCCTAGTGAA 1140
 N P S N V M M L T G H A E S V N R L V E
 ATTATTGCTTGGTTGACCAAGCCGGTGATAACGTGTTGATATTGTGCGTCTGAAACAC 1200
 I I R L V D Q A G D K R V D I V R L K H

GCCACGGCCTCTGATGTGGTGTCTGTTGTTGATAATATTTTTAAAGACAATGGCAAAGGC 1260
A T A S D V V S V V D N I F K D N G K G
AGCGTCCCCGACTTTTTGATCCCTCGGGTCTGTTGCAGATGAGCGTACCAACAGTGTGATT 1320
S V P D F L I P R V V A D E R T N S V I
GTCAGTGGTGAAGGGCAGGCTCGCACGCGGCCATTGAATTAGTCAAGCGCTTAGATAAC 1380
V S G E G Q A R T R A I E L V K R L D N
GAGCTAGAGACAACCGGAATACCAAAGTATTTTACCTTAATTACGCTAAATCAGATGAG 1440
E L E T T G N T K V F Y L N Y A K S D E
CTGGTTAAGGTATTACAGGGGGTTAGTAAGTCTTTAAAAGAAGAGCAGCAAGGCAATGGT 1500
L V K V L Q G V S K S L K E E Q Q G N G
AATGCTGCGCGCACCACACGTCGCGGCAGTGATGACATCAGCATTGAAGCGCACGAAGCG 1560
N A A R T T R R G S D D I S I E A H E A
TCAAACCTCATTGGTGATTACCGCCCAACCCGACATGATGCGCTCACTTGAAAAAGTGATT 1620
S N S L V I T A Q P D M M R S L E K V I
GAACGACTAGATATTCCCGTGCGCAAGTCTTGGTAGAAGCCATTATTGTTGAGGTTTCT 1680
E R L D I R R A Q V L V E A I I V E V S
GAAGGCGATGGCGTTAACTTTGGTTTGCAATGGATCTCCGAGCAAGGAGGCATGTTGCAG 1740
E G D G V N F G L Q W I S E Q G G M L Q
TTTAAACAACGGCACCACCGTGCCCGTTGGCTCACTGGCAGTGGCAGCAGAGCAAGCCCGT 1800
F N N G T T V P V G S L A V A A E Q A R
GATAAAACCATTACTGACAATGTTGTTGGCTCAGAAAGTGGTGTGGTAACACCGATTAGC 1860
D K T I T D N V V G S E S G V V T P I S
CGTACCGAAGAAGGCGACCTTGGTCCTCTCGCTAGTTTACTAGGTGGAATCAATGGCTTA 1920
R T E E G D L G P L A S L L G G I N G L
GCTATGGGTATCGTTAAGAATGACTGGGGCGCGATAGTCCAAGCCGTTTCTAATGACACG 1980
A M G I V K N D W G A I V Q A V S N D T
AATTCGAATATTTTGGCGACCCCTTCGATTACTACGATGGATAATGAAGAAGCGTCGATG 2040
N S N I L A T P S I T T M D N E E A S M
ATTGTCGGCCAAGAAGTACCCATTATTACCGGCTCGTCGACCGGCAGTAACAATGAAAAC 2100
I V G Q E V P I I T G S S T G S N N E N
CCATTCCAGACTGTTGATCGTCAGGAAGTGGGTGTGAAGCTTAAAGTAACACCGCAAATA 2160
P F Q T V D R Q E V G V K L K V T P Q I
AACGATGGCTCGGCAGTGCAGCTAACCATGAACAAGAAGTATCGAATGTCGCGGGTTCA 2220
N D G S A V Q L T I E Q E V S N V A G S
ACGGCGGTGGATATTTCCATTAACAAACGTGCCATTACCACCACAGTGCTAGCCGACGAT 2280
T A V D I S I N K R A I T T T V L A D D
GGAGGTATGGTTGTGCTCGGCGGTCTTATCGATGAAGATGTCCAAGAAAGTGTCTCTAAA 2340
G G M V V L G G L I D E D V Q E S V S K
GTACCGTTACTTGGTGATATTCCTGTGCTCGGCCACTTATTTAAATCCACCAGTACGTCA 2400
V P L L G D I P V L G H L F K S T S T S


```

AAGCGTAAACGCAATCTTATCGTCTTTATTCGCCCCACAATTTTACGCGATATTGAGAGC 2460
K R K R N L I V F I R P T I L R D I E S
ATGAACCGTTTGGAGCCACAGTAAATATAAATTTATCCGTGGTGAGCAGCTCAAACAAAGC 2520
M N R L S H S K Y K F I R G E Q L K Q S
GATGACGGTATCGACTTGATGCCAACCGAGCAAGTGCCATTACTCCCTGAGTGGAAATGAC 2580
D D G I D L M P T E Q V P L L P E W N D
GCGCTTGTATTGCCACCTACCTATGAAGAGTATCTGAAAGAGCAAAAATAAGGCTGAGCGA 2640
A L V L P P T Y E E Y L K E Q N K A E R
GACATGAACTGAgcaaatcgccgccccaaagcagcgccgaggtgcccgtcactgacgaagc 2700
D M N .
gctgATGGAGGTATCTGAAACCGTTGCCACAGCGCCACTGCGACTGCCATTTGCCTTTGC 2760
M E V S E T V A T A P L R L P F A F A
GCGCCGCTTTCAAGTGCTATTGGTAGAGCATGATGAGACGTTTACTGCTTTTACCATAGC 2820
R R F Q V L L V E H D E T F T A F T I A
CATGATTAGAGCCTCAGGTTATGTTGGAAGTGCCTCGCTTCGCAGGCCGAGGGTTTTTTAG 2880
M I R A S G Y V G S A S L R R P R V F S
CGTAGAACGGTTGCCGAAAGACAAATTCAAACTCGTCCTTGGAGGGCGGCCTTTCAACG 2940
V E R L P E R Q I Q T R P W R A A F Q R
CGATAGTTCGAAACCCAGCAGCTTAATTGGAAGATATC 2979
D S S E T Q Q L N W K I S

```

Figura 99. Secuencia de 2.979 pb amplificada mediante PCR inversa, incluida en los plásmidos pPD1, pPD2, pPD3 y pPD4. Cada uno de los ORFs encontrados se encuentra señalado con colores diferentes: ORF1 (*wmpC*) en naranja; ORF2 (*wmpD*) en verde y ORF3 (*wmpE*) en azul. Los codones de iniciación y terminación se encuentran señalados en negrita. Los posibles sitios de unión al ribosoma o secuencias Shine-Dalgarno (RBS) aparecen sombreados en morado. Asimismo, se muestra la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas. Las secuencias utilizadas para el diseño de los cebadores PDF y PDR aparecen señalados en negrita

Los porcentajes de similitud (BLAST) de WmpD con sus proteínas homólogas disponibles en las bases de datos se recogen en la Tabla 51. Asimismo, se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa MegAling (DNASTar) (Figura 100).

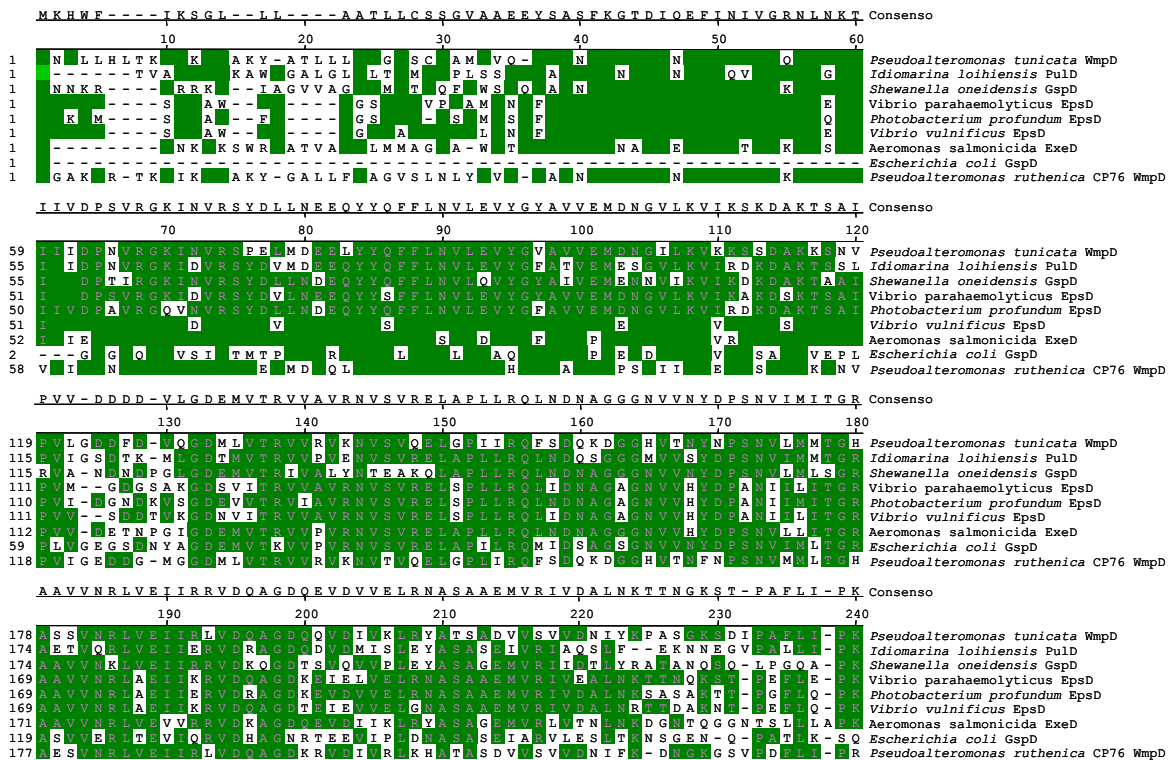
Tabla 51. Similitud entre la proteína wmpD y las proteínas homólogas de diferentes microorganismos

Especie bacteriana	Proteína	(aa) ^a	identidad (% similitud) ^b	solapamiento (aa) ^c	ceso secuencia
<i>seudoalteromonas tunicata</i>	WmpD	689	75 (86)	681	AAL76242
	PulD	708	59 (76)	696	YP156407
<i>Shewanella oneidensis</i>	GspD	704	59 (76)	682	NP_715808
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ProtD	675	51 (72)	669	NP_796512
	EpsD	670	51 (73)	665	YP131554
<i>Vibrio vulnificus</i>	EpsD	672	50 (72)	668	NP933007
<i>Vibrio</i> <i>ri</i>	ProtD	673	51 (71)	673	YP205857
<i>Vibrio cholerae</i>	EpsD	674	50 (71)	668	P45779
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ExeD	678	47 (66)	687	CAA56668
<i>Escherichia coli</i>	GspD	616	49 (71)	620	AAL10693
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PulD	660	44 (62)	675	AAA25126
<i>Erwinia carotovora</i>	OutD	650	45 (65)	532	YP051199

^aNúmero de aminoácidos de la proteína

^bPorcentaje de residuos idénticos encontrados en la región de solapamiento

^cEn el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento, se incluyen los "huecos" que introduce el programa BLAST para optimizar el alineamiento



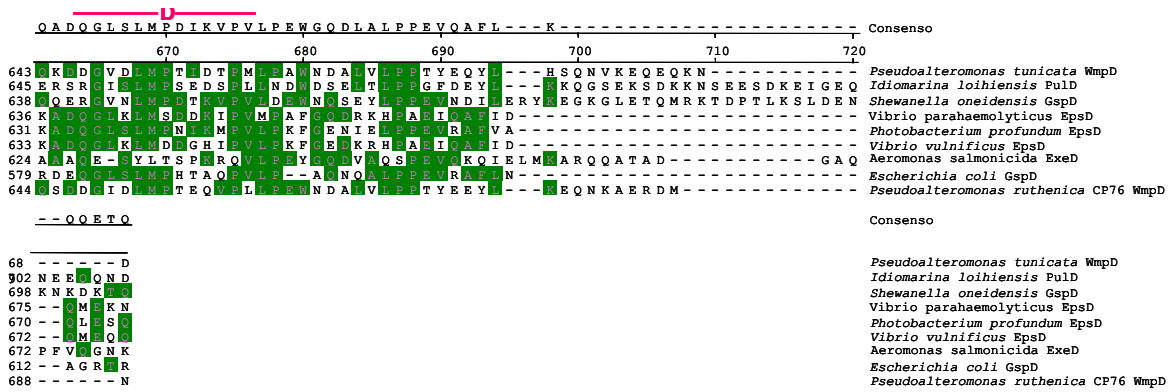


Figura 100. Alineamiento de proteínas D depositadas en las bases de datos que muestran mayor similitud con WmpD. Los fragmentos idénticos aparecen sombreados en verde oscuro. Los residuos de las zonas conservadas (A, B, C y D) en las proteínas D se encuentran sombreados en color verde claro. Las proteínas de los diferentes microorganismos utilizadas en los alineamientos fueron: *Pseudoalteromonas tunicata* WmpD (Egan y col., 2002); *Idiomarina loihiensis* PulD (Hou y col., 2004); *Shewanella oneidensis* MR-1 GspD (Daraselía y col., 2003); *Vibrio parahaemolyticus* ProtD (Makino y col., 2003); *Photobacterium profundum* SS9 EpsD (Vezzi y col., 2005); *Vibrio vulnificus* EpsD (Chen y col., 2003); *Aeromonas salmonicida* ExeD (Karlyshev y MacIntyre, 1995) y *Escherichia coli* GspD (Tauschek y col., 2002)

Según el programa Signal P (Bendtsen y col., 2004), la proteína WmpD posee un péptido señal cuyo sitio de corte más probable por la peptidasa es entre los aminoácidos 31 y 32 (Figura 101).

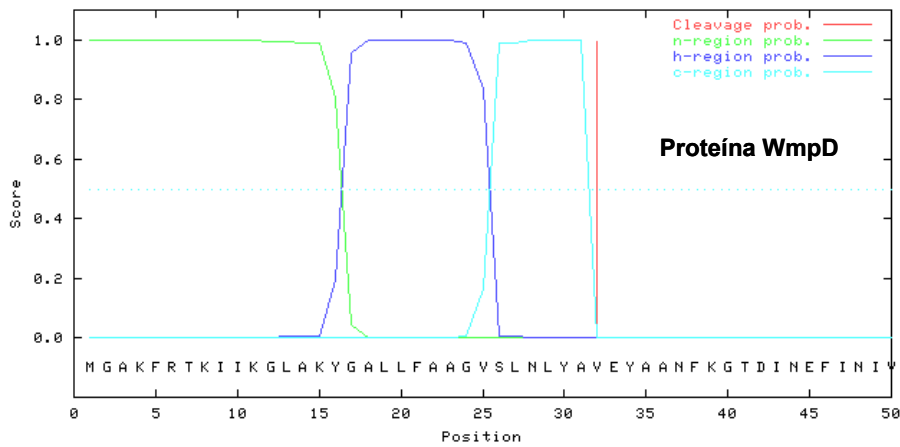
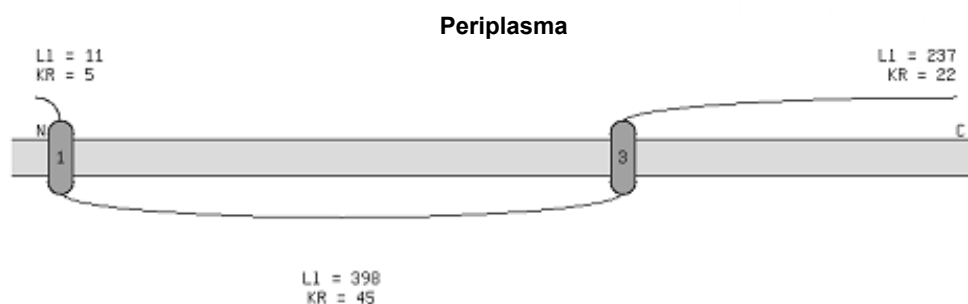


Figura 101. Predicción del péptido señal de la proteína WmpD usando el programa Signal P

La proteína WmpD es una proteína de la membrana externa, como lo determina el programa PSORTb (Gardy y col., 2005), programa de predicción de la localización celular de proteínas. Además la proteína WmpD presenta dos dominio transmembrana por los que se ancla a la membrana externa. Mediante el programa de predicción de topología TopPred (Claros y Heijne, 1994) observamos estas regiones transmembrana (Figura 102).



L

KR: Número de unidades de lisina y arginina

Figura 102. Predicción de la topología de la proteína WmpD de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 mediante el programa TopPred

En la Tabla 52 se muestra una comparación entre la proteína WmpD y las proteínas homólogas de diversos microorganismos depositadas en las bases de datos. Se muestra el número de aminoácidos y algunas características bioquímicas. Todos estos parámetros han sido calculados mediante la aplicación EditSeq del programa DNASTar.

Tabla 52. Comparación de las principales características bioquímicas de WmpD y proteínas homólogas depositadas en las bases de datos

Proteína	Nº aa	Aa básicos (%) ^a	Aa ácidos (%) ^b	Aa hidrofóbicos (%) ^c	Aa polares (%) ^d	Peso molecular (kDa)	Punto isoelectrico	Carga a pH 7
		10,9	12,8	37,9	23,8	73,315	5,1	-12,21
6	670	9,5	11,8	38,2	26,4	72,167	4,9	-14,54
7	678	10,3	10,9	36,3	28,0	72,767	5,8	-3,5
8	616	9,9	11,5	35,7	26,9	66,318	5,2	-9,34
9	660	9,3	10,1	40,6	28,3	70,657	5,4	-4,71
10	650	9,2	10,6	36,0	30,0	70,314	5,2	-8,36
11	753	11,5	14,07	35,8	23,6	83,647	5,3	-17,02

Proteína	Nº aa	Aa básicos (%) ^a	Aa ácidos (%) ^b	Aa hidrofóbicos (%) ^c	Aa polares (%) ^d	Peso molecular (kDa)	Punto isoelectrico	Carga a pH 7
12	625	13,1	11,7	38,9	23,7	69,163	9,1	-9,627
13	763	7,7	9,1	31,4	33,3	81,095	5,0	-10,75
14	640	11,4	11,3	37,3	28,9	71,114	7,9	1,94
15	822	8,8	12,1	35,0	31,0	88,324	4,8	-25,91
16	751	8,0	8,2	33,6	26,4	77,388	6,5	-1,23
17	757	7,8	7,5	37,4	28,9	78,354	8,5	2,77

1. *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 **WmpD** (Este trabajo)
2. *Pseudoalteromonas tunicata* **WmpD** (AAL76242)
3. *Idiomarina loihiensis* **PulD** (YP_156407)
4. *Shewanella oneidensis* **GspD** (NP_715808)
5. *Vibrio parahaemolyticus* **EpsD** (NP_796512)
6. *Photobacterium profundum* **EpsD** (YP_131554)
7. *Aeromonas salmonicida* **ExeD** (CAA56668)
8. *Escherichia coli* **GspD** (AAL60184)
9. *Klebsiella pneumoniae* **PulD** (AAA25126)
10. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* **Out D** (YP_051199)
11. *Chlamydomophila abortus* **GspD** (CAH64356)
12. *Aquifex aeolicus* **GspD** (NP_213884)
13. *Pseudomonas syringae* **GspD** (NP_793090)
14. *Yersinia pestis* **ProtD** (NP_404440)
15. *Rhodospirellula baltica* **OutD** (NP_870964)
16. *Methylococcus capsulatus* **GspD** (AAU92566)
17. *Burkholderia pseudomallei* **GspD** (YP_106632)

^aAminoácidos básicos: K y R
^bAminoácidos ácidos: D y E
^cAminoácidos hidrofóbicos: A, I, L, F, W y V
^dAminoácidos polares: N, C, Q, S, T y Y

En la Figura 103 se muestra la posición filogenética de la proteína WmpD de *P. ruthenica* CP76 con respecto a otras proteínas D depositadas en las bases de datos.

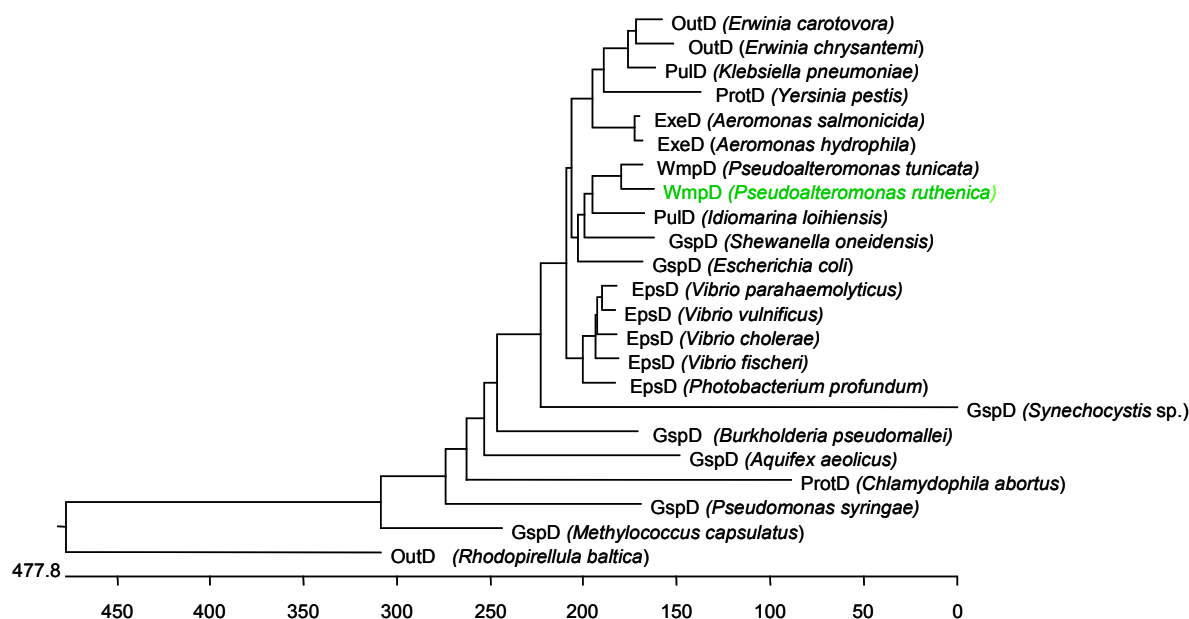


Figura 103. Árbol filogenético construido seleccionando determinadas proteínas D depositadas en las bases de datos. Incluimos la proteína WmpD de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76

IV.11.4. Construcción de mutantes *wmpD::ΩSm^R*

Con el fin de caracterizar la función biológica de esta proteína WmpD, se procedió a interrumpir el gen *wmpD* mediante un proceso de mutación por doble recombinación.

En primer lugar, se procedió a amplificar la región que corresponde al gen *wmpD*, para lo cual se diseñaron unos cebadores específicos, denominados PDF y PDR, concretamente en las posiciones 503 y 522 (PDF) y 2786 y 2867 (PDR) (Figura 99). El fragmento amplificado de 2284 pb, que incluye el gen *wmpD* de 2067 pb, se clonó en el vector pBC KS(+) en el punto *EcoRV* y a la construcción resultante se le denominó pPD.

El plásmido pPD se digirió con la enzima *HpaI* que cortaba en la posición intermedia del gen, concretamente en la posición 1155 del inserto y genera extremos romos. En este punto de restricción se introdujo el cassette ΩSm^R (2 kb) (Prentki y Krisch, 1984), que confiere resistencia a la estreptomomicina y espectinomomicina, dando lugar al plásmido pPD Ω .

Para poder recombinar esta mutación en el cromosoma de *P. ruthenica* CP76, se utilizó el vector suicida pJQ200-SK (Gm^R , Quandt y Hynes, 1993), incapaz de replicar en esta bacteria y que contiene el gen *sacB*, que confiere letalidad en presencia de sacarosa. El inserto de 4 kb se aisló por digestión con *PstI* y *XhoI*, correspondiente al MCS del pBC KS(+), y se ligó con el vector pJQ200-SK previamente digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α , seleccionándose uno de los clones. De esta forma se obtuvo el plásmido de interrupción denominado pPD Ω Q (Figura 104).

La recombinación se llevó a cabo en un solo paso, mediante conjugación triparental del plásmido pPD Ω Q con la cepa *P. ruthenica* CP76 Rf^R , utilizando pRK600 como "helper" y seleccionando los posibles dobles recombinantes en el medio SW2 RfSm adicionado de sacarosa al 10%. A continuación, se comprobó que habían perdido la resistencia a la gentamicina al sembrar en medio SW2 Gm , lo que confirmaba la ausencia del vector y sugería que se había producido la integración por doble recombinación.

Estos transconjugantes se sembraron en placas de SW7,5 caseína para detectar si poseían o no actividad proteasa, observándose que en la mayoría de las colonias no había halo de hidrólisis. En la Figura 105 se muestra uno de los mutantes *wmpD::Ω* con fenotipo proteasa negativo.

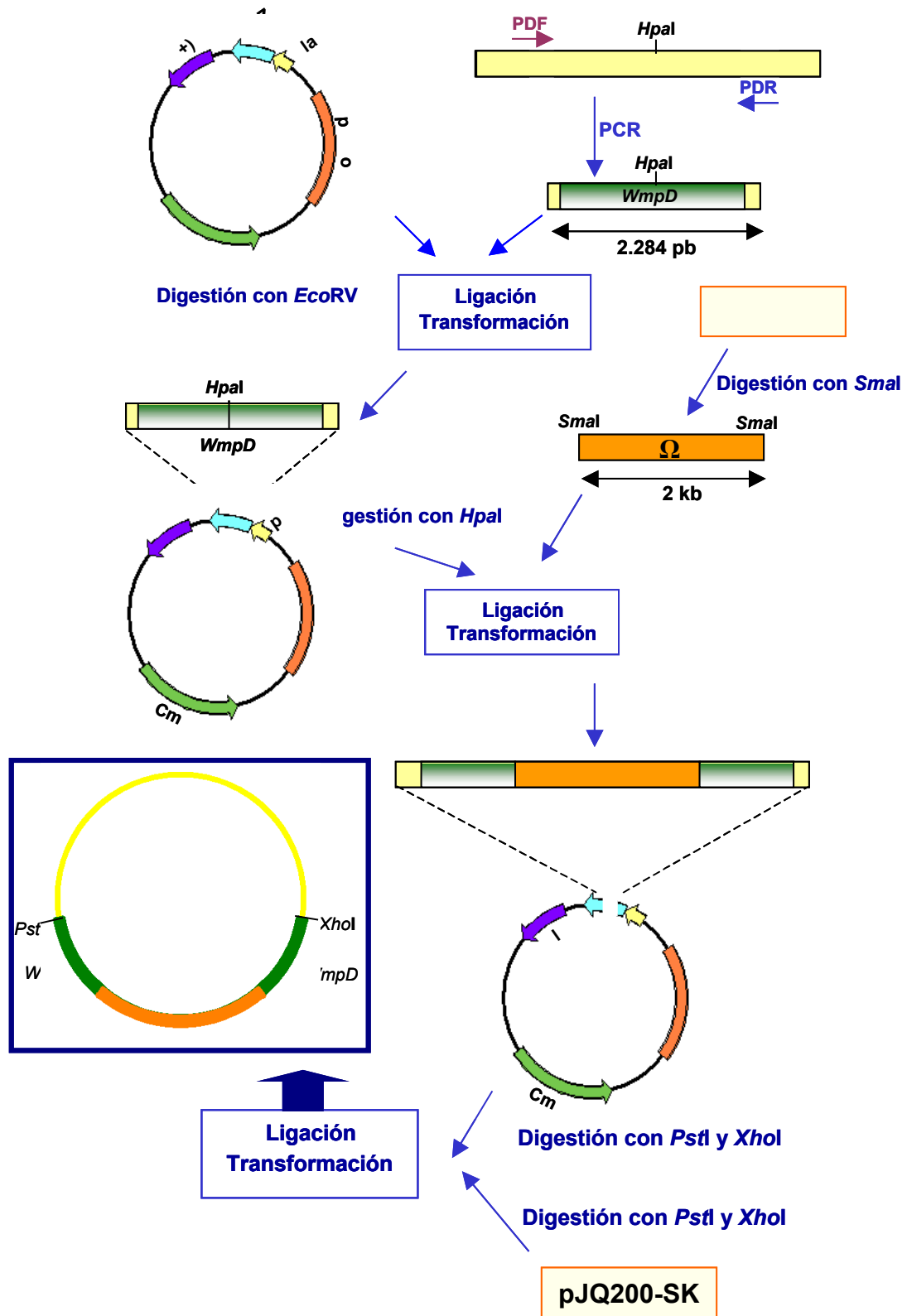


Figura 104. Estrategia seguida para la construcción de los plásmidos pDP, pDPΩ y pDPΩQ



Figura 105. Placa de SW7,5 caseína. A la izquierda se muestra *P. ruthenica* CP76 y a la derecha uno de los mutantes *wmpD::ΩSm* con fenotipo proteasa negativo

IV.11.4.1. Análisis molecular de los transconjugantes por PCR

Con el fin de comprobar la inserción correcta del cassette ΩSm en el gen *wmpD* y por tanto la interrupción del mismo, se llevó a cabo un análisis del ADN de los transconjugantes mediante la técnica de PCR, utilizando los cebadores PDF y PDR homólogos a la región secuenciada (Figura 106). La amplificación con dichos cebadores daría lugar a un producto de 2284 pb correspondiente al gen *wmpD* o a otro de 4284 si hubiese tenido lugar la sustitución de éste por el gen truncado (que corresponde a la suma del tamaño de *wmpD* y ΩSm). En la Figura 106 se muestra el fragmento del cromosoma de la cepa silvete y el esperado de la cepa interrumpida.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos, si bien, en este caso en vez de utilizar el ADN total extraído de cada posible mutante, se procedió a realizar la PCR directamente de la colonia a analizar.

El análisis mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación obtenidos con éstos cebadores mostró en todos los transconjugantes, menos en el 2 y el 9 (Figura 107) la amplificación del fragmento de 4,2 kb, indicativo de la interrupción del gen *wmpD* mediante el proceso de recombinación homóloga. Como control se utilizó el ADN total de *P. ruthenica* CP76.

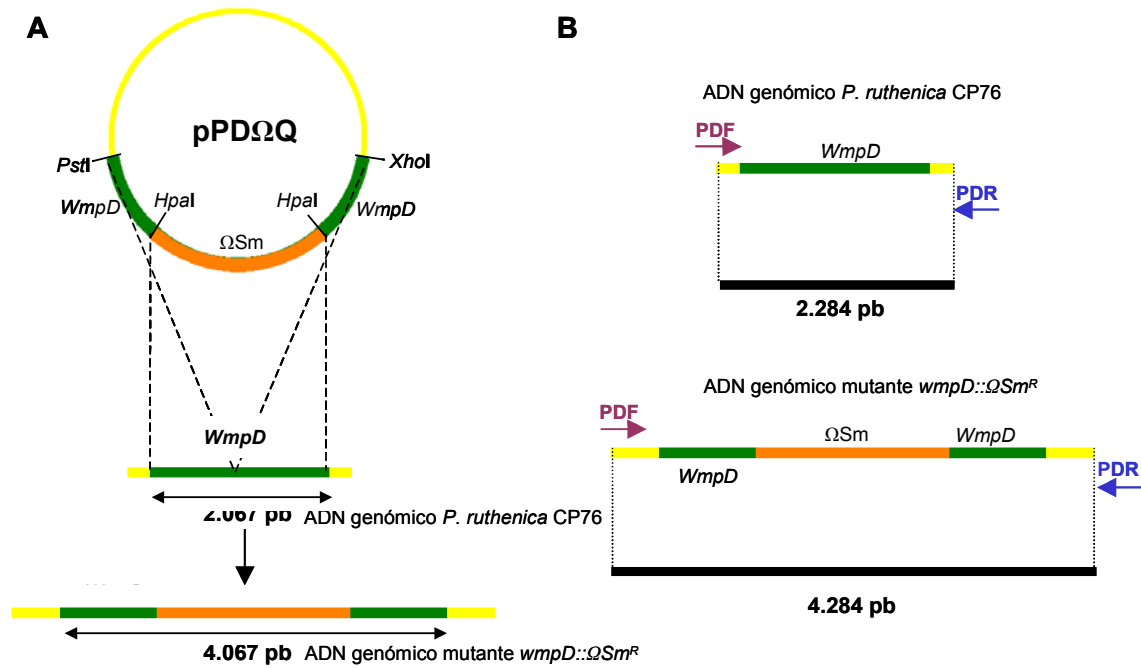


Figura 106. A. Representación esquemática de la mutagénesis por doble recombinación del plásmido pDPΩQ y el ADN genómico de *P. ruthenica* CP76; B. Productos de PCR obtenidos con los cebadores PDF y PDR a partir del ADN genómico de *P. ruthenica* CP76 y del mutante *P. ruthenica* CP77

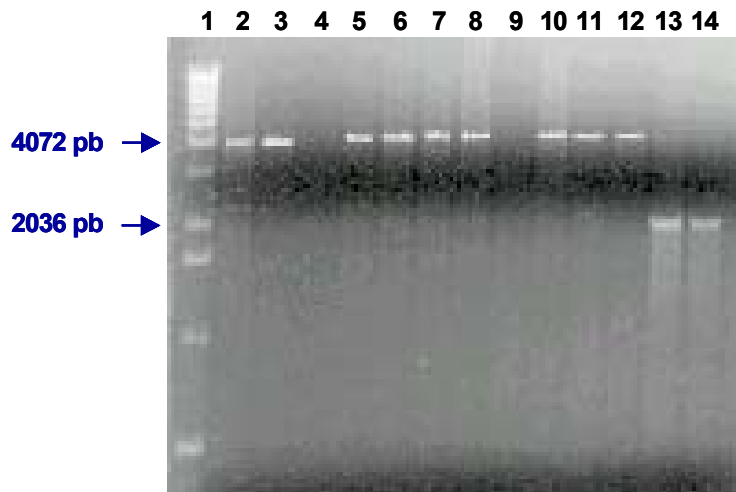


Figura 107. Electroforesis en gel de agarosa al 1% correspondiente a la comprobación de la inserción del cassette ΩSm^R en los mutantes *wmpD::\Omega\text{Sm}^R*. Se realizó una amplificación mediante PCR utilizando los cebadores PDF y PDR. 1. Marcador de pesos moleculares; 2-12. Productos de PCR de los posibles mutantes *wmpD::\Omega\text{Sm}^R*; Los carriles 13 y 14 corresponden a productos de PCR obtenidos al amplificar el ADN genómico de *P. ruthenica* CP76. En los carriles 4 y 9 no se observa amplificación, por lo que estas colonias se descartaron

IV.11.4.2. Análisis funcional del mutante *P. ruthenica* CP77 (*wmpD*:: Ω Sm)

En el apartado anterior se describe un primer análisis funcional de los mutantes en placas de SW7,5 caseína, observándose la pérdida de actividad proteasa extracelular en los mutantes *wmpD*:: Ω Sm (Figura 105). Una vez comprobada la inserción del cassette Ω Sm en el ADN genómico de *P. ruthenica* CP76, procedimos a un análisis funcional más exhaustivo. Para ello se eligió uno de los mutantes al que denominamos *P. ruthenica* CP77 y se midió la actividad proteasa en las tres fracciones celulares (medio extracelular, periplasma y citoplasma), utilizando para ello el Método de Kunitz (Kunitz, 1947). Realizamos dicho ensayo tanto en la cepa silvestre *P. ruthenica* CP76 como en el mutante. Para ello, ambas cepas se cultivaron en medio SW7,5 durante 24 horas a 37°C en agitación y procedimos a realizar el ensayo de las tres fracciones tal y como se describe en el apartado III.6 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 53 y en la Figura 108. Observamos que *P. ruthenica* CP76 presenta una elevada actividad proteasa en el sobrenadante ($\approx 96\%$), una baja actividad remanente ($\approx 6\%$) en el periplasma, debido a que la proteína no ha sido exportada al exterior en su totalidad y no se detecta actividad en el citoplasma. En cambio, el mutante *P. ruthenica* CP77 no presentó apenas actividad proteasa en el sobrenadante y si se detectó actividad, tanto en el periplasma ($\approx 34\%$) como en el citoplasma ($\approx 42\%$), lo que indica que al estar interrumpido el canal de secreción la proteína no puede ser exportada al exterior.

Tabla 53. Actividad proteasa relativa en las distintas fracciones celulares de *P. ruthenica* CP76 y de mutante *P. ruthenica* CP77

Cepa	Actividad proteasa relativa (%) ^a		
	Extracelular	Periplásmica	Citoplásmica
<i>P. ruthenica</i> CP76	96 \pm 3,5	6 \pm 2,2	5 \pm 1,1
<i>P. ruthenica</i> CP77 (mutante <i>wmpD</i> :: Ω Sm)	6 \pm 2,7	34 \pm 5,3	42 \pm 7,5

^aEl valor de 100% de actividad se le otorgó al mayor valor obtenido en el ensayo. Los datos corresponden a la media de los valores obtenidos. Los ensayos se realizaron por triplicado y se representa la desviación estándar de los mismos

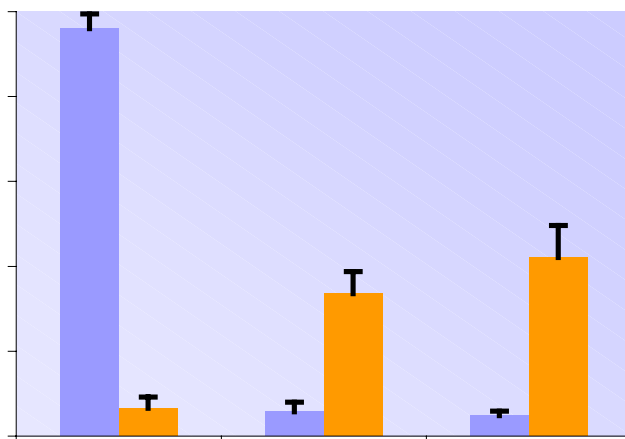


Figura 108. Actividad proteasa relativa de *P. ruthenica* CP76 y del mutante *P. ruthenica* CP77. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar de tres valores correspondientes a los ensayos realizados por triplicado

Como ya se indicó en el apartado IV.8.2., *P. ruthenica* CP76 posee otras actividades hidrolíticas extracelulares además de la proteolítica. En el medio extracelular se detecta actividad amilasa, lipasa y DNAsa. Como habíamos interrumpido la maquinaria de secreción de tipo II, cabría esperar también que dicho mutante, *P. ruthenica* CP77 no secretase al medio extracelular alguna de estas enzimas. Para ello sembramos la cepa mutante en placas de SW7,5 conteniendo los diferentes sustratos de estas enzimas (almidón, DNA y Tween 80). La lectura de estos ensayos determinó actividad enzimática en los tres casos.

V. DISCUSIÓN

En los ambientes hipersalinos, que presentan una elevada concentración de sal, pueden coexistir una gran diversidad de seres vivos. Así, aunque se han descrito organismos superiores como crustáceos, larvas de mosca o algunos eucariotas flagelados fotosintéticos, los procariotas constituyen la microbiota predominante (Rodríguez-Valera, 1993; Ventosa y col., 1998c). Las bacterias halófilas moderadas y los microorganismos halófilos extremos son los dos grupos predominantes en estos ambientes. Las primeras son más abundantes a concentraciones salinas intermedias (1,5-3 M de NaCl), mientras que los halófilos extremos predominan en ambientes con salinidades superiores a 3 M de NaCl (Rodríguez-Valera, 1985; Kushner y Kamekura, 1988).

En los últimos años, las bacterias halófilas moderadas han adquirido un gran interés desde un punto de vista biotecnológico (Ventosa y Nieto, 1995; Ventosa y col., 1998c; Mellado y Ventosa, 2003). Así, pueden producir polisacáridos, como el maurano (Arias y col., 2003), o exoenzimas tales como amilasas, nucleasas, lipasas o proteasas de enorme interés industrial (Kamekura, 1986; Ventosa y col., 2005). Por otro lado, acumulan una gran variedad de compuestos orgánicos como solutos compatibles, que actualmente se están utilizando como estabilizadores de enzimas o células completas, así como en la industria cosmética (Galinski y Tindall, 1992; Ventosa y col., 1998c; Vargas y col., 2003). Aunque las bacterias halófilas moderadas tienen un gran potencial biotecnológico, son muy pocos los estudios relativos a su capacidad de producir enzimas extracelulares y a sus posibles aplicaciones. Como fuente potencial para la producción de enzimas de interés industrial, las bacterias halófilas moderadas pueden ofrecer la ventaja de producir enzimas activas en un amplio rango de concentraciones salinas. Las enzimas extracelulares descritas hasta el momento de bacterias halófilas moderadas y haloarqueas están ampliamente descritas en la Introducción.

Con respecto a las proteasas, hasta la fecha sólo existen estudios bioquímicos de producción de estas enzimas por bacterias halófilas moderadas, no habiéndose realizado en ningún caso su caracterización a nivel molecular (Kamekura y Onishi, 1974b; Van Qua y col., 1981; Hiraga y col., 2005). Por este motivo, el objetivo fundamental de la presente Tesis ha sido la realización de un estudio tanto a nivel bioquímico como molecular de una proteasa extracelular producida por una bacteria halófila moderada.

Como hemos indicado con anterioridad, el interés de estas enzimas extracelulares radica no sólo en su importancia biotecnológica, al constituir una nueva alternativa en procesos biocatalíticos, sino también en estudios encaminados a la elucidación de los mecanismos moleculares de secreción, regulación génica o relación estructura función de proteínas en este grupo de bacterias halófilas.

I. Actividad enzimática extracelular de bacterias halófilas moderadas

Los estudios encaminados a la detección de enzimas a partir de cepas halófilas moderadas son muy escasos, quedando limitados casi exclusivamente a aquellos que se requieren para la clasificación taxonómica de las mismas (Kamekura, 1986; Ventosa y col., 2005). En nuestro Departamento, se realizó un estudio previo de estas características en el que se determinó la capacidad para producir enzimas extracelulares amilasa, proteasa y DNAsa por parte de distintas especies de los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter* y *Salinivibrio*. Dichas cepas presentaron una ligera actividad DNAsa, ninguna de ellas presentó actividad proteasa sobre el sustrato caseína y solamente *Halomonas israelensis* ATCC 43985 y *Halomonas meridiana* DSM 5425 presentaron actividad amilasa (Coronado, 1998). Por todo ello, en este trabajo se estimó interesante realizar un estudio en profundidad de enzimas extracelulares de posible interés biotecnológico producidas por distintas especies halófilas moderadas procedentes de colecciones de cultivo.

Con este propósito se seleccionó un grupo representativo de las mismas, concretamente 21 cepas Gram-positivas y Gram-negativas, pertenecientes a la colección de cultivos que posee nuestro Departamento. Entre las actividades enzimáticas, se analizó la presencia en estos microorganismos de proteasas, amilasas, DNAsas, lipasas, pululanasa y xilanasas.

Las actividades hidrolíticas ensayadas estaban ausentes en la mayoría de las cepas de colección estudiadas (Tabla 26); además, hay que señalar que en aquellas cepas en las que se observó actividad, ésta no era muy intensa.

En comparación con las bacterias halófilas moderadas Gram-negativas las Gram-positivas presentaron más actividades hidrolíticas, especialmente con respecto a la actividad DNAsa. De todas las especies ensayadas, sólo tres, *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T, *Salinivibrio costicola* DSM 8285^T y *Virgibacillus marismortui* DSM 12325^T mostraban tres actividades: DNAsa, lipasa y proteasa. La actividad pululanasa y xilanasas estaba ausente en todas las cepas ensayadas.

En general, los resultados obtenidos están de acuerdo con los correspondientes a los de los trabajos de descripción de las distintas especies, si bien algunos ensayos, como la prueba de la pululanasa o la xilanasas, no se realizan rutinariamente en estudios taxonómicos. Por otro lado, se observan algunas diferencias con los resultados descritos anteriormente; así difieren respecto a la capacidad para hidrolizar la caseína en las bacterias *C. israelensis* ATCC 43985^T, *C. canadensis* ATCC 43984^T y *C. salexigens* DSM 3043^T, así como en la actividad lipasa en *V. marismortui* DSM 12325^T y en la actividad DNAsa en *C. canadensis* ATCC 43984^T.

La producción y actividad de estas enzimas por parte de las cepas de colección ensayadas no fue lo suficientemente importante desde el punto de vista cuantitativo como

para seleccionar alguna de ellas para estudios posteriores, por lo que, decidimos realizar un screening a partir de diversos ambientes salinos para aislar bacterias halófilas moderadas capaces de secretar enzimas extracelulares con mayor actividad.

En dicho screening, realizado en distintos ambientes salinos del Sur de España, se aislaron un total de 9.848 bacterias halófilas moderadas, de las cuales 892 producían hidrolasas extracelulares, lo que representa un 9% del total de las cepas aisladas. De estas cepas productoras de hidrolasas, la actividad enzimática mayoritaria fue la amilasa ($\approx 30\%$), seguida de la actividad lipasa ($\approx 23\%$) y proteasa ($\approx 22\%$) y en menor medida la actividad pululanasa ($\approx 11\%$). La actividad xilanasas estuvo ausente en todas las cepas ensayadas (Tablas 28 y 29).

De todas las cepas aisladas en el muestreo que producían alguna hidrolasa extracelular, elegimos 125 en base al mayor halo de hidrólisis en la correspondiente placa; concretamente, se eligieron 25 cepas que mostraban cada una de las actividades hidrolíticas ensayadas. A estas 125 cepas se les realizó un estudio más detallado para determinar su posición taxonómica (Tabla 30).

La mayoría de los aislados medioambientales obtenidos capaces de producir enzimas hidrolíticas son Gram-negativos y pertenecen a los géneros *Salinivibrio* o *Halomonas*, dos de los géneros más ampliamente distribuidos en los ambientes hipersalinos (Ventosa, 1988; Ventosa y col., 1998c). Estos datos concuerdan con los descritos por Yeon y colaboradores (2005), que describen un screening para estudiar la diversidad de bacterias cultivables en salinas de Korea; de las 64 especies aisladas, 45 de ellas (70,3%) pertenecían a las α -proteobacterias, siendo la especie *Salinivibrio costicola* la más abundante. Respecto a los Gram-positivos, los géneros más representados fueron *Bacillus* y *Salibacillus*. El género *Bacillus* se caracteriza porque muchas de sus especies secretan una gran cantidad de enzimas y constituye uno de los géneros más importantes a nivel industrial (McConnell y col., 1986; Schallmey y col., 2004). Las pululanosas fueron producidas por representantes de los géneros *Salinivibrio*, *Halomonas* y *Bacillus-Salibacillus*. En la literatura hasta la fecha no hay descrita ninguna especie de los géneros *Salinivibrio*, *Halomonas* o *Salibacillus* productoras de pululanosas extracelulares, quizás porque no se han estudiado. Sin embargo, existen numerosos estudios en los que se han descrito pululanosas producidas por distintas especies del género *Bacillus* (Kashiwabara y col., 1999; Stefanova y col., 1999; Hatada y col., 2001; Roy y Gupta, 2002). También se han descrito arqueas productoras de pululanosas, pero ninguna de ellas pertenece al grupo de las haloarqueas (Rüdiger y col., 1995; Duffner y col., 2000).

Entre las enzimas que muestran actividad lipolítica, tenemos que hacer una diferenciación entre lipasas que actúan sobre ácidos grasos en emulsión de cadena larga y las esterases que hidrolizan, fundamentalmente, ácidos grasos de cadena corta en solución acuosa (Jaeger y col., 1994). En el screening utilizamos como sustrato Tween 80, el cual no

nos permite diferenciar si se trata de lipasas o de esterases y por tanto, aunque hablemos de actividad lipasa no discriminamos entre ambas actividades. Habría que realizar un ensayo enzimático específico para esterases o lipasas (Winker y Stuckmann, 1979) o inocular dichas cepas en un medio con aceite de oliva, medio selectivo de lipasas (Kouker y Jaeger, 1987).

Por otro lado, hay que destacar que no hemos detectado ninguna cepa productora de xilanasas. Posiblemente la actividad exista pero no sea lo suficientemente elevada como para producir halos apreciables en las placas de agar xilano utilizadas. La actividad xilanasas está extendida en la naturaleza y se han descrito distintas especies capaces de producir dicha enzima, como especies del género *Bacillus*, *Clostridium* o *Pseudomonas* (Lee y col., 1985; Khasin y col., 1993; Liu y col., 1999; Lama y col., 2004). También se han descrito algunas arqueas capaces de producir xilanasas (Gibbs y col., 1995; Andrade y col., 2001; Cannio y col., 2004), aunque sólo se ha descrito una haloarquea, la especie *Halorhabdus utahensis*, capaz de producir una xilanasas (Waino y Ingvorsen, 2003). Por otro lado, puede que este polímero no sea muy frecuente en los hábitats a partir de los que hemos aislado estas bacterias y por tanto, las mismas no posean la capacidad para hidrolizarlo. Estudios realizados por Lama y colaboradores (2004) han demostrado el efecto que ejerce la composición del medio de cultivo en la producción de una xilanasas por *Bacillus thermantarcticus*. Dicha enzima se produce en grandes cantidades cuando al medio se le añade xilano como sustrato, mientras que la actividad es casi nula cuando se utilizan sustratos como almidón, glucosa o maltosa.

Es interesante destacar la producción múltiple de enzimas detectada en algunas cepas. Sólo 5 cepas presentan las cinco actividades ensayadas, en cambio 38 de ellas poseen 4 actividades. Estas cepas pertenecen a los géneros *Salinivibrio* y *Halomonas* y pueden ser muy interesantes desde el punto de vista biotecnológico.

Así, el screening realizado en los ambientes hipersalinos del sur de España revela que las actividades hidrolíticas extracelulares de las cepas aisladas son mucho más intensas que las de las cepas de colección ensayadas, quizás debido a que las cepas de colección son cultivadas sistemáticamente en medios complejos que cubren las necesidades energéticas de las bacterias y no necesitan desarrollar ningún mecanismo adicional para conseguir nutrientes, al contrario de lo que ocurre en las cepas aisladas de ambientes naturales, en los que a menudo los sustratos que hay disueltos en ellos son grandes polímeros que las bacterias deben degradar en pequeñas unidades para conseguir su energía y es por ello, que necesitan producir estas enzimas extracelulares. Posiblemente, estas bacterias en principio no tendrían la capacidad de producir estas enzimas, propiedad que han podido adquirir mediante transferencia genética horizontal de otras especies que si poseían esta capacidad (Arber, 1999). La transferencia horizontal ha sido descrita en bacterias halófilas moderadas del género *Halomonas*, concretamente en *H. variabilis*. Esta cepa y otras

relacionadas fueron aisladas de ambientes como la Antártida, aguas hidrotermales o profundidades del mar. De ellas, 10 se seleccionaron para un estudio filogenético en base a la secuenciación del ARNr 16S, los genes de síntesis de ectoína *ectB* y *ectC* y el gen *gyrB* que codifica la ADN girasa. La relación filogenética de *H. variabilis* y los microorganismos relacionados fue muy similar en cuanto al ARNr 16S, *ectB* y *gyrB*. No fue así con respecto al gen *ectC* por lo que se determinó que este gen podría haber sido adquirido mediante transferencia horizontal (Okamoto y col., 2004).

II. Caracterización de la haloproteasa CP1

Llegados a este punto, decidimos centrar nuestro estudio en una de las actividades extracelulares, la actividad proteasa. En nuestro laboratorio ya se había estudiado con anterioridad una amilasa extracelular producida por una bacteria halófila moderada, *Halomonas meridiana* (Coronado, 1998) y se está realizando una Tesis Doctoral sobre la caracterización de una lipasa producida por otra bacteria halófila moderada, *Marinobacter lipolyticus*, por lo que la elección de las proteasas se encuentra dentro de nuestra línea de trabajo sobre enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas.

La selección de la cepa productora de la proteasa extracelular a estudiar en profundidad se hizo, en principio, en base a las cepas que producían un mayor halo de hidrólisis en placas de agar caseína. Está descrito que no existe necesariamente una correlación entre el tamaño del halo de hidrólisis y la actividad proteolítica (Coolbear y col., 1991), por lo que es necesario realizar un ensayo enzimático para cuantificar dicha actividad. En principio utilizamos el ensayo del Hide Powder Azure (Riderknecht y col., 1968), pero a raíz de los trabajos realizados en la Universidad de Hamburgo utilizamos el Método de Kunitz (Kunitz, 1947). Ambos métodos son equiparables, si bien el primero es más laborioso de realizar. En base a los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos seleccionamos la cepa CP76 como la mejor candidata para realizar estudios relativos a la producción y secreción de una enzima proteasa al medio extracelular (Tabla 31). Las actividades extracelulares amilasa, lipasa y DNAsa también están presentes en la cepa CP76, por lo que se trata de una cepa que posee un gran potencial biotecnológico.

II.1. Caracterización taxonómica de la cepa CP76

Con el fin de determinar la posición filogenética de la cepa CP76, se procedió a la amplificación y secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S de la misma. Después de realizar el correspondiente análisis comparativo de la secuencia del ARNr 16S de la cepa CP76 con las otras secuencias disponibles en las bases de datos, se observó que existe una alta semejanza entre la cepa CP76 y especies del género *Pseudoalteromonas*.

Las especies del género *Pseudoalteromonas* pertenecían anteriormente al género *Alteromonas* y en el año 1995 fueron reclasificadas por Gauthier y colaboradores, en este

nuevo género. De esta manera, el género *Alteromonas* incluía una única especie en base a la comparación de secuencias del ARNr 16S, *Alteromonas macleodii*; actualmente este género consta de 8 especies. La descripción fenotípica del género *Pseudoalteromonas* es muy similar a la descrita en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Baumann y col., 1984b) para el género *Alteromonas*. Las especies del género *Pseudoalteromonas* pertenecen al grupo de las α -proteobacterias (Stackebrandt y col., 1988) y están descritas como bacterias marinas o halófilas moderadas.

Las especies del género *Pseudoalteromonas* poseen un gran potencial biotecnológico ya que son productoras de numerosos compuestos de interés industrial. Así, se han descrito especies que sintetizan restrictasas (Dedkov y col., 1990), nucleosido-quinasas (Terent'ev y col., 1998), fosfolipasas y lipofosfolipasas (Cadman y Eichberg, 1983), amilasas (Gavrilovic y col., 1982; Aghajari y col., 1998), quitinasas (Ivanova y Mikhailov, 1992; Ivanova y col., 1992b), agarasas (Yaphe, 1957; Akagawa-Matsushita y col., 1992), α y β -galactosidasas (Bakunina y col., 1996; Hoyoux y col., 2001), carragenasas (Akagawa-Matsushita y col., 1992), fukoidanasas (Bakunina y col., 2000), laminaranasas (Sova y col., 1994), fosfatasa alcalinas (Fedosov y col., 1991; Ivanova y col., 1991) y otros compuestos. *Pseudoalteromonas peptidolytica* produce una proteasa extracelular, aunque ésta no ha sido caracterizada hasta la fecha (Venkateswaran y Dohmoto, 2000).

Todas las especies del género *Pseudoalteromonas* son bacilos Gram-negativos, rectos o ligeramente curvados de un tamaño de 0,2-1,5 x 1,8-3,0 μ m, generalmente producen pigmentos, no forman endosporas y la mayoría de las especies son móviles mediante un flagelo polar. Son aerobios estrictos, quimioorganotrofos con metabolismo respiratorio. La prueba de la oxidasa es positiva, la prueba de la catalasa suele ser débil y variable. Todas las especies crecen a 20°C y sólo una especie, *P. denitrificans*, es capaz de realizar desnitrificación. Ninguna de las especies posee el sistema de la arginina dihidrolasa constitutivamente. Estas especies no acumulan poly- β -hidroxibutirato. Todas requieren agua de mar como base para su crecimiento. El contenido en G+C oscila entre 37 y 50 moles%. La especie tipo del género es *P. haloplanktis* (Baumann y col., 1972).

Las primeras especies que se incluyeron en este género fueron *P. atlantica* (Akagawa-Matsushita y col., 1992), *P. aurantia* (Gauthier y Breittmayer, 1979), *P. carrageenovora* (Akagawa-Matsushita y col., 1992), *P. citrea* (Gauthier, 1977), *P. denitrificans* (Enger y col., 1987), *P. espejiana* (Chan y col., 1978), *P. luteoviolacea* (Gauthier, 1982), *P. nigrificans* (Baumann y col., 1984a), *P. piscicida* (Bein, 1954), *P. rubra* (Gauthier, 1976) y *P. undina* (Chan y col., 1978). Actualmente el género consta de 32 especies, la última descrita es *P. spongiae* (Lau y col., 2005).

La Figura 62 y la Tabla 37 corresponden al árbol filogenético y a la matriz de semejanza en la que se comparan, en base a la secuencia del ARNr 16S, la cepa CP76 y las especies del género *Pseudoalteromonas* más relacionadas. La mayor semejanza (99,6%) se obtuvo

con la especie *Pseudoalteromonas ruthenica*, una bacteria marina aislada de un molusco (Ivanova y col., 2002b). Con el resto de las especies del género, la cepa CP76 presentaba un porcentaje de semejanza inferior al 96%.

La cepa CP76 presenta colonias pequeñas de 0,5-1,0 mm de diámetro, de borde liso, consistencia cremosa y anaranjadas. Es un bacilo Gram-negativo, aerobio estricto, móvil y que presenta un tamaño de 0,3-0,5 x 1,0-4,0 μm , características que coinciden con las descritas para *P. ruthenica*, aunque las colonias de la cepa CP76 son más anaranjadas que las de la cepa tipo de *P. ruthenica* (Figuras 63 y 64).

Aunque la cepa CP76 y *P. ruthenica* poseen una elevada semejanza, algunas pruebas fenotípicas difieren entre ellas, como el rango salino de crecimiento; la cepa CP76 crece en medios tanto desprovistos de sal como con un 17,5% de sales, con un crecimiento óptimo entre 7,5-10%; *P. ruthenica* solamente crece entre 1-9% de sal, con un óptimo alrededor del 1-3%. Con respecto a la temperatura de crecimiento, la cepa CP76 es capaz de crecer en un rango de temperaturas comprendido entre 15-40°C, con un óptimo entre 28-37°C y de acuerdo a la descripción original, *P. ruthenica* crece en un rango de temperaturas entre 10 y 35°C, con un óptimo entre 25 y 30°C (Tabla 38). Con respecto a las características bioquímicas, la cepa CP76 es capaz de producir ácidos a partir de la maltosa y *P. ruthenica* sólo produce ácidos a partir de la glucosa (Tabla 39). En relación a las pruebas nutricionales, *P. ruthenica* es capaz de asimilar la D-glucosa, la celobiosa y la sacarosa y la cepa CP76 es negativa con respecto a la utilización de estos tres sustratos (Tabla 40).

En cuanto a la caracterización quimiotaxonómica, se ha determinado la composición de ácidos grasos con el fin de comparar el perfil de la cepa CP76 y las especies filogenéticamente relacionadas, *P. ruthenica* LMG 19699^T, *P. luteoviolacea* NCIMB 1893^T y *P. haloplanktis* subsp. *haloplanktis* NCIMB 1893^T. En general, los resultados se corresponden con los descritos para el género, aunque se observan algunas diferencias entre las cepas estudiadas (Ivanova y col., 2000). Por regla general, los ácidos grasos mayoritarios fueron los mismos en las cuatro cepas, con la excepción del ácido graso C_{14:0}, que fue más abundante en la cepa CP76 y en *P. ruthenica* y menos en *P. haloplanktis* y *P. luteoviolacea* y el ácido graso C_{17:1} ω 3, que fue mayoritario en *P. haloplanktis* y *P. luteoviolacea*. Comparando los resultados de la cepa CP76 y *P. ruthenica*, observamos que el ácido graso mayoritario en ambas cepas fue el C_{16:0}. También hemos comparado los resultados de la composición de los ácidos grasos de nuestro estudio con los descritos en las caracterización de estas especies encontrándose algunas discrepancias; esto puede ser debido a que la composición de los ácidos grasos varía en función de las condiciones de cultivo, tales como el medio de cultivo, la temperatura, o el pH del medio y para poder comparar los resultados deben realizarse todas las determinaciones en las mismas condiciones; por eso nos referimos solamente a nuestros datos. *P. ruthenica* presentó un

mayor contenido en C_{14:0} y C_{15:0} que la cepa CP76 y por otra parte, esta cepa presentó un mayor contenido en C_{17:1} ω8c y C_{18:1} ω7c que *P. ruthenica* (Tabla 42).

Por último, la caracterización genotípica demostró inequívocamente que la cepa CP76 presenta una estrecha relación con *P. ruthenica*. El contenido en G+C de la cepa CP76 es 49,7 moles%, mientras que el de *P. ruthenica* oscila entre 48,4-48,9 moles% (Ivanova y col., 2002b). Al realizar estudios de hibridación ADN-ADN, demostramos que la cepa CP76 presentó una homología del 100% con la cepa tipo de *P. ruthenica* (Tabla 41).

Estos resultados determinaron que la cepa CP76 pertenece a la especie *Pseudoalteromonas ruthenica*. De acuerdo a la clasificación de Kushner y Kamekura (1988), esta cepa se clasifica como una bacteria halófila moderada.

II.2. Optimización de las condiciones de cultivo de *P. ruthenica* CP76 para la máxima producción enzimática

Se procedió a determinar las condiciones óptimas de crecimiento de *P. ruthenica* CP76 para detectar la máxima actividad enzimática. Entre todos los parámetros ensayados, la concentración salina del medio de cultivo ha resultado ser uno de los factores más importantes. *P. ruthenica* CP76 crece en un rango salino amplio, tanto en medios desprovistos de sal como al 17,5% de sales totales con un óptimo entre 7,5-10% (Figura 52). Así, la actividad proteasa detectada cuando se cultivó *P. ruthenica* CP76 en un medio al 7,5-10% de sales totales (SW7,5-SW10) es un 20% superior a la observada en un medio con una concentración salina del 3% (SW3) y un 40% superior a la de un medio con una concentración salina del 15% (SW15), a pesar de que en ambos medios se observa un buen crecimiento de la cepa (Figura 53). Este resultado está de acuerdo con los estudios realizados por Kamekura y Onishi (1974b) sobre la producción de una proteasa extracelular por la cepa halófila moderada *Bacillus* sp. no. 21-1. En esta cepa se observa una correlación entre la concentración de NaCl óptima para el crecimiento de la cepa y la máxima producción de la enzima (1-2 M de NaCl), determinándose que a 3 y 4 M de NaCl la cepa crece lentamente y la producción de enzima disminuye, siendo nula a 4 M de NaCl. Es importante destacar que no se trata de un hecho exclusivo de las proteasas ya que también se observa en el caso de otras enzimas producidas por este grupo de bacterias halófilas; así la actividad amilasa detectada cuando se cultiva *Halomonas meridiana* en un medio con 5% de sales (concentración salina óptima para su crecimiento) es cinco veces superior a la observada en un medio con una concentración salina del 2% (Coronado y col., 2000a). La producción de nucleasa por la bacteria halófila moderada *Bacillus halophilus* también está influenciada por la composición de sales del medio de cultivo. Esta cepa crece óptimamente en medios con 2 M de NaCl y la máxima producción de enzima se produce en medios con 1-2 M de NaCl (Onishi y col., 1983). Estos resultados pueden ser fácilmente justificables al tratarse de enzimas sintetizadas por especies halófilas moderadas que presentan un óptimo de crecimiento a salinidades del orden del 3-15%; así, no es de

extrañar que sea bajo estas condiciones óptimas de crecimiento para la bacteria cuando se observan los mayores niveles de producción enzimática.

En segundo lugar, se ha determinado que para obtener una óptima producción de proteasa se requieren cultivos de *P. ruthenica* CP76 en fase exponencial tardía o estacionaria de crecimiento. Este resultado parece lógico si se considera que los niveles máximos de producción de enzimas y otros compuestos extracelulares se obtienen en las fases tardías de crecimiento exponencial, al no ser esenciales para los procesos de división y desarrollo celular. Son numerosos los casos en los que los microorganismos producen sus enzimas extracelulares en fases exponenciales tardías de crecimiento. Como ejemplo citamos diversas proteasas producidas por especies de los géneros bacterianos *Flavobacterium* (Morita y col., 1998), *Yersinia* (Secades y Guijarro, 1999), *Alcaligenes* (Thangam y Rajkumar, 2000), *Serratia* (Romero y col., 2001), *Alteromonas* (Miyamoto y col., 2002), o *Bacillus* (Gupta y col., 2002; Denizci y col., 2004), así como por las haloarqueas *Halobacterium* (Ruy y col., 1994), *Natrialba* (Giménez y col., 2000) o *Natronococcus* (Studdert y col., 2001).

La producción de la proteasa fue óptima en medio SW7,5 suplementado con sacarosa, fructosa o glicerol. Asimismo, la actividad proteasa se vio inhibida cuando al medio se le adicionó maltosa (Tabla 32). La represión catabólica por carbohidratos en la síntesis de enzimas extracelulares es un hecho bastante habitual en los procesos de síntesis enzimática. Se ha descrito represión catabólica por carbohidratos en la producción de enzimas en diversos microorganismos; algunos ejemplos lo constituyen la serina proteasa producida por *V. alginolyticus*, cuya producción se inhibe por la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Long y col., 1981) o las proteasas producidas por *V. parahaemolyticus* (Tanaka y Iuchi, 1971) o *Pseudomonas maltophilia*, esta última produce la enzima cuando no se encuentra malato, succinato o α -ketoglutarato en el medio de cultivo (Boethling, 1975). Esto sugiere que en ausencia de azúcares las proteasas juegan un papel importante en el suministro de péptidos o aminoácidos como fuente de energía, además de constituir una fuente de nitrógeno. Sin embargo en presencia de azúcares, fuente de carbono y energía fácilmente asimilable por las bacterias, la producción de proteasas no es tan necesaria. Este tipo de regulación también se ha descrito para proteasas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Whooley y col., 1983) o *Vibrio* sp. SA1 (Wiersma y col., 1978), si bien, el aumento de la actividad proteolítica por la presencia de determinados carbohidratos no es un comportamiento habitual (Secades y Guijarro, 1999; Coronado y col., 2000a). Sin embargo, es importante destacar que el estudio del efecto de los hidratos de carbono en la producción de una enzima extracelular no refleja la situación real *in vivo* en la cual aminoácidos, lípidos, péptidos y otras proteínas constituyen la fuente de carbono y energía más probable (Secades y Guijarro, 1999).

La presencia de casaminoácidos en el medio de cultivo tiene una influencia positiva en el crecimiento del microorganismo, pero actúa negativamente en la producción de la proteasa, aunque esta inhibición es menos acentuada que la producida por la maltosa. Un comportamiento similar, aunque más marcado, se ha descrito en otras enzimas proteolíticas producidas por microorganismos patógenos de peces (Secades y Guijarro, 1999) o por *Bacillus subtilis* (May y Elliott, 1968). Este comportamiento puede deberse al hecho de que al tener disponible productos aminoacídicos en el medio de cultivo, la bacteria no tiene la necesidad de producir proteasas para generarlos a partir de péptidos mayores y son estos péptidos intactos los que inducen la producción de la proteasa.

La adición de sales amónicas al medio de cultivo también inhibe la actividad enzimática. En otras proteasas de diferentes microorganismos, como *Aeromonas hydrophila* (O'Reilly y Day, 1983), *Aeromonas salmonicida* (Liu y Hsieh, 1969) o *Yersinia ruckeri* (Secades y Guijarro, 1999) se ha descrito una represión por amonio.

Por todo lo expuesto anteriormente, señalaremos que, para obtener una óptima producción enzimática de la proteasa objeto de nuestro estudio se requieren cultivos de *P. ruthenica* CP76 en fase exponencial tardía de crecimiento (cultivos de, al menos, 12 horas), cultivados en condiciones de elevada oxigenación, a una temperatura de 37°C, en medios con un 7,5 % de sales totales (SW7,5), en presencia de sacarosa y en ausencia de maltosa.

II.3. Purificación y caracterización bioquímica de la haloproteasa CP1

Con el objeto de determinar los valores óptimos de temperatura, pH y condiciones de salinidad del enzima se procedió al estudio del sobrenadante del cultivo bacteriano. El sobrenadante presenta actividad proteolítica en un amplio rango de temperaturas, presentando su óptimo de actividad a 65°C. De la misma manera presenta actividad en un amplio rango de valores de pH (3-10) siendo el valor de pH óptimo 9. En cuanto a la actividad a distintas salinidades, se observó que el valor máximo para la actividad proteasa, al igual que para el crecimiento óptimo de *P. ruthenica* CP76, se producía a una concentración de 7,5% de sales totales.

Al realizar la caracterización proteolítica del sobrenadante no conocíamos si la actividad detectada correspondía a una sola enzima o a más de una. Una vez secuenciado el gen que codifica la haloproteasa CP1 y comprobar que corriente abajo del mismo se encuentra la secuencia de otra proteasa, *cp2*, pensamos que estos resultados podrían corresponder a más de una actividad proteolítica.

Durante la purificación de la haloproteasa CP1 producida por *P. ruthenica* CP76 el sobrenadante libre de células se dializó para eliminar los restos de sales que podrían interferir en la purificación del enzima. Diversos estudios previos han descrito la dificultad en la purificación de enzimas halófilas al interferir las sales en los procesos de purificación (Norberg y Hofsten, 1969; Izotova y col., 1983). La primera columna que utilizamos para la

purificación fue de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow. Debemos indicar que en este primer paso de purificación, al realizar el ensayo enzimático a la primera fracción que se obtiene de la columna antes de comenzar la elución, se detectó actividad proteolítica, que inicialmente justificamos como proteasa que no se habría unido a la misma, sin embargo; posteriormente, una vez comprobado que *P. ruthenica* CP76 produce, al menos, dos proteasas, esta actividad podría corresponder a la proteasa CP2. Como segundo y último paso de purificación de la haloproteasa CP1 se utilizó la columna de filtración en gel Superdex S-200 (Tabla 33).

El rendimiento obtenido en la purificación (2,9%) es bajo si lo comparamos con el rendimiento obtenido en la purificación de otras proteasas halófilas (Izotova y col., 1983; Yu y col., 1991; Stepanov y col., 1992), aunque la proteasa recientemente purificada a partir de la bacteria halófila moderada *Filobacillus* sp. RF2-5 ha sido purificada con un rendimiento igualmente bajo (5%) (Hidaga y col., 2005).

Los datos obtenidos mediante electroforesis en gel SDS-PAGE, el correspondiente zimograma y el gel nativo nos indicaron que se trataba de una proteína monomérica con un peso molecular de 38 kDa (Figuras 55, 56 y 57). Este peso molecular es similar al determinado para otras proteasas halófilas (Izotova y col., 1983; Kamekura y col., 1992; Stepanov y col., 1992; Giménez y col., 2000). Dicho peso molecular es, asimismo, similar al de la proteasa extracelular de la bacteria marina *Pseudoalteromonas* sp. A28 (Lee y col., 2002). Se trata de una enzima que presenta una actividad óptima a una temperatura de 55°C (10°C menos que la temperatura óptima del sobrenadante del cultivo bacteriano de la cepa *P. ruthenica* CP76), por lo que se trata de una proteasa moderadamente termoactiva. Esta temperatura es similar a la descrita para la proteasa producida por *Filobacillus* sp. RF2-5 (Hiraga y col., 2005); también es muy parecida a la temperatura óptima de las proteasas producidas por *Natronobacterium* sp. (Yu, 1991), *Natronococcus occultus* (Studdert y col., 2001) y *Natrialba magadii* (Giménez y col., 2000). El enzima es capaz de retener un 78% y un 30% de actividad a 65°C y 70°C, respectivamente. Con respecto a la termoestabilidad, la haloproteasa CP1 conserva un 60% de actividad después de 60 minutos a 50°C. Hay que decir que a su temperatura óptima de actividad, 55°C, la haloproteasa no resultó muy termoestable, perdiéndose completamente la actividad a las 3 horas de incubación (Figura 58.A).

En cuanto al pH óptimo de actividad, este fue de 8,5, aunque la haloproteasa CP1 presenta actividad en un amplio rango de valores de pH (entre pH 5,5 y 10), destacando que el enzima retenía más de un 50% de su actividad a pH 9 y un 30% a pH 10 (Figura 58.B). Esta enzima puede ser considerada interesante en procesos industriales que se lleven a cabo en condiciones de alcalinidad, condiciones que pueden ser debidas, por ejemplo, a la dureza del agua empleada en estos procesos. Otra aplicación muy interesante de las proteasas alcalinas es en el procesado del cuero y en el tratamiento de los residuos

generados por el revelado de películas fotográficas (Kumar y Takagi, 1999; Gupta y col., 2002).

Finalmente, el comportamiento de la haloproteasa CP1 a diferentes concentraciones salinas resulta muy interesante, al tratarse de un enzima que presenta actividad a salinidades muy elevadas, del orden de 4 M de NaCl, mostrando un óptimo entre 0 y 1 M de NaCl (Figura 58.C). La capacidad de esta enzima de ser activa en tan amplio rango de salinidad la hace muy interesante desde el punto de vista de su futura aplicación industrial. También se han realizado estudios de estabilidad de dicho enzima cuando se incubaba durante 24 horas, a 4°C en presencia de distintas concentraciones de NaCl. La haloproteasa CP1 presenta su máxima actividad entre 0 y 2 M de NaCl, conservando hasta un 60% de actividad a 4 M de NaCl, así, se trata de una enzima que presenta una alta estabilidad tanto en ausencia como en presencia de NaCl (Figura 59). Se trata de una enzima muy versátil; debemos tener en cuenta que las proteasas producidas por microorganismos halófilos extremos son activas a altas concentraciones de NaCl pero su actividad decae drásticamente a concentraciones más bajas (Adam y Kelly, 1995). Así, las proteasas producidas por *Halobacterium salinarum* (Izotova y col., 1983; Ryu y col., 1994), *Natronobacterium* sp. (Yu, 1991) o *Natrialba asiatica* (Kamekura y Seno, 1990; Kamekura y col., 1992) pierden su actividad irreversiblemente en ausencia de NaCl. No son muchas las enzimas capaces de actuar óptimamente tanto en ausencia como en presencia de determinadas concentraciones de NaCl, lo que le aporta una gran ventaja respecto a las enzimas producidas por haloarqueas. Otro ejemplo de una enzima que es activa en presencia y ausencia de NaCl, es la amilasa producida por *H. meridiana* (Coronado y col., 2000a), que conserva hasta un 80% de su actividad en ausencia de NaCl.

Estos resultados de comportamiento de la haloproteasa CP1 con respecto a la salinidad no han podido ser comparados, sin embargo, con proteasas producidas por especies bacterianas no halófilas, al tratarse de un parámetro que, generalmente, no suele determinarse de manera rutinaria. Las proteasas que suelen ser activas sin NaCl no son capaces de soportar elevadas concentraciones de NaCl, como es el caso de la proteasa producida por *Vibrio* sp. cepa 60, la cual presenta su actividad óptima sin sal y excepcionalmente es capaz de mantener actividad hasta concentraciones de 0,5 M de NaCl (Kim, 2004). Estas proteasas activas a elevadas concentraciones salinas podrían ser útiles para el tratamiento de aguas salinas que contienen residuos proteicos, en mecanismos de control de la polución y como aditivos de detergentes activos en aguas de elevada dureza (Kumar y Tanaki, 1999; Gupta y col., 2002).

También se ha estudiado el efecto de distintos agentes desnaturalizantes y reductores sobre la haloproteasa CP1 (Tabla 36). La actividad proteasa se vio inhibida por SDS, urea y guanidina HCl, lo que indica que los puentes de hidrógeno son importantes para mantener la conformación activa del enzima, aunque se observó un ligero aumento de la actividad

con 0,8 M de urea, si bien la misma disminuía al aumentar la concentración hasta 1,6 M. En proteasas producidas por microorganismos hipertermófilos se ha observado un comportamiento similar (Cowan y col., 1987; Chavez Croocker y col., 1999). La inhibición producida por ditioneitol y 2-mercaptoetanol sugiere que los puentes disulfuro también son necesarios para mantener la actividad enzimática. En la proteasa producida por la haloarquea *Natrialba magadii* se ha descrito un aumento de la actividad al adicionar agentes tiol reductores; este mismo comportamiento se ha descrito también en algunas metalo y serina proteasas denominadas tiol-dependientes (Wolz, 1999; Giménez y col., 2000).

Son numerosos los procesos industriales en los que la concentración salina varía a lo largo del tiempo; así, en el procesado del cuero se generan aguas residuales alcalinas y con elevadas concentraciones de sales; de la misma manera, en el alpechín (residuo resultante en el proceso de obtención de aceite de oliva) también existe una concentración salina variable. Además, es bien conocido el uso de proteasas en los detergentes. La posibilidad de utilizar proteasas que son activas a diferentes concentraciones salinas haría más efectivo el uso de aguas salinas, incluso de agua de mar (Rao y col., 1998). En resumen, podemos indicar que la haloproteasa CP1 presenta unas características muy interesantes, ya que es capaz de actuar en un amplio rango de valores de pH y temperatura, aunque su principal característica es que es capaz de actuar tanto en ausencia como en presencia de sal. Por ello, el proceso de producción de la enzima se ha patentado (Sánchez-Porro y col., 2003d) y en principio, sería una buena candidata para su uso industrial, si bien se podría manipular a nivel molecular para mejorar sus propiedades.

II.4. Clonación de los genes *cp1* y *cp2*

Una vez que teníamos la haloproteasa CP1 purificada y caracterizada bioquímicamente realizamos su estudio molecular. Para ello, en primer lugar trabajamos en la construcción de una genoteca representativa de *P. ruthenica* CP76, con el fin de obtener el gen que codifica dicha proteasa. Así, con el objetivo de obtener un fragmento de dicho gen que nos sirviera como sonda para rastrear la genoteca, realizamos un análisis (BLAST) con la secuencia de aminoácidos derivada del extremo N-terminal de la haloproteasa CP1 y seleccionamos las proteínas que mostraban una mayor similitud (Tabla 43), realizamos el correspondiente alineamiento y a partir de las regiones más conservadas y teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de CP1 se diseñaron unos cebadores degenerados (Figura 65) que nos sirvieron para amplificar una región de 503 pb, que correspondía a una región conservada de la secuencia del gen que codifica la proteasa CP1. Ante la imposibilidad de obtener dicha genoteca decidimos abordar la obtención del gen mediante la técnica de PCR inversa. Para ello utilizamos como base la región amplificada de la proteasa CP1 que habíamos obtenido anteriormente.

Así, mediante la técnica de PCR inversa se ha obtenido un fragmento de 6.223 pb del ADN genómico de *P. ruthenica* CP76 (Figura 75). Este fragmento presenta 3 marcos abiertos de lectura. El primer ORF codifica una proteína de 733 aminoácidos que corresponde a la haloproteasa CP1, el segundo ORF codifica una proteína de 614 aminoácidos y corresponde a una segunda proteasa CP2 y un tercer ORF incompleto que codifica la parte N-terminal (296 aminoácidos) de una esterasa, a la que hemos denominado LipP.

La haloproteasa CP1 está compuesta por 733 aminoácidos. La secuencia presenta una elevada similitud con proteasas descritas en otras bacterias Gram-negativas como *Pseudoalteromonas* (80%), *Alteromonas* (78%), *Aeromonas* (68%), *Vibrio* (66%), *Listonella* (62%) o *Pseudomonas* (68%) (Bever y Iglewski, 1988; Cheng y col., 1996; Nirasawa y col., 1999; Jeong y col., 2000; Kawakami y col., 2000; Lee y col., 2002; Miyamoto y col., 2002; Song y col., 2004; Watanabe y col. 2004) (Tabla 45). En este sentido, debemos indicar que al realizar la comparación de la secuencia con las disponibles en la base de datos CDD (Conserved Domain Database) (Marchler-Bauer y Bryant, 2004), se comprobó la presencia de cuatro dominios conservados (Figura 78). La haloproteasa CP1 se sintetiza como una pre-proproteína con un péptido señal, seguida de una región pro-N-terminal, la secuencia de la proteína madura y otra región pro-C-terminal. Esta misma estructura de dominios conservados la presentan otras proteasas, entre ellas, las que muestran mayor similitud con la haloproteasa CP1 son la metaloproteasa Empl, producida por *Pseudoalteromonas* sp. cepa A28 y la metaloproteasa Mprl, producida por *Alteromonas* sp. O-7 (Lee y col., 2002; Miyamoto y col., 2002). Otras proteínas que muestran esta misma estructura de cuatro dominios conservados son las dos serina proteasas producida por *Alteromonas* sp. O-7 (Tsujiyama y col., 1993; 1996) o la aminoproteasa producida por *Vibrio proteolyticus* (Van Heeke y col., 1992).

La haloproteasa CP1 posee un péptido señal de 28 aminoácidos, de acuerdo con la predicción del programa Signal P (Bendtsen y col., 2004) (Figura 80.A). Se trata de un péptido señal típico, que presenta una región n rica en residuos cargados positivamente, una región h hidrofóbica y una región c hidrofílica que contiene el motivo en el que corta la peptidasa, concretamente en la Ala²⁸ (von Heijne, 1983; Watson, 1984). El tamaño de este péptido señal es parecido a los descritos para otras proteasas, presentando un perfil de hidrofobicidad muy parecido al de OmpA (Braun y Cole, 1984). El péptido señal es reconocido eficientemente por el sistema de transporte de la proteína, ya que apenas encontramos actividad proteasa en el periplasma a las 24 horas de incubación de *P. ruthenica* CP76 en las condiciones óptimas para la máxima producción proteolítica.

A continuación del péptido señal, se encuentra una región de 183 aminoácidos, que corresponde al dominio pro-N-terminal, presentando una similitud de un 60%, 58% y 54% con los dominios pro-N-terminales de las proteasas producidas por *Pseudoalteromonas* sp.

A28, *Alteromonas* sp. O-7 y *Vibrio vulnificus*, respectivamente (Tabla 47). Este dominio también está presente en numerosas proteínas extracelulares, como es el caso de las proteasas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* LasB, *Aeromonas caviae* apAC, *Legionella pneumophila* PEP1 o *Bacillus amyloliquefaciens* Apr y Npr (Schad y col., 1987; Nirasawa y col., 1999a; Black y col., 1990; Vasantha y col., 1984).

Muchas proteínas extracelulares se sintetizan como proteínas inactivas o zimógenos (Wadersman, 1989; Braun y tomasen, 1998). Estas proteínas inmaduras presentan a menudo en su extremo N y/o C-terminal secuencias peptídicas denominadas propéptidos. Estos propéptidos pueden ejercer la función de ayudar al correcto plegamiento del enzima, actuando como una chaperona intramolecular (Inouye, 1991; Shide y Inouye, 1993; Mclver y col., 1995). Al contrario de las chaperonas moleculares que requieren energía para ser activas y son capaces de actuar sobre múltiples sustratos, estas regiones propeptídicas no requieren energía para su actuación y son altamente específicas (Inouye, 1991; Shice y Inouye, 1993). También se ha descrito que estos propéptidos previenen que la proteasa presente actividad en el interior de la célula y provoque daños a proteínas celulares (Nakahama y col., 1986). Además, diversos autores han establecido que en algunas proteínas extracelulares los prodominios juegan el papel de proteger el sitio activo de la enzima y posteriormente son eliminados de la proteína mediante un procesamiento postraduccional, bien por un mecanismo de autoprocesamiento o bien mediante la acción de otras peptidasas (Khan y James, 1998 Bzymek y col., 2004; Baker y col., 1992). Ejemplos clásicos de proteasas que sufren activación por pérdida de prodominios son las enzimas del tracto digestivo que se sintetizan como zimógenos (Neurath, 1985). Otras proteasas, incluidas algunas metaloenzimas como las subtilisinas, las termolisinas o las carboxipeptidasa A y Nrp de *Bacillus brevis*, sufren dicho procesamiento (Taylor y col., 1995; Markaryan y col., 1996; Baker y col., 1992; Winther y col., 1994).

La elastasa LasB o pseudolisina producida por *Pseudomonas aeruginosa* es sintetizada inicialmente como una pre-proproteína. Mclver y colaboradores (2004) han descrito la función del dominio pro-N-terminal en esta enzima realizando experimentos de mutagénesis dirigida en los que se realizó la sustitución de aminoácidos conservados del prodominio. Han determinado que la elastasa requiere este propéptido N-terminal para su correcto plegamiento, lo que determina su funcionalidad, ya que cuando la enzima no se plegaba correctamente era atacada por otras proteasas intracelulares y degradada; estos dominios son, asimismo, requeridos para la secreción de la enzima ya que la sustitución de determinados residuos determina que la elastasa no sea reconocida por la maquinaria de secreción y se acumule en el interior celular (Mclver y col., 1995; Braun y col., 1998). De la misma manera se ha demostrado que la proteasa termolisina producida por *Bacillus thermoproteolyticus* posee un dominio pro-N-terminal que es requerido para su correcto plegamiento (O'Donohue y Beaumont, 1996; Marie-Clarie y col., 1998).

A continuación de este dominio pro-N-terminal se encuentra la secuencia que codifica la proteína madura. El extremo N-terminal de la haloproteasa CP1 (ADATGPGGNQKTGGQYNY), determinado experimentalmente a partir de la proteína purificada, es idéntico al determinado a partir de la secuencia de aminoácidos. La haloproteasa CP1 presenta una elevada similitud con metaloproteasas de la familia de las termolisinas (peptidasas M4). Todas las peptidasas pertenecientes a esta familia M4 unen un átomo de Zn^{2+} .

Las metaloproteasas dependientes de zinc están ampliamente distribuidas tanto en eucariotas como en procariotas y se clasifican en cuatro grupos. Al grupo que posee el motivo HEXXH se le conoce como superfamilia "zincins". En este grupo el ión de zinc se encuentra tetracoordinado. Las dos histidinas del motivo HEXXH actúan como ligandos del zinc y el glutámico como centro activo. Esta familia "zincins" está dividida en, al menos, 10 subfamilias en base a la localización del tercer ligando del zinc. Las metaloproteasas bacterianas pertenecientes a este grupo las podemos incluir en tres subfamilias: termolisinas (o familia M4), serralisinas y neurotoxinas. Las enzimas "tipo" de cada familia son las producidas por *Bacillus thermoproteolyticus*, *Serratia marcescens* y *Clostridium botulinum* o *C. tetani*, respectivamente (Miyoshi y Shinoda, 2000). La familia de las peptidasas M4, o termolisinas, comprende una serie de metaloproteasas ampliamente estudiadas, gracias a la caracterización de la estructura tridimensional de proteínas de este grupo como la termolisina producida por *B. thermoproteolyticus* o la proteína LasB secretada por *Pseudomonas aeruginosa* (Mathews y col., 1972; Thayer y col., 1991). Los cuatro residuos que actúan como ligandos de la molécula de zinc y los que actúan como centro activo han sido claramente identificados en las secuencias de aminoácidos de las proteínas que pertenecen a esta familia (Titani y col., 1972; Matthews, 1988). Otros miembros de esta familia son las metaloproteasas producidas por *Legionella pneumophila*, *V. cholerae* y *Listeria monocytogenes* (Moffat y col., 1994; Nagamune y col., 1996).

La haloproteasa CP1 presenta el dominio típico HEXXH, entre las posiciones His³⁵² e His³⁵⁶. En la familia de las termolisinas existe otro dominio conservado, GXXNEXXSD, que también está presente en la haloproteasa CP1, concretamente entre las posiciones Gly³⁷² y Asp³⁸⁰ (Figura 76). El residuo Glu³⁷⁶ de este motivo se suele situar a unos 14-33 aminoácidos a la derecha del motivo típico. Esta molécula de glutámico actúa como tercer ligando del zinc (Jongeneel y col., 1989). Como hemos indicado anteriormente el ión de zinc está tetracoordinado, la cuarta molécula es agua, que a su vez forma un puente de hidrógeno con el glutámico del motivo HEXXH, aumentando su nucleofilia (Supuran y col., 2002).

Por último, en la secuencia de la haloproteasa CP1 encontramos dos regiones en el extremo C-terminal de la proteína que se denominan **pro-peptidasa C-terminal** (PPC) o regiones pro-C-terminal. Estas regiones comprenden unos 90 aminoácidos y se encuentran

normalmente en el extremo C-terminal de proteasas bacterianas secretadas. Se han encontrado estos dominios en, al menos, cuatro familias de peptidasas y así, se han descrito en algunos miembros de las familias de las metalopeptidasas M4, M9 y M28 y también en la familia de las serina peptidasas S8 (Rawlings y col., 2002). Parece ser que no están presentes en la proteína madura ya que se pierden después de la secreción, aunque antes de la activación de la misma, bien por autoprocesamiento o bien por la acción de una endopeptidasa. Estos dominios PPC sólo se han encontrado en bacterias y arqueas, no en eucariotas (Yeats y col., 2003). La haloproteasa CP1 presenta dos de estos dominios, el primero se extiende desde el aminoácido 543 al 625 y el segundo desde el aminoácido 647 al 733. Estas repeticiones en el extremo C-terminal también están descritas en otras proteasas, como las serina proteasas AprI y AprII (que presentan un dominio PPC) o las metaloproteasas MprI, MprII (presentan dos dominios PPC) y MprIII (presenta cuatro dominios PPC) producidas por *Alteromonas* sp. cepa 0-7 (Tsujiyama y col., 1993; 1996; Miyamoto y col., 2002a; 2002b), o la metaloproteasa Empl producida por *Pseudoalteromonas* sp. cepa A28 (Lee y col., 2002). También están presentes en las proteasas extracelulares de *Aeromonas proteolytica* (Bzymek y col., 2004) y *Aeromonas caviae*, en las cuales se ha descrito la implicación de estos dominios en el procesamiento de las mismas (Kawakami y col., 2000). Este extremo C-terminal se ha encontrado también en las proteasas producidas por otras bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, como *Helicobacter* (Smith y col., 1994), *Schewanella* (Kulakova y col., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Wetmore y col., 1992) o diversas especies del género *Bacillus*. También se ha postulado que el dominio pro-C-terminal podría estar implicado en procesos de secreción (David y col., 1992), aunque en la actualidad no está clara su función.

El peso molecular de la haloproteasa CP1, calculado mediante electroforesis SDS-PAGE, fue de 38 kDa. El peso molecular estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la misma, eliminando los aminoácidos correspondientes al péptido señal y a la región correspondiente al dominio pro N-terminal es de 55,7 kDa. Dicho tamaño es notablemente mayor al calculado experimentalmente. Estos resultados sugieren que los dominios PPC no están presentes en la proteína madura. Si se eliminan estos dominios PPC, el peso molecular estimado de la proteasa madura es de 35,3 kDa. Este valor si concuerda con el calculado experimentalmente, ya que la pequeña diferencia de tamaño, 2,7 kDa, se puede atribuir a un error experimental.

En cuanto a los puentes disulfuro, la haloproteasa CP1 se ve afectada cuando se trata con agentes reductores, como ditioneol y 2-mercaptoetanol (Tabla 36), lo que sugiere que la formación de dichos puentes es importante para que la proteína adopte su conformación activa. En proteínas análogas a CP1, como la proteasa Vvp de *Vibrio vulnificus* o la proteasa LasB de *Pseudomonas aeruginosa*, se ha descrito la presencia de cisteínas conservadas que forman puentes disulfuro; estas cisteínas también están presentes en la

haloproteasa CP1 en las posiciones 244, 270, 489 y 517 (Nirasawa y col., 1999; Braun y col., 2001).

Así, el análisis molecular de la haloproteasa CP1 nos revela una alta similitud con metaloproteasas de la familia M4. En la secuencia de aminoácidos encontramos los motivos conservados de estas enzimas; además, estos resultados se corroboran con los estudios bioquímicos, ya que los quelantes de metales, como EDTA, tienen el efecto de disminuir la actividad de la enzima.

Por otro lado, la haloproteasa CP1 presenta una clara inactivación por concentraciones crecientes de PMFS (Tabla 34), un inhibidor específico de serina proteasas, aunque el motivo típico de las mismas no se encuentra en la haloproteasa CP1 al alinearla con otras serina proteasas depositadas en las bases de datos. Está descrito el caso de una serina metaloproteasa producida por *Burkholderia pseudomallei* (Lee y Liu, 2000), en la que está presente el motivo típico de las serina proteasas pero no el de las metaloproteasas y es inhibida tanto por EDTA como por PMSF.

El mecanismo exacto mediante el cual la haloproteasa CP1 se sintetiza y se secreta al exterior no está claro, si bien basándonos en estudios previos proponemos que el procesamiento de la haloproteasa CP1 podría seguir el proceso indicado en la Figura 109. La haloproteasa CP1, como la mayoría de las metaloproteasas de la familia M4, es sintetizada en el citoplasma como una pre-proteína que va a sufrir un proceso de maduración antes de ser activa (Tsuji y col., 1993). En primer lugar, la proteína inmadura es dirigida al periplasma, para lo cual el péptido señal es hidrolizado a su paso a través de la membrana interna, mediado por el sistema Sec de secreción, ya que el péptido señal de la haloproteasa CP1 comparte las características de los péptidos señales de las proteínas reconocidas por el sistema Sec. No se ha encontrado el motivo característico de los péptidos señal (dos residuos de arginina consecutivos) de las proteínas reconocidas por el sistema Tat. Una vez en el periplasma existen varias hipótesis, pero la más probable es que el dominio pro-N-terminal sea hidrolizado por un proceso autocatalítico y permanezca unido covalentemente a la proteína, actuando como chaperona intramolecular y evitando que la proteína sea activa en este compartimento pudiendo hidrolizar componentes celulares (Tang y col., 2002). Posteriormente, en el espacio periplásmico se forman puentes disulfuro que son necesarios para que la proteína adquiera su conformación, proceso mediado por chaperonas. Seguidamente, este propéptido unido covalentemente es reconocido por alguna proteína de la maquinaria de secreción de tipo II y se produce la translocación a través de la membrana externa (Braun y col., 1998; 2001). Parece que inmediatamente ocurre la disociación de este dominio pro-N-terminal que es hidrolizado, desencadenando a su vez la hidrólisis del dominio pro-C-terminal y de esta forma la proteína adquiere una conformación funcional. No se conoce cómo se produce la hidrólisis de estos prodominios, ya que hay autores que postulan que se trata de un proceso

autocatalítico, mientras que otros piensan que podría ser otra proteasa la encargada de hidrolizar estos dominios o bien sería alguna de las proteínas del sistema de secreción de tipo II la responsable de reconocer e hidrolizar este propéptido (Marie-Claire y col., 1998; Kessler y col., 1998; Nirasawa y col., 1999; Bzymek y col., 2004; McIver y col., 1991; 2004).

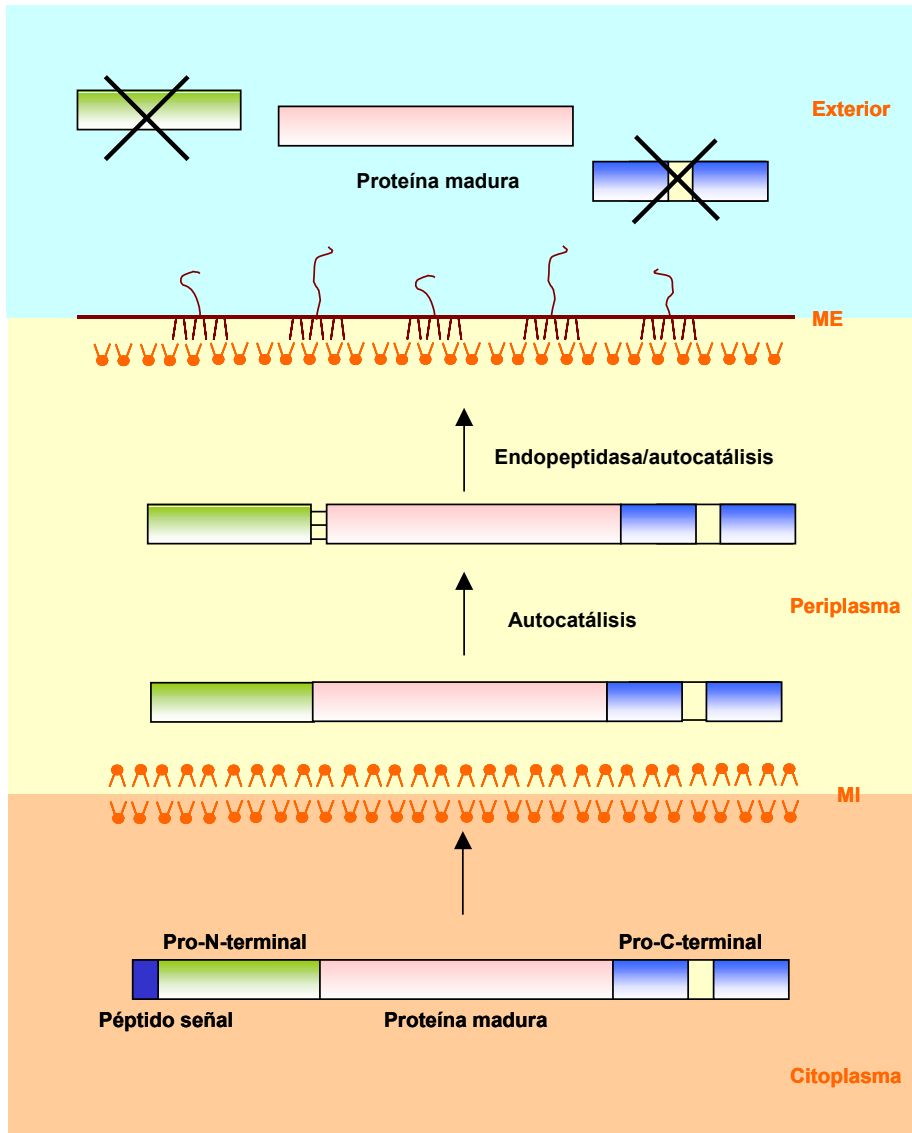


Figura 109. Modelo del posible procesamiento de la haloproteasa CP1

La proteasa CP2 consta de 614 aminoácidos. La secuencia presenta una elevada similitud con proteasas descritas en otras bacterias Gram-negativas, como la proteasa MetII de *Alteromonas* (75%) o la proteasa Amp de *Vibrio cholerae* (58%) (Miyamoto y col., 2002;

Heidelberg y col., 2000); concretamente, se tratan de aminopeptidasas de la familia M28 (Tabla 46).

La familia de metalopeptidasas M28 contiene aminopeptidasas y carboxipeptidasas que se caracterizan por coordinar dos moléculas de Zn^{2+} en su sitio activo. Cada ión de zinc está tetracoordinado con tres aminoácidos y una molécula de agua. Los ligandos del zinc siguen este orden en la secuencia de la proteína: His (zinc II), Asp (zinc I y II), Glu (zinc I), Asp/Glu (zinc II) y por último His (zinc I) (Chevrier y col., 1996). El cuarto ligando para ambas moléculas de zinc es una molécula de agua. Algunos miembros de esta familia son la aminopeptidasa SGAP producida por *Streptomyces griseus*, la aminopeptidasa AAP producida por *Vibrio proteolyticus* y la aminopeptidasa BSAP producida por *Bacillus subtilis* (Guenet y col., 1992). La familia M28 también incluye proteínas humanas como el antígeno específico de membrana prostático (PSMA) y la glutamato carboxipeptidasa II (GCP-II) (Mahadevan y Saldanha, 1999; Holz y col., 2003). Una de las aminopeptidasas más caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y molecular es la aminopeptidasa SGAP producida por *Streptomyces griseus* (Maras y col., 1996). Se trata de una proteína de 30 kDa, monomérica, que presenta activación por calcio y que ha sido cristalizada (Spungin y col., 1989; Ben-Meir y col., 1993; Almog y col., 1993; Greenblatt y col., 1997). Además, la aminoproteasa APP producida por *V. proteolyticus* también ha sido cristalizada (Chevrier y col., 1994) y el análisis comparativo de ambas estructuras ha permitido la determinación de los sitios activos de las proteasas pertenecientes a esta familia M28 (Chevrier y col., 1996). La proteasa CP2 presenta estos mismos residuos conservados, por lo que es muy probable que su mecanismo de acción sea similar al descrito para estas proteínas. Se han determinado como motivos conservados, el dominio HXD entre las posiciones His²⁰⁹ y Asp²¹¹, donde la His²⁰⁹ actúa como ligando de una de las moléculas de zinc; una molécula de Asp²²⁸ que es la compartida entre las dos moléculas de zinc, dos moléculas de glutámico consecutivas en la posición Glu²⁶²Glu²⁶³, donde una de ellas actúa como ligando de una de las moléculas de zinc y como últimos ligandos, una molécula de Asp²⁹⁰ y otra de His³⁶⁷ (Gilboa y col., 2000; 2001) (Figura 77). Estos motivos se han descrito también en otras aminopeptidasas como en la aminopeptidasa LAP producida por *Vibrio cholerae* (Toma y Honma, 1996), o la aminopeptidasa PaAP de *Pseudomonas aeruginosa* (Cahan y col., 2001).

La proteasa CP2 presenta un péptido señal de 22 aminoácidos (Figura 80.B). Al igual que el péptido señal de la haloproteasa CP1 se trata de un péptido señal típico (von Heijne, 1983; Watson, 1984).

Además, la proteasa CP2 no presenta homología significativa con ningún dominio pro-N-terminal. La comparación de las secuencias de aminoácidos de CP1 y CP2 no muestra una elevada similitud entre sus extremos N-terminales, estando más conservados sus extremos C-terminales (Figura 82).

Al igual que la haloproteasa CP1, la proteasa CP2 presenta dos repeticiones PPC en su extremo C-terminal. Concretamente, estas regiones se extienden desde el aminoácido 424 al 506 y del 540 al 614. No disponemos de datos experimentales que nos indique si estos dominios se encuentran presentes en la proteína madura, pero si se comporta como la haloproteasa CP1 suponemos que se perderán en el proceso de maduración, al igual que ocurre con la aminopeptidasa AAP producida por *Vibrio proteolyticus* (van Heeke y col., 1992), la producida por *Vibrio cholerae* (Toma y Honma, 1996), o la producida por *Aeromonas caviae* (Zhang y col., 2001). En las aminopeptidasas producidas por *A. caviae* y *V. cholerae* este dominio pro-C-terminal tiene la función de ayudar al correcto plegamiento de la proteína madura ejerciendo un efecto inhibitor de la actividad proteolítica antes de alcanzar el exterior celular evitando de esta forma que la proteína hidrolice a los propios componentes bacterianos (Nirasawa y col., 1999a; Zhang y col., 2000; 2001).

Debemos indicar que la presencia de la proteasa CP2 podría explicar la imposibilidad de obtener mutantes de *P. ruthenica* CP76 con fenotipo proteasa negativo utilizando la técnica de mutagénesis al azar mediante el uso del transposón Tn 1732. La efectividad de este transposón ha sido demostrada en otras especies halófilas moderadas, como *H. elongata* y *H. meridiana* (Kunte y Galinski, 1995; Cánovas y col., 1997b, Coronado y col., 2000a). Se analizaron un total de 6775 transconjugantes. Este transposón sólo se inserta una vez en el cromosoma y aunque tuviésemos interrumpida una de las proteasas, siempre observaríamos el fenotipo de la otra. Es muy común que las bacterias excreten al medio extracelular más de una proteasa; algunos ejemplos lo constituyen *Pseudomonas aeruginosa*, especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudoalteromas* o *Vibrio* (Cahan y col., 2001; Singh y col., 2001; Lee y col., 2000; 2002; Kothary y col., 1985). Una de las funciones de las proteasas extracelulares de bacterias es la de hidrolizar sustratos del exterior que rápidamente le aporten pequeños péptidos y aminoácidos libres que suministran a la bacteria las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para su desarrollo (Maeda y Yamamoto, 1996) y muchas de ellas también están implicadas en los mecanismos de patogénesis (Pohlner y col., 1987; Bever y Iglewski, 1988; Song y col., 2004).

Algunos autores han postulado que las proteínas que se sintetizan de forma inmadura y necesitan un proceso de maduración para ser funcionalmente activas, necesitan de otra peptidasa encargada de hidrolizar los dominios C y/o N terminales (Bzymek y col., 2004; Staroscik y col., 2005); sin embargo, otros estudios indican que dicho proceso ocurre de manera autocatalítica (Inouye, 1991; Braun y col., 2001). Quizás la función de esta proteasa CP2 sea la de hidrolizar los dominios pro-N y/o C terminales de la haloproteasa CP1 (Nirasawa y col., 1999; Bzymek y col., 2004; Staroscik y col., 2005), aunque sería necesario realizar más estudios para determinar esta función.

La conformación de las proteínas de microorganismos halófilos se ve afectada por las altas concentraciones salinas que deben soportar (Madern y col., 2000). Así, como hemos indicado en la Introducción, el mecanismo de adaptación de las bacterias halófilas moderadas a los ambientes salinos difiere del mecanismo que adoptan los microorganismos halófilos extremos; los microorganismos halófilos moderados acumulan solutos compatibles en su interior y no es necesario que mantengan altas concentraciones iónicas intracelulares (Oren, 2002; Galinski, 1995; Ventosa y col., 1998c). En general, como hemos descrito anteriormente, las proteínas de bacterias halófilas moderadas no presentan un marcado carácter ácido, si bien se ha descrito un pequeño aumento en el número de residuos ácidos de las mismas (Gandbhir y col., 1995; Coronado y col., 2000b). Por otra parte, otras características que presentan las proteínas de haloarqueas, como son la disminución del contenido de aminoácidos hidrofóbicos, no se observa en proteínas de bacterias halófilas moderadas (Gandbhir y col., 1995). Estas características tampoco se observan en las proteínas periplásmicas de *Chromohalobacter salexigens*, aunque las mismas presentan un carácter ácido semejante a las proteínas de haloarqueas (Oren y col., 2005).

Tanto la haloproteasa CP1 como la proteasa CP2 no presentan una mayor proporción de aminoácidos ácidos (Tabla 48 y Figuras 84 y 85), característica que se ha descrito como el principal mecanismo de adaptación a la sal que presentan las proteínas de haloarqueas (Mevarech y col., 2000). Debemos tener en cuenta que las enzimas de haloarqueas se desnaturalizan a bajas concentraciones de sal; sin embargo, CP1 conserva una alta actividad en ausencia de NaCl. Otra de las características que determinan el carácter halófilo de las proteínas de haloarqueas es la disminución de aminoácidos hidrofóbicos que presentan (Madern y col., 2000). En el caso de la haloproteasa CP1 se observa una ligera disminución de aminoácidos hidrofóbicos, característica que no se detecta en la proteasa CP2.

La adaptación de las proteínas de bacterias halófilas moderadas a la sal todavía no se ha estudiado en detalle. Si bien las proteínas periplásmicas de *C. salexigens* parecen compartir algunas de las características generales que presentan las proteínas de haloarqueas, como la presencia de residuos ácidos (Oren y col., 2005), las proteínas extracelulares de las bacterias halófilas moderadas estudiadas hasta el momento no muestran estas características de manera tan marcada (Coronado y col., 2000b). En cualquier caso se necesitan más estudios moleculares para poder dilucidar la gran versatilidad que presentan estas proteínas capaces de permanecer activas y estables tanto a bajas concentraciones salinas como a concentraciones elevadas. Así, la haloproteasa CP1 presenta actividad a 0 M de NaCl y conserva hasta un 40% de actividad a 4 M (Figura 58.C).

A medida que se han caracterizado un mayor número de proteínas sometidas a estrés osmótico, se observa que la adaptación de las mismas a la sal no sigue un patrón general, sino que son los comportamientos individuales los que determinan su funcionalidad a distintas concentraciones salinas. Parecería lógico pensar que las dos estrategias generales que utilizan el grupo de los microorganismos halófilos extremos y moderados para soportar la presión osmótica condicionaría las estrategias que las proteínas de estos microorganismos utilizan para ser activas y estables a altas concentraciones salinas. Sin embargo, las características de las proteínas de la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* parece contradecir esta hipótesis, puesto que las proteínas de esta bacteria no comparten un patrón homogéneo; así, enzimas como una isocitrato deshidrogenasa, una ácido graso sintetasa y una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Oren y Mana, 2002; 2003; Oren y col., 2003) se comportan como típicas proteínas halófilas, perdiendo su funcionalidad a bajas concentraciones salinas, mientras que las enzimas malato deshidrogenasa y hexokinasa (Oren y Mana, 2002; 2003) presentan la característica de ser activas y estables a bajas concentraciones salinas, siendo inhibidas a altas concentraciones.

Estamos ante una proteasa, CP1, que no comparte el perfil general de composición de aminoácidos que presentan las proteínas halófilas, pero que, sin embargo, es estable y activa en altas concentraciones de sal, por lo que sin duda, deben existir otros mecanismos que expliquen su carácter halófilo. Estudios encaminados a determinar los procesamientos postraduccionales que sufren estas proteínas nos ayudarán a dilucidar los mecanismos moleculares que determinan la estabilidad de estas proteínas a distintas concentraciones de sal.

El tercer ORF que se ha obtenido mediante PCR inversa codifica una proteína, denominada LipP, que aunque está incompleta, presenta homología con la familia de las α/β hidrolasas. La mayor similitud la presenta con las esterasas de *Dechloromonas aromatica* (63%), *Rubrivivax gelatinosus* (59%) y *Microbulbifer degradans* (56%). La familia de las α/β hidrolasas se caracterizan por presentar un centro activo constituido por una triada catalítica formada por residuos de Ser, His y Asp/Glu. El residuo de serina normalmente aparece formando parte de un peptapéptido muy conservado, GXSXG (Sinchaikul y col., 2001). Este motivo se localiza en LipP entre las posiciones 49 y 53 (GTSAG).

Se trata además de una esterasa extracelular, ya que presenta un péptido señal de 23 aminoácidos. Al igual que el péptido señal de la haloproteasa CP1 y de la proteasa CP2, se trata de un péptido señal típico que presenta las tres regiones características anteriormente descritas (von Heijne, 1983; Watson, 1984). Este gen se podría corresponder con la actividad lipolítica extracelular detectada en *P. ruthenica* CP76, pero necesitaríamos realizar más estudios para corroborar esta hipótesis.

Debido al bajo rendimiento obtenido en la purificación de la haloproteasa CP1, decidimos clonar el gen *cp1* en el vector pET22b(+). La proteína CP1 recombinante se produce en forma de cuerpos de inclusión que se solubilizaron con urea y la proteína solubilizada se purificó mediante cromatografía de afinidad (HiTrap Chelating HP, Amersham). Aunque se realizaron numerosos ensayos con el fin de determinar las condiciones óptimas de plegamiento de la proteína recombinante no se consiguió la renaturalización de la misma. Esta proteína recombinante la utilizaremos para la obtención de anticuerpos específicos anti-CP1 que nos permitirán realizar futuros estudios de secreción (Figura 92).

III. Caracterización del sistema de secreción que utiliza *P. ruthenica* CP76 para excretar las proteasas CP1 y CP2

Las proteasas CP1 y CP2 mostraron homología con metaloproteasas de bacterias que se secretan al exterior utilizando el sistema GSP de tipo II (Sandkvist, 2001). Esto nos indujo a pensar que el sistema de secreción más probable que utilizase *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 fuese también dicho sistema GSP de tipo II. Además la presencia en ambas proteínas de un péptido señal típico que es reconocido por el sistema Sec afianzó nuestra hipótesis de partida.

Este sistema está compuesto por un complejo multiproteico de 12-16 proteínas diferentes (dependiendo de la especie) localizado en el espacio periplásmico. La proteína D es un oligómero de unas 12-15 subunidades que juega un papel muy importante en este tipo de secreción siendo la encargada de formar el poro en la membrana externa (Kazmierczak y col., 1994; Hardie y col., 1996a; Lindeberg y col., 1996; Linderoth y col., 1997; Bitter y col., 1998; Bitter, 2003). Debido a que esta proteína se encuentra muy conservada entre las distintas especies bacterianas Gram-negativas, amplificamos mediante PCR un fragmento de 912 pb del gen que codifica esta proteína en *P. ruthenica* CP76. Este fragmento lo utilizamos como punto de partida para amplificar mediante PCR inversa la secuencia completa de dicho gen. De esta forma amplificamos un fragmento de 2979 pb del ADN genómico de *P. ruthenica* CP76 (Figura 99). El análisis de la secuencia de este fragmento identificó tres posibles regiones codificantes orientadas en el mismo sentido, dos de las cuales están incompletas. El ORF2 denominado *wmpD* está completo, consta de 2067 pb y la secuencia de aminoácidos deducida del mismo, denominada WmpD, presenta homología con proteínas D implicadas en el sistema de secreción de tipo II de diversos microorganismos. El ORF1 y el ORF3 denominados *wmpC* y *wmpE* respectivamente, aunque están incompletos, muestran homología con proteínas C y proteínas E, implicadas también en el sistema de secreción de tipo II de otros grupos bacterianos.

El ORF2 codifica una proteína (WmpD) de 74,8 kDa. Esta proteína presenta un péptido señal de 32 aminoácidos (Figura 101). Se trata de un péptido señal típico con las regiones

n, h y c, características (von Heijne, 1983; Watson, 1984). Además, el programa Psortb predice que se trata de una proteína asociada a la membrana externa (Figura 102). Dentro del sistema de secreción de tipo II solamente las proteínas D y S están asociadas a esta membrana (Genin y Boucher, 1994; Stathopoulos y col., 2000).

Las proteínas D pertenecen a una gran familia de proteínas homólogas llamadas secretinas, aunque a diferencia de las secretinas propiamente dichas, que son inespecíficas para el sustrato que pasa a través de ellas, la proteína D reconoce, por algún mecanismo específico todavía sin elucidar, la proteína que va a transportar. El dominio C-terminal en estas proteínas D está conservado y a través de él se inserta en la membrana externa, mientras que el dominio N-terminal es más variable y está expuesto al periplasma donde interacciona con otros componentes del aparato de secreción (Genin y Boucher, 1994). Parece que es la interacción entre el dominio N-terminal con otros componentes del aparato de secreción lo que induce el cambio de conformación en el extremo C-terminal y esto conlleva a la apertura del poro. La región conservada del extremo C-terminal abarca unos 200-300 residuos, de los cuales cerca de 60 son glicinas y prolinas que se ha demostrado que son residuos muy importantes para la funcionalidad de la proteína (Russel, 1994). Se han descrito cuatro regiones (A, B, C y D) muy conservadas en este extremo C-terminal de las proteínas D (Genin y Boucher, 1994; Schmidt y col., 1997); dichas regiones las localizamos en la proteína WmpD (Figura 100). En la región A los aminoácidos conservados son Asn³²⁷, Ile³⁴⁵, Leu³⁴⁸, Asp³⁴⁹, Ile³⁶¹, Gly³⁷³ y Trp³⁷⁶; en la región B los aminoácidos son Gly⁵¹⁶, Leu⁵¹⁹, Val⁵²¹ y Pro⁵²³; en la región C los aminoácidos conservados son Thr⁵⁵⁹, Gly^{566,572 y 573}; por último el dominio D presenta conservados los aminoácidos Pro⁵⁸⁷, Leu⁵⁸⁹, Ile⁵⁹², Pro⁵⁹³, Gly⁵⁹⁶, Leu⁵⁹⁸ y Phe⁵⁹⁹.

Una diferencia fundamental entre las secretinas y las proteínas D lo constituye el mecanismo de inserción a la membrana externa; así, las secretinas presentan en el extremo C-terminal una serie de residuos hidrofóbicos, fundamentalmente unidades de tirosina y una fenilalanina en la última posición, que son los encargados de la inserción de la misma en la membrana. Estos residuos están ausentes en las proteínas D descritas y tampoco se localizan en la proteína WmpD, ya que al igual que otras proteínas D, parece que su asociación a la membrana externa está mediada por la proteína S (Struyve y col., 1991; Pugsley y col., 1997).

La mayoría de los genes implicados en el sistema de secreción de tipo II están muy conservados en las distintas especies bacterianas y se transcriben en un sólo operón. Existen algunas excepciones como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes* donde los genes que codifican las proteínas C y D están localizados en operones diferentes (Groot y col., 2001; Sandkvist 2001a; 2001b; Thanassi, 2002) (Figura 14).

En el análisis de la secuencia de 2.979 pb de *P. ruthenica* CP76 no se encontró ninguna región palindrómica que pudiese actuar como terminadora de la transcripción. Además, corriente arriba de la proteína WmpD nos encontramos una secuencia de aminoácidos que presenta homología con proteínas C y corriente abajo de WmpD está presente otro ORF, que aunque incompleto, presenta homología con proteínas E, por lo que parece que como en muchas otras bacterias Gram-negativas (Pugsley y col., 1997; Filloux, 2004), los genes implicados en el sistema de secreción de tipo II en *P. ruthenica* CP76 se transcriben en un operón.

Con el fin de caracterizar la función biológica de la proteína WmpD, se procedió a interrumpir el gen *wmpD*, mediante un proceso de mutación por doble recombinación utilizando el cassette ΩSm (Prentki y Krisch, 1984). Un primer análisis funcional de los mutantes *wmpD::\Omega* en placas de SW7,5 caseína determinó la pérdida de actividad proteasa extracelular en los mismos (Figura 105). También realizamos un análisis de la actividad proteasa en las tres fracciones celulares (medio extracelular, periplasma y citoplasma) observando que el mutante *P. ruthenica* CP77 no presentaba apenas actividad en el sobrenadante, mientras que se detectaba un aumento de actividad tanto en el periplasma ($\approx 34\%$) como en el citoplasma ($\approx 42\%$), lo que indica que al estar interrumpido el canal de secreción la proteína no puede ser exportada al exterior (Figura 108).

En un futuro inmediato se amplificarán por PCR inversa las regiones adyacentes al fragmento de 2.979 pb con el fin de caracterizar los restantes genes que codifican las proteínas implicadas en el sistema de secreción de tipo II en *P. ruthenica* CP76. Para poder determinar la función precisa de cada una de estas proteínas nos proponemos realizar mutaciones no polares en cada uno de los genes que codifican las mismas y analizar como afectan estas mutaciones a la secreción de las proteasas CP1 y CP2 en *P. ruthenica* CP76.

Al ser el mecanismo de secreción de tipo II el más común en bacterias Gram-negativas, cabría esperar que al interrumpir los genes involucrados en este tipo de secreción tampoco se detectara actividad extracelular de las otras enzimas extracelulares, lipasa, DNAsa y amilasa, producidas por *P. ruthenica* CP76. Sin embargo, el mutante *P. ruthenica* CP77 presenta actividad extracelular lipasa, DNAsa y amilasa, por lo que estas enzimas deben ser secretadas por un mecanismo distinto al sistema de tipo II. Ejemplos de enzimas secretadas por mecanismos distintos al de tipo II lo encontramos en la lipasa LipA producida por *Serratia marcescens*, que se secreta por el mecanismo de secreción de tipo I (Akatsuka y col., 1994), o diversas proteínas secretadas por especies de los géneros *Yersinia*, *Shigella* o *Salmonella*, que se secretan por el sistema de secreción de tipo III (Ghosh, 2004). *Agrobacterium tumefaciens* secreta proteínas al exterior mediante el mecanismo de secreción de tipo IV (Christie, 2004); por último, *Bordetella pertussis* o *Helicobacter pylori* utilizan el mecanismo de secreción de tipo V para secretar sus proteínas (Henderson y col., 2004). Un ejemplo de una bacteria que utiliza distintos sistemas para secretar sus proteínas

es *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria Gram-negativa patógena oportunista que se caracteriza por producir numerosas toxinas, enzimas y adhesinas (Tomasen y col., 1992; Durand y col., 2003). Así, las proteasas alcalinas AprA y AprX son secretadas mediante el sistema de secreción de tipo I (Guzzo y col., 1991a; 1991b; Doung y col., 2001). Esta bacteria posee, al menos, dos sistemas de secreción de tipo II distintos, el sistema Xcp requerido para secretar la exotoxina A, diversas lipasas, la fosfolipasa C, fosfatasa alcalinas o la elastasa LasB (Filloux y col., 1998) y el sistema Hxc que es requerido para la secreción de moléculas de bajo peso molecular, como la fosfatasa alcalina LapA (Ball y col., 2002). Además *P. aeruginosa* secreta al medio la exotoxina S utilizando el sistema de secreción de tipo III (Yahr y col., 1997; Wu y col., 2004a). Por lo tanto aunque el sistema de secreción de tipo II sea el más común para secretar enzimas al exterior, tampoco es infrecuente que las bacterias empleen otro sistema para ello, por lo que fácilmente las enzimas DNAsa, lipasa o amilasa producidas por *P. rutherfordiana* CP76 pueden ser secretada por algún mecanismo distinto al de tipo II.

En resumen, la bacteria objeto de este estudio, *Pseudoalteromonas rutherfordiana* CP76, es capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones salinas y produce varias enzimas extracelulares, entre las que destacamos la haloproteasa CP1. Se trata de la primera proteasa extracelular producida por una bacteria halófila moderada que ha sido caracterizada tanto a nivel bioquímico como molecular. Las propiedades de esta enzima la hacen muy interesante desde el punto de vista biotecnológico. Además, en este trabajo se establecen las bases para un posterior estudio más detallado del mecanismo de secreción de dicha enzima al exterior de la célula y las posibles mejoras de la cepa para obtener una producción óptima de dicha enzima.

VI. CONCLUSIONES

1. La mayoría de las bacterias halófilas moderadas ensayadas provenientes de colecciones de cultivo no muestran actividad hidrolítica extracelular amilasa, proteasa, lipasa, DNAsa, pululanasa o xilanasas. En cambio, dichas actividades hidrolíticas en cepas halófilas moderadas aisladas de sus hábitat naturales, salinas del sur de España son más variadas. De las cinco actividades hidrolíticas estudiadas, la más abundante fue la amilasa (2,7%), seguida de la lipasa (2,1%), proteasa (2,0%) DNAsa (1,2%) y pululanasa (1%). La actividad xilanasas estaba ausente en todas las cepas ensayadas.
2. De todas las cepas con actividad proteolítica aisladas, se seleccionó la cepa CP76 para un estudio más detallado. En base a sus características fenotípicas, quimiotaxonómicas y genotípicas, así como a su posición filogenética, la cepa CP76 se asignó al género *Pseudoalteromonas*, como *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76.
3. *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 produce, al menos, dos proteasas extracelulares. La producción máxima tiene lugar en cultivos en fase exponencial tardía o estacionaria de crecimiento, en medios con un 7,5% de sales, en ausencia de maltosa y presencia de sacarosa, con elevada oxigenación y a 37°C de temperatura.
4. A partir del sobrenadante del cultivo de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 se ha purificado una proteína con actividad proteolítica, denominada haloproteasa CP1. Se trata de una metaloproteasa que presenta actividad óptima a 55°C, pH 8,5 y muestra una elevada tolerancia a las condiciones salinas, presentando actividad hasta, incluso, 4 M de NaCl y con un óptimo entre 0-2 M de NaCl.
5. La utilización de la técnica de PCR inversa ha permitido la clonación del gen que codifica la síntesis de la haloproteasa CP1 de *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76, denominado *cp1*. Dicho gen codifica una proteína de 733 aminoácidos que muestra homología con metaloproteasas de la familia M4. Dicha proteína presenta cuatro dominios conservados: un péptido señal, una región pro-N-terminal, la proteína madura y una región pro-C-terminal. Tanto el péptido señal como los dominios pro-N- y C-terminal son procesados durante la maduración de la proteína y no están presentes en la proteasa funcional.
6. El análisis corriente abajo del gen *cp1* ha permitido la localización y clonación de un segundo gen denominado *cp2*, que codifica una proteína de 614 aminoácidos que muestra homología con metaloproteasas de la familia M28. Asimismo, corriente abajo de *cp2* se encuentra otro gen, *lipP*, cuya proteína muestra homología con proteínas de la familia de las α/β hidrolasas.

7. Mediante la técnica de PCR inversa se ha amplificado un fragmento de 2.979 pb cuya secuencia muestra la presencia de tres marcos abiertos de lectura, dos de los cuales se encuentran incompletos. Las proteínas deducidas de estos marcos abiertos de lectura muestran homología con proteínas implicadas en el sistema de secreción de tipo II. El gen *wmpD* codifica una proteína de 688 aminoácidos que muestra homología con proteínas D, encargadas de la formación del poro en la membrana externa durante el proceso de secreción de tipo II. Los genes *wmpC* y *wmpE* codifican dos proteínas que muestran homología con las proteínas C y E de este sistema de secreción.
8. La inactivación del gen *wmpD* de *P. ruthenica* CP76 mediante mutagénesis insercional interrumpe la secreción de las proteasas CP1 y CP2, mientras que no se ve afectada la secreción de otras enzimas extracelulares producidas por esta bacteria (amilasa, lipasa y DNAsa). Así, *Pseudoalteromonas ruthenica* CP76 utiliza el sistema de secreción de tipo II para exportar al medio las proteasas, mientras que utiliza un mecanismo distinto para secretar las otras enzimas extracelulares.

VII. SUMMARY

Moderately halophilic bacteria are microorganisms which grow optimally in media containing 3-15% NaCl (Ventosa et al., 1998c). They constitute a complex physiological group of microorganisms adapted to thrive in saline environments. Apart from their ecological importance, moderately halophilic bacteria display a very interesting potential for use in biotechnology. Thus, they accumulate high cytoplasmic concentrations of compatible solutes that may be used as osmoprotectants and stabilizers of enzymes and cells (Galinski, 1993). Besides, some of them are used for the degradation of polluting industrial residues or toxic chemicals, and for enhanced oil recovery processes (Ventosa and Nieto, 1995; Ventosa et al., 1998c). Moreover, moderately halophilic bacteria produce extracellular salt-tolerant enzymes which have quite diverse potential usages in different areas such as food industry, feed additive, biomedical sciences and chemical industries (Onishi et al., 1991; Ventosa et al., 1998c, Mellado and Ventosa, 2003).

The possibility of using enzymes from halophilic bacteria in industrial processes has the advantage of optimal activities at high salt concentrations (Ventosa et al., 1998c). The interest in these extracellular enzymes resides in both, their biotechnological potential for novel applications and the need for a better understanding of their intrinsic salt resistance properties and the stabilization mechanisms that enable halophiles to survive to the extreme environments in which they are normal inhabitants.

In order to isolate moderately halophilic microorganisms able to produce different hydrolases (amylases, DNAses, lipases, proteases, pullulanases and xylanases) we performed a screening, sampling different hypersaline environments in South Spain. A total of 892 strains showing different hydrolytic activities were isolated: amylase (269 strains), lipase (207 strains), protease (201 strains), DNase (118 strains) and pullulanase (97 strains). Strains showing xylanase activity were not detected. Thus, in contrast, to strains belonging to previously described species, that showed very little hydrolytic activities, environmental isolates produced a great variety of hydrolases. These bacteria were able to grow optimally in media with 5-15% salts and in most cases up to 20-25% salts. These strains were identified as members of the genera: *Salinivibrio* (55 strains), *Halomonas* (25 strains), *Bacillus-Virgibacillus* (29 strains), *Salinicoccus* (2 strains) and *Marinococcus* (1 strain), as well as eight non-identified isolates.

Among these enzymes, proteases, which catalyze the hydrolysis of proteins have many commercial applications, particularly in the food and detergent industries (Rao et al., 1998). While several proteases from mesophilic microorganisms have been purified and characterized, and the corresponding genes have been cloned (Rao et al., 1998), proteases from halophilic microorganisms have not been extensively studied. A few proteases from extreme halophiles, members of the archaeal phylogenetic branch, have been characterized (Norberg and Hofsten 1969; Kamekura and Seno, 1990; Van Qua et al., 1981; Stepanov et al. 1992; Kamekura et al., 1992; Ryu et al., 1994; Giménez et al., 2000), but no

proteases from moderately halophilic bacteria have been purified and studied in depth so far (Ventosa et al., 1998c). Recently, Hiraga and coworker (2005) have purified and characterized an extracellular protease from *Filobacillus* sp. RF2-5, a moderately halophilic bacterium isolated from fish sauce in Thailand.

From the 201 proteolytic moderate halophiles isolated in the screening, strain CP76 was selected as the best producer of an extracellular protease, designated CP1, and was used for further studies. Apart from protease, extracellular amylase, lipase and DNase activities were detected in this strain.

The phenotypic, genotypic and phylogenetic analysis (based on sequence analysis of the 16S rRNA gene) performed, lead us to identify this strain as a member of the species *Pseudoalteromonas ruthenica*.

The maximal production of the protease CP1 by *P. ruthenica* CP76 was detected at the end of the exponential growth phase at 37°C, in media containing 7.5% salt and supplemented with sucrose (50 mM). Protease CP1 was purified using ion exchange and gel filtration chromatography. The purified enzyme, designated haloprotease CP1 was biochemically characterized, showing optimal activity at 55°C, pH 8.5 and high tolerance to a wide range of NaCl concentrations (0 to 4 M NaCl). The purified protease has a molecular mass of 38 kDa and the activity was strongly inhibited by EDTA, PMSF and Pefabloc. No significant inhibition was detected with E-64, bestatin, chymostatin or leupeptin.

N-terminal sequence determination of the haloprotease CP1 allowed the design of degenerate oligonucleotide primers for the amplification of the gene by inverse PCR and its nucleotide sequence was analyzed. The gene (2,202 pb), designated *cp1*, encodes a 733-residue protein with a molecular mass of 78.8 kDa. Database searches revealed the product encoded by *cp1* to have extensive sequence similarity to metalloproteases of the M4 family. The best alignment (69% identity) was obtained with the metalloprotease Empl from *Pseudoalteromonas* sp. A28 (Lee et al., 2002), followed by the metalloprotease from *Alteromonas* sp. 0-7 (78% identity)(Miyamoto et al., 2002). The sequence analysis of the region downstream from gene *cp1* revealed the presence of another ORF, designated *cp2*, which encodes a protein of 614 amino acids showing homology with metalloproteases of the aminopeptidase M28 family. Furthermore, other partial ORF (*lipB*) was located downstream from *cp2*, showing homology to proteins assigned to the α/β hydrolase family.

Two putative signal peptides of 28 and 21 amino acids have been identified in the haloprotease CP1 and protease CP2, respectively. Both extracellular proteases are synthesized as pre-proenzymes that are further processed to produce the mature protein by removal of their pro-regions. Haloprotease CP1 presents a 183-residue N-terminal prosequence, the 331-residue mature protein and a 191-residue C-terminal prosequence. The molecular mass of the native enzyme determined by SDS-PAGE was 38 kDa. These

results suggest that both, the C-terminal and N-terminal prosequences are cleaved by a post-translational process. Protease CP2 presents a 402-residue mature protein and a 191-residue C-terminal prosequence.

In this study we have investigated the protein secretion in moderately halophilic bacteria by using the haloprotease CP1 from *P. ruthenica* CP76 as a model enzyme. In Gram-negative bacteria, secreted proteins must cross the two membranes (inner and outer) that constitute the cell envelope. Considering the preproenzyme structure, the export of haloprotease precursor through the inner membrane may likely occur via the Sec pathway (Mori e Ito, 2001), coupled to the cleavage of the leader peptide.

The type II secretion pathway is the most widespread of the many terminal branch pathways of the general secretory pathway (Pugsley, 1993), and it is responsible for the translocation of toxins and hydrolytic enzymes across the outer membrane in a wide spectrum of Gram-negative bacteria. Following translocation of the protein to the periplasm by the signal-peptide-dependent Sec or Tat system, the folded substrate protein is transported across the outer membrane by the type II secretion apparatus, consisting of a multiprotein complex of at least 12 gene products (designated in most systems by letters A-O and S), some of which are not present in all type II secretions and others of which appear to be dispensable for secretion function (Pugsley et al., 1993; Pugsley et al., 1997; Sandkvist, 2001). Protein D constitutes the putative pore of the type II secretion apparatus, which forms a large oligomer of 12-14 subunits in the outer membrane (Genin and Boucher, 1994). The high conservation found among the homologous protein D of different bacteria allowed us to design degenerate oligonucleotide primers for the amplification of the gene by inverse PCR. We amplified a 2,979-bp DNA fragment. Sequencing of this fragment revealed the presence of one complete and two partial consecutive ORFs in the same orientation. The first ORF, showed homology to the type II secretion component protein C, and therefore it was designated *wmpC*. The second ORF, designated *wmpD*, encodes a 688-aminoacid protein with a molecular mass of 74.8 kDa highly similar to the proteins D of several type II secretion pathways and the third ORF, designated *wmpE*, encodes a polypeptide with the highest identity scores for the type II secretion component Pule.

To assess the implications of the type II secretion pathway in the secretion of the extracellular enzymes of *P. ruthenica* CP76, the *wmpD* gene was disrupted by a double-recombination event in the chromosome of the wild-type strain. The *wmpD:: ω Sm* mutant, designated *P. ruthenica* CP77, did not show extracellular protease activity, but the intracellular and periplasmic activity increased due to the accumulation of the protease in these cellular compartments. However, extracellular amylase, lipase and DNase activities are detected in *P. ruthenica* CP77. This finding indicates that the type II secretion components are responsible for the transfer across the outer membrane of the proteases CP1 and CP2, but a different mechanism could be responsible for the secretion of the other extracellular enzymes in *P. ruthenica* CP76.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F. y Horikoshi, K. 2001. The biotechnological potential of piezophiles. *Trends Biotechnol* **19**: 102-108.
- Adams, M.W.W. y Kelly, R.M. 1995. Enzymes from microorganisms in extreme environments. *Chem Eng News* **73**: 32-42.
- Adams, R.L. Bygraves, J., Kogut, M. y Russell, N.J. 1987. The role of osmotic effects in haloadaptation of *Vibrio costicola*. *J Gen Microbiol* **133**: 1861-1870.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. y Haser, R. 1998. Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanktis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci* **7**: 564-572.
- Aizawa, S.I. 2001. Bacterial flagella and type III secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 157-164.
- Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y. y Yamasato, K. 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 621-627.
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., Komatsubara, S., Shibatani, T. y Tosa, T. 1994. The *lipA* gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J Bacteriol* **176**: 1949-1956.
- Alami, M., Trescher, D., Wu, L.F. y Muller, M. 2002. Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 20499-20503.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffe, A.A., Zhang, J. Zhang, Z., Miller, W.W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Alva, V.A. y Peyton, B.M. 2003. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. *Environ Sci Technol* **37**: 4397-4402.
- Almog, O., Greenblatt, H.M., Spungin, A., Ben-Meir, D., Blumberg, S. y Shoham, G. 1993. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Streptomyces griseus* aminopeptidase. *J Mol Biol* **230**: 342-344.
- Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F. y Malik, K.A. 2003a. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *J Microbiol Methods* **52**: 353-359.
- Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F., Malik, K.A., Schumann, P. y Sproer, C. 2003b. *Halobacillus karajensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1059-1063.
- Andrade, C.M., Aguiar, W.B. y Antranikian, G. 2001. Physiological aspects involved in production of xylanolytic enzymes by deep-sea hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *Appl Biochem Biotechnol* **91-93**: 655-669.

- Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F. y Amann R. 1999. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* **1**: 517-523.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. y Rosselló-Mora, R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 485-491.
- Arahal, D.R. 1997. La Microbiota del Mar Muerto: 50 años después. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Arahal, D.R., Castillo, A.M., Ludwig, W., Schleifer, K.H. y Ventosa, A. 2002a. Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Syst Appl Microbiol* **25**: 207-211.
- Arahal, D.R., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Ventosa, A. y Volcani, B.E. 1996. Phylogenetic analysis of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3779-3786.
- Arahal, D.R., García, M.T., Ludwig, W., Schleifer, K.H. y Ventosa, A. 2001a. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter*, as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1443-1448.
- Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J. y Ventosa, A. 2001b. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.
- Arahal, D.R., Ludwig, W., Schleifer, K.H. y Ventosa, A. 2002. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 241-249.
- Arahal, D.R., Márquez, M.C., Volcani, B.E., Schleifer, K.H. y Ventosa, A. 1999. *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 521-530.
- Arahal, D.R., Márquez, M.C., Volcani, B.E., Schleifer, K.H. y Ventosa, A. 2000. Reclassification of *Bacillus marismortui* as *Salibacillus marismortui* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1501-1503.
- Arber, W. 1999. Involvement of gene products in bacterial evolution. *Ann N Y Acad Sci* **870**: 36-44.
- Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., Tallon, R., Quesada, E. y Béjar V. 2003. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* **7**: 319-326.
- Arndt, J.W., Hao, B., Ramakrishnan, V., Cheng, T., Chan, S.I. y Chan, M.K. 2002. Crystal structure of a novel carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Structure* **10**: 215-224.

- Arvanitis, N., Vargas, C., Tegos, G., Perysinakis, A., Nieto, J.J. Ventosa, A. y Drinas, C. 1995. Development of a gene reporter system in moderately halophilic bacteria by employing the ice nucleation gene of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3821-3825.
- Aunstrup, K., Ottrup, H., Andresen, O. y Dambmann, C. 1972. Proteases from alkalophilic *Bacillus* species. *En: Proceeding of the 4th International Fermentation Symposium*. Society of Fermentation Technology, Kyoto, Japón. pp. 299-305.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (eds.). 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, New York: John Wiley and Sons.
- Avron, M. y Ben-Amotz, A. (eds.), 1992. *Dunaliella*: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Raton: CRC Press.
- Baker, D., Silen, J.L. y Agard, D.A. 1992. Protease pro region required for folding is a potent inhibitor of the mature enzyme. *Proteins* **12**: 339-344.
- Backert, S., Churin, Y. y Meyer, T.F. 2002. *Helicobacter pylori* type IV secretion, host cell signalling and vaccine development. *Keio J Med* **51**: 6-14.
- Bakunina, I.Y., Ivanova, E.P., Nedashkovskaya, O.I., Gorshkova, N.M., Elyakova, L.A. y Mikhailov, V.V. 1996. Searches for α -galactosidase producers among marine bacteria of the genus *Alteromonas*. *Prikl Microbiol Biotech* **32**: 624-628.
- Bakunina, I.Y., Shevchenko, L.S., Nedashkovskaya, O.I., Shevchenko, N.M. Alekseeva, S.A., Mikhailov, V.V. y Zvyagintseva, T.N. 2000. Search of fucoidan hydrolases among marine microorganisms. *Mikrobiologiya* **69**: 370-376.
- Ball, G., Chapon-Herve, V., Bleves, S., Michel, G. y Bally, M. 1999. Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 382-388.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. y Filloux, A. 2002. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **43**: 475-485.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W. y Soni, R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem* **35**: 213-219.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. y Woessner, J.F. (eds.), 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London: Academic Press.
- Barrit, M.M. 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J Path Bacteriol* **42**: 441-445.

- **Barros, R.J., Wehtje, E. y Adlercreutz, P.** 1999. Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence of insoluble protonated nucleophile. *Enzyme Microbiol Technol* **24**: 480-488.
- **Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E.A. y Engert, A.** 2000. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1572-1579.
- **Bass-Becking, L.G.M.** 1931. Historical notes on salt and salt manufacture. *Sci Month* **32**: 434-446.
- **Batey, R.T., Rambo, R.P., Lucast, L., Rha, B. y Doudna, J.A.** 2000. Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle. *Science* **287**: 1232-1239.
- **Baumann, U.** 1998. Serralyisin. En A.J Barrett, N.D. Rawlings, y J.F. Woessner (eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes (CD-ROM). Chapter 386. London: Academic Press.
- **Baumann, P., Baumann, L., Bowditch R.D. y Beaman, B.** 1984a. Taxonomy of *Alteromonas*: *A. nigrifaciens* sp. nov. nom. rev.; *A. macleodii*; and *A. haloplanktis*. *Int J Syst Bacteriol* **34**: 145-149.
- **Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M. y Allen, R.D.** 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol* **110**: 402-429.
- **Baumann, P., Gauthier, M.J. y Baumann, L.** 1984b. Genus *Alteromonas* Baumann, Baumann, Mandel and Allen, 1972, 418^{AL}. En N.R. Krieg y J.G. Holt (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. pp. 343-352.
- **Bayoudh, A., Gharsallah, N., Chamkha, M., Dhouib, A., Ammar, S. y Nasri, M.** 2000. Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. *J Ind Microbiol Biotechnol* **24**: 291-295.
- **Bever, R.A. y Iglewski, B.H.** 1988. Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *J Bacteriol* **170**: 4309-4314.
- **Beg, Q.K., Saxena, R.K. y Gupta, R.** 2002. Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnol Bioeng* **78**: 289-295.
- **Béjar, V., Calvo, C., Moliz, J., Díaz-Martínez, F. y Quesada, E.** 1996. Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharides. *Appl Biochem Biochem* **59**: 77-86.
- **Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C., y Quesada, E.** 1998. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strain of the species *Halomonas eurihalina*. *J Biotechnol* **61**: 135-141.
- **Bein, S.J.** 1954. A study of certain chromogenic bacteria isolated from red tide water with a description of a new species. *Bull Mar Sci Gulf Carrib* **4**: 110-119.
- **Benlloch, S., Acinas, S.G., López-López, A., Luz, S.P. y Rodríguez-Varela, F.** 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb Ecol* **41**: 12-19.

- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E.O., Ovreas, L., Goddard, V., Daele, F.L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedrós-Alió, C. y Rodríguez-Valera, F. 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol* **4**: 349-360.
- Ben-Meir, D., Spungin, A., Ashkenazi, R. y Blumberg, S. 1993. Specificity of *Streptomyces griseus* aminopeptidase and modulation of activity by divalent metal ion binding and substitution. *Eur J Biochem* **212**: 107-112.
- Berks, B.C. 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?. *Mol Microbiol* **22**: 393-404.
- Berks, B.C., Sargent, F., De Leeuw, E., Hinsley, A.P., Stanley, N.R., Jack, R.L., Buchanan, G. y Palmer, T. 2000a. A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 325-330.
- Berks, B.C., Sargent, F. y Palmer, T. 2000b. The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**: 260-274.
- Bertoldo, C. y Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 151-160.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. y Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Ben-Meir, D., Spungin, A., Ashkenazi, R. y Blumberg, S. 1993. Specificity of *Streptomyces griseus* aminopeptidase and modulation of activity by divalent metal ion binding and substitution. *Eur J Biochem* **212**: 107-112.
- Bian, Z. y Normark, S. 1997. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J* **16**: 5827-5836.
- Binet, R., Létoffé, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P. y Wandersman, C. 1997. Protein secretion by Gram negative bacteria exporters: a review. *Gene* **192**: 7-11.
- Bitter, W. 2003. Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**: 307-314.
- Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., De Cock, H. y Tommassen, J. 1998. Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **27**: 209-219.
- Black, W.J., Quinn, F.D. y Tompkins, L.S. 1990. *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease is structurally and functionally homologous to *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Bacteriol* **172**: 2608-2613.
- Bleves, S., Lazdunski, A. y Filloux, A. 1996. Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**: 4297-4300.

- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. y Allaoui, A. 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* **39**: 652-663.
- Bochner, B.R. 1989a. "Breathprints" at the microbial level. *ASM News* **55**: 536-539.
- Bochner, B.R. 1989b. Sleuthing out bacterial identities. *Nature* **339**: 157-158.
- Bockle, B., Galunsky, B. y Muller, R. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3705-3710.
- Bogsch, E.G., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C. y Palmer, T. 1998. An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 18003-18006.
- Boethling, R.S. 1975. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **123**: 954-961.
- Boiden, A. y Effron, G. 1908. Patent No. 399087.
- Bonete, M.J., Pérez-Pomares, F., Díaz, S., Ferrer, J. y Oren, A. 2003. Occurrence of two different glutamate dehydrogenase activities in the halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 181-186.
- Borowitzka, L.J. 1981. The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia* **81**: 33-46.
- Boschioli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieuille, C., Lavigne, J.P., Liautard, J.P., Ramuz, M. y O'Callaghan, D. 2002. Type IV secretion and *Brucella virulence*. *Vet Microbiol* **90**: 341-348.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I. y Béjar, V. 2001. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1625-1632.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., Izquierdo, I., Rodríguez, M. y Béjar, V. 2000. Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated from hypersaline habitats in Morocco. *J Ind Microbiol Biotechnol* **24**: 374-378.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandon, L.D. y Goldberg, M.B. 2001. Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA. *J Bacteriol* **183**: 951-958.
- Brandon, L.D., Goehring, N., Janakiraman, A., Yan, A.W., Wu, T., Beckwith, J. y Goldberg, M.B. 2003. IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Mol Microbiol* **50**: 45-60.

- Braun, G. y Cole, S.T. 1984. DNA sequence analysis of the *Serratia marcescens ompA* gene: implications for the organisation of an enterobacterial outer membrane protein. *Mol Gen Genet* **195**: 321-328.
- Braun, P., de Groot, A., Bitter, W. y Tommassen, J. 1998. Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 3467-3469.
- Braun, P., Ockhuijsen, C., Eppens, E., Koster, M., Bitter, W. y Tommassen, J. 2001. Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Formation of the disulfide bonds. *J Biol Chem* **276**: 26030-26035.
- Braun, P. y Tommassen, J. 1998. Function of bacterial propeptides. *Trends Microbiol* **6**: 6-8.
- Brazilian National Genome Project Consortium. 2003. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11660-11665.
- Brenner, S. 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* **334**: 528-530.
- Britton, K.L., Stillman, T.J., Yip, K.S., Forterre, P., Engel, P.C. y Rice, D.W. 1998. Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *J Biol Chem* **273**: 9023-9030.
- Brock, T.D. 1979. Ecology of saline lakes. En M. Shilo (ed.), *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*. Weinheim: Verlag-Chemie. pp. 29-47.
- Brok, R., Van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A.J., de Cock, H, Koster, M., Tommassen, J. y Bitter, W. 1999. The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity. *J Mol Biol*. **294**: 1169-1179.
- Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**: 803-846.
- Bruins, M.E., Janssen, A.E. y Boom, R.M. 2001. Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl Biochem Biotechnol* **90**: 155-186.
- Brüser, T., Deutzmann, R. y Dahl, C. 1998. Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 329-336.
- Bryan, P.N. 2000. Protein engineering of subtilisin. *Biochim Biophys Acta* **1543**: 203-222.
- Burns DL. 1999. Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* **2**: 25-9.
- Burns, D.L. 2003. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**: 29-34.
- Bzymek, K.P., D'Souza, V.M., Chen, G., Campbell, H., Mitchell, A. y Holz RC. 2004. Function of the signal peptide and N- and C-terminal propeptides in the leucine aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*. *Protein Expr Purif* **37**: 294-305.

- Cadman, E., y Eichberg J. 1983. Presence of phospholipase A and lyso phospholipase activities in culture supernatant fluid from *Alteromonas espejiana*. *Int J Biochem* **15**: 1155–1160.
- Cahan, R., Axelrad, I., Safrin, M., Ohman, D.E. y Kessler, E. 2001. A secreted aminopeptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. Identification, primary structure, and relationship to other aminopeptidases. *J Biol Chem* **276**: 43645-43652.
- Calderón, M.I., Vargas, C., Rojo, F., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Ventosa, A. y Nieto, J.J. 2004. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology* **150**: 3051-3063.
- Calvo, C., de la Paz, A.G., Béjar, V., Quesada, E., y Ramos-Cormenzana, A. 1998. Isolation and characterization of phage F9-11 from a lysogenic *Deleya halophila* strain. *Curr Microbiol* **17**: 49-53.
- Calvo, C., Ferrer, M.R., Martínez-Checa, F., Béjar, V., y Quesada E. 1995. Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina*. *Appl Biochem Biotech* **55**: 45-54.
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J. y Quesada, E. 2002. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 347-351.
- Cannio, R., Di Prizito, N., Rossi, M. y Morana, A. 2004. A xylan-degrading strain of *Sulfolobus solfataricus*: isolation and characterization of the xylanase activity. *Extremophiles* **8**: 117-124.
- Cánovas, D. 1998. Bases moleculares de los mecanismos de osmorregulación en bacterias halófilas moderadas. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L.N., Ventosa, A. y Nieto, J.J. 1996. Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol*. **178**: 7221-7226.
- Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Rhodes, D., Ventosa, A. y Nieto J.J. 1997a. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**: 25794-25801.
- Cánovas, D., Vargas, C., Kneip, S., Morón, M.J., Ventosa, A., Bremer, E. y Nieto, J.J. 2000. Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Microbiology* **146**: 455-463.
- Cánovas, D., Vargas, C., Ventosa, A. y Nieto, J.J. 1997b. Salt-sensitive mutants and auxotrophic mutants of *Halomonas elongata* and *Halomonas meridiana* by using hydroxylamine mutagenesis. *Curr Microbiol* **34**: 85-90.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Díez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, Rodríguez-Valera, F. y Pedrós-Alió, C. 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages

- along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* **4**: 338-348.
- **Cascales, E. y Christie, P.J.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**: 137-149.
 - **Cascón, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Hernanz, C., Luengo, J.M. y Naharro, G.** 2000. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* **68**: 3233-3241.
 - **Caumette, P., Cohen, Y. y Matheron, R.** 1991. *Thiocaspa halophila* sp. nov., a new halophilic phototrophic purple sulfur bacterium. *Arch Microbiol* **155**: 170-176.
 - **Chaga, G. y Porath, J.** 1993. Isolation and purification of amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*. *Biomed Chromat* **7**: 256-261.
 - **Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. y Prasher, D.C.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
 - **Chan, K.Y., Baumann, L., Garza, M.M. y Baumann P.** 1978. Two new species of *Alteromonas*: *Alteromonas espejiana* and *Alteromonas undina*. *Int J Syst Bacteriol* **28**: 217-222.
 - **Chaphalkar, S.R. y Dey, S.** 1998. Thermostable alkaline metalloprotease from newly isolated alkalophilic *Streptomyces diastaticus* strain SS1. *Indian J Biochem Biophys* **35**: 34-40.
 - **Chavez Crocker, P., Sako, Y. y Uchida, A.** 1999. Purification and characterization of an intracellular heat-stable proteinase (pernilase) from the marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Extremophiles* **3**: 3-9.
 - **Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L., Liu, Y.M., Chen, H.J., Shen, A.B., Li, J.C., Su, T.L., Shao, C.P., Lee, C.T., Hor, L.I. y Tsai, S.F.** 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* **13**: 2577-2587.
 - **Cheng, S.W., Hu, H.M., Shen, S.W., Takagi, H., Asano, M. y Tsai, Y.C.** 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 2239-2243.
 - **Cheng, T.C. y DeFrank, J.J.** 2000. Patent US6080566.
 - **Cheng, T.C., Ramakrishnan, V. y Chan, S.I.** 1999. Purification and characterization of a cobalt-activated carboxypeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci* **8**: 2474-2486.
 - **Cheng, J.C., Shao, C.P. y Hor, L.I.** 1996. Cloning and nucleotide sequencing of the protease gene of *Vibrio vulnificus*. *Gene* **183**: 255-257.
 - **Cherry, J.R. y Fidantsef, A.L.** 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 438-443.

- **Chevrier, B., D'Orchymont, H., Schalk, C., Tarnus, C. y Moras, D.** 1996. The structure of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase complexed with a hydroxamate inhibitor. Involvement in catalysis of Glu151 and two zinc ions of the co-catalytic unit. *Eur J Biochem* **237**: 393-398.
- **Chevrier, B., Schalk, C., D'Orchymont, H., Rondeau, J.M., Moras, D. y Tarnus C.** 1994. Crystal structure of *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase: a prototypical member of the co-catalytic zinc enzyme family. *Structure* **2**: 283-291.
- **Christensen, W.B.** 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol* **52**: 461-466.
- **Christie, P.J.** 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol* **179**: 3085-3094.
- **Christie, P.J.** 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* **40**: 294-305.
- **Christie, P.J.** 2004. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 219-234.
- **Cifuentes, A., Antón, J., De Wit, R. y Rodríguez-Valera F.** 2003. Diversity of bacteria and archaea in sulphate-reducing enrichment cultures inoculated from serial dilution of *Zostera noltii* rhizosphere samples. *Environ Microbiol* **5**: 754-764.
- **Claros, M.G., y von Heijne, G.** 1994. TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *Comput Appl Biosci* **10**: 685-686.
- **Claros, M.G., Ávila, C., Gallardo, F. y Cánovas, F.M.** 2001. Bioquímica aplicada: Manual para el diseño experimental y análisis de datos en Bioquímica y Biología Molecular. Oviedo: Septem Ediciones.
- **Cline, K. y Mori, H.** 2001. Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* **154**: 719-729.
- **Coffey, A., van den Burg, B., Veltman, R. y Abee, T.** 2000. Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* **88**: 132-141.
- **Collinson, S.K., Clouthier, S.C., Doran, J.L., Banser, P.A. y Kay, W.W.** 1996. *Salmonella enteritidis* agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J Bacteriol* **178**: 662-667.
- **Coolbear, T., Eames, C.W., Casey, Y., Daniel, R.M. y Morgan, H.W.** 1991. Screening of strains identified as extremely thermophilic bacilli for extracellular proteolytic activity and general properties of the proteinases from two of the strains. *J Appl Bacteriol* **71**: 252-264.
- **Lupas, A., Van Dyke, M. y Stock, J.** 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**: 1162-1164.

- **Condemine, G. y Shevchik, V.E.** 2000. Overproduction of the secretin OutD suppresses the secretion defect of an *Erwinia chrysanthemi* outB mutant. *Microbiology* **146**: 639-647.
- **Cordone, L., Ferrand, M., Vitrano, E. y Zaccai, G.** 1999. Harmonic behaviour of trehalose coated carbon-monooxy-myoglobin at high temperature. *Biophys J* **76**: 1043-1047.
- **Coronado, M.J.** 1998. Transferencia genética en bacterias halófilas moderadas. Caracterización y clonación de una α -amilasa producida por *Halomonas meridiana*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- **Coronado, M.J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A. y Nieto, J.J.** 2000a. Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol Lett* **183**: 67-71.
- **Coronado, M.J., Vargas, C., Mellado, E., Tegos, G., Drainas, C., Nieto, J.J. y Ventosa, A.** 2000b. The α -amylase gene *amyH* of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology* **146**: 861-868.
- **Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Locht, C. y Jacob-Dubuisson, F.** 2001. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* **20**: 5040-5048.
- **Cowan, D.A., Smolenski, K.A., Daniel, R.M. y Morgan, H.W.** 1987. An extremely thermostable extracellular proteinase from a strain of the archaeobacterium *Desulfurococcus* growing at 88°C. *Biochem J* **247**: 121-133.
- **Cowan, S.T. y Steel, K.J.** 1982. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. México: C.E.C.S.A.
- **Cristóbal, S., de Gier, J.W., Nielsen, H. y von Heijne, G.** 1999. Competition between Sec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **18**: 2982-2990.
- **Crueger, W. y Crueger, A.** 1990. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates.
- **Csonka, L.N. y Epstein, W.G.** 1995. Osmoregulation. En F.C. Neidhart, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K. Brooks, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., vol I. Washington, D.C: American Society for Microbiology. pp. 1210-1223.
- **Daefler, S., Guilvout, I., Hardie, K.R., Pugsley, A.P. y Russel, M.** 1997. The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIVf1 function. *Mol Microbiol* **24**: 465-475.
- **Danson, M.J. y Hough, D.W.** 1997. The structural basis of protein halophilicity. *Comp Biochem Physiol* **117**: 307-312.

- Daraselia, N., Dernovoy, D., Tian, Y., Borodovsky, M., Tatusov, R. y Tatusova, T. 2003. Reannotation of *Shewanella oneidensis* genome. *OMICS* **7**: 171-175.
- Davail, S., Feller, G., Narinx, E. y Gerday, C. 1992. Sequence of the subtilisin-encoding gene from an antarctic psychrotroph *Bacillus* TA41. *Gene* **119**: 143-144.
- Davail, S., Feller, G., Narinx, E. y Gerday, C. 1994. Cold adaptation of proteins. Purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the antarctic psychrophile *Bacillus* TA41. *J Biol Chem* **269**: 17448-17453.
- David, V.A., Deutch, A.H., Sloma, A., Pawlyk, D., Ally, A. y Durham, D.R. 1992. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene* **112**: 107-112.
- De Bernardez, E. 2001. Protein refolding for industrial proceses. *Curr Opin Biotech* **12**: 202-207.
- De Gier, J.W., Valent, Q.A., Von Heijne, G. y Luirink, J. 1997. The *E. coli* SRP: preferences of a targeting factor. *FEBS Lett* **408**: 1-4.
- de Groot, A., Koster, M., Gerard-Vincent, M., Gerritse, G., Lazdunski, A., Tommassen, J. y Filloux, A. 2001. Exchange of Xcp (Gsp) secretion machineries between *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes*: species specificity unrelated to substrate recognition. *J Bacteriol* **183**: 959-967.
- de Keyzer, J., van der Does, C. y Driessen, A.J. 2003. The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2034-2052.
- De Ley, J. y Tijtgat, R. 1970. Evaluation of membrane filter methods for DNA-DNA hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* **36**: 461-474.
- De Toni, C.H., Richter, M.F., Chagas, J.R., Henriques, J.A. y Termignoni, C. 2002. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Can J Microbiol* **48**: 342-348.
- Dedkov, V.S., Zernov, Y.P. Rechkunova, N.I. y Degtyarev S. K. 1990. Isolation of aquatic microorganisms producing the restriction endonucleases from the Black Sea. *Mol Genetika Microbiol Virusol* **12**: 17-18.
- DeFrank, J.J. y Cheng, T.C. 1991. Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate. *J Bacteriol* **173**: 1938-1943.
- DeFrank, J.J., Beaudry, W.T., Cheng, T.C., Harvey, S.P., Stroup, A.N. y Szafraniec, L.L. 1993. Screening of halophilic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chem Biol Interact* **87**: 141-148.

- Delepelaire, P. 1994. PrtD, the integral membrane ATP-binding cassette component of the *Erwinia chrysanthemi* metalloprotease secretion system, exhibits a secretion signal-regulated ATPase activity. *J Biol Chem* **269**: 27952-27957.
- Delepelaire, P. 2004. Type I secretion in Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 149-161.
- Delepelaire, P. y Wandersman, C. 1990. Protein Secretion in Gram-negative Bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* α -hemolysin. *J Biol Chem* **265**: 17118-17125.
- Delepelaire, P. y Wandersman, C. 1991. Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the Gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **5**: 2427-2434.
- Demirjian, D.C., Moris-Varas, F. y Cassidy C.S. 2001. Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol* **5**: 144-151.
- Denner, E.B., Mark, B., Busse, H.J., Turkiewicz, M. y Lubitz, W. 2001. *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Syst Appl Microbiol* **24**: 44-53.
- Dennis, P.P. y Shimmin, L.C. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 90-104.
- Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C. y Erarslan, A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *J Appl Microbiol* **96**: 320-327.
- d'Enfert, C., Reys, I., Wandersman, C. y Pugsley, A.P. 1989. Protein secretion by gram-negative bacteria. Characterization of two membrane proteins required for pullulanase secretion by *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* **264**: 17462-17468.
- d'Enfert, C., Ryter, A. y Pugsley, A.P. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J* **6**: 3531-3538.
- Desvaux, M., Parham, N.J. y Henderson, I.R. 2004. Type V protein secretion: simplicity gone awry?. *Curr Issues Mol Biol* **6**: 111-124.
- Dillard, J.P. y Seifert, H.S. 2001. A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol* **41**: 263-277.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 7347-7351.

- Dobson, S.J. y Franzmann, P.D. 1996. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al., 1983), *Halomonas* (Vreeland et al., 1980) and *Halovibrio* (Fendrich, 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons, 1952) into a single genus, *Halomonas* and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 550-558.
- Douka, E., Christogianni, A., Koukkou, A.I., Afrenda, A. y Drainas, C. 2001. Use of a green fluorescent protein as a reporter in *Zymomonas mobilis* and *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiol Lett* **201**: 221-227.
- Dower, W.J., Miller, J.F. y Ragsdale, C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Driessen, A.J. 2001. SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* **9**: 193-196.
- Driessen, A.J., Fekkes, P., van der Wolk, J.P. 1998. The Sec system. *Curr Opin Microbiol* **1**: 216-222.
- Duckworth, A.W., Grant, W.D., Jones, B.E., Meijer, D., Márquez, M.C. y Ventosa, A. 2000. *Halomonas magadii* sp. nov., a new member of the genus *Halomonas*, isolated from a soda lake of the East African Rift Valley. *Extremophiles* **4**: 53-60.
- Duffner, F., Bertoldo, C., Andersen, J.T., Wagner, K. y Antranikian, G. 2000. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**: 6331-6338.
- Dundas, I. 1978. The normal *Halobacteriaceae*, the general physiology and taxonomy of a well-adapted and highly successful group of microorganisms. En S.R. Caplan y M. Ginzburg (eds.), *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*. Amsterdam: Elsevier. pp. 641-651.
- Duong, F., Bonnet, E., Geli, V., Lazdunski, A., Murgier, M. y Filloux A. 2001. The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* **262**: 147-153.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J.N. y Filloux, A. 2003. Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* **185**: 2749-2758.
- Durham, D.R., Stewart, D.B. y Stellwag, E.J. 1987. Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J Bacteriol* **169**: 2762-2768.
- Dussault, H.P. 1955. An improved technique for staining halophilic bacteria. *J Bacteriol* **70**: 484-485.
- Economou, A. 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**: 315-320.
- Economou, A. 2002. Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions. *Mol Membr Biol* **19**: 159-169.
- Edgerton, M.E. y Brimblecome, P. 1981. Thermodynamics of halobacterial environment. *Can J Microbiol* **27**: 899-909.

- **Edman, P y Begg, G.** 1967. A protein sequenator. *Eur J Biochem***1**: 80-91.
- **Egan, S., James, S., Holmstrom, C. y Kjelleberg, S.** 2002. Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environ Microbiol***4**: 433-442.
- **Eichler, J.** 2003. Evolution of the prokaryotic protein translocation complex: a comparison of archaeal and bacterial versions of SecDF. *Mol Phylogenet Evol***27**: 504-509.
- **Eisenberg, H.** 1995. Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys***318**: 1-5.
- **Eisenberg, H. y Watchel, E.J.** 1987. Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu Rev Biophys Chem***16**: 69-92.
- **Elsztein, C., Herrera Seitz, M.K., Sánchez, J.J. y de Castro, R.E.** 2001. Autoproteolytic activation of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus* extracellular serine protease. *J Basic Microbiol***41**: 319-327.
- **Enger, O., Nygaard, H., Solberg, M., Schei, G. y Nielsen J.** 1987. Characterization of *Alteromonas denitrificans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol***37**: 416-421.
- **Espinosa, A. y Alfaro, J.R.** 2004. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol***6**: 1027-1040.
- **Farizo, K.M., Huang, T. y Burns, D.L.** 2000. Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun***68**: 4049-4054.
- **Fedosov, Y.V., Mikhailov, V.V., Zhigalina, I.I., Ivanova, E.P., Kozhemyako, V.B., Onoprienko, N.B., Rasskazov, V.A. y Elyakov, G.B.** 1991. Highly active alkaline phosphatase from marine bacterium. *Dokl AN SSSR***320**: 485-487.
- **Feinberg, A.O. y Volgelstein, B.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem***132**: 6-10.
- **Fendrich, C.** 1988. *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Syst Appl Microbiol***11**: 36-43.
- **Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol***17**: 368-376
- **Ferragut, C. y Leclerc, H.** 1976. Etude comparative des méthodes de détermination du T_m de l'ADN bactérien. *Ann Microbiol***127**: 223-235.
- **Filloux, A.** 2004. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta***1694**: 163-179.

- Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J. y Lazdunski, A. 1990. Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *EMBO J* **9**: 4323-4329.
- Filloux, A., Michel, G. y Bally, M. 1998. GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 177-198.
- Fitzgerald, P.M., McKeever, B.M., VanMiddlesworth, J.F., Springer, J.P., Heimbach, J.C., Leu, C.T., Herber, W.K., Dixon, R.A. y Darke, P.L. 1990. Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type I protease and acetyl-pepstatin at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* **265**: 14209-14219.
- Flannery, W.L. 1956. Current status of knowledge of halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **20**: 49-66.
- Forsyth, M.P. y Kushner, D.J. 1970. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Can J Microbiol* **13**: 142-147.
- Foultier, B., Troisfontaines, P., Vertommen, D., Marenne, M.N., Rider, M., Parsot, C. y Cornelis, G.R. 2003. Identification of substrates and chaperone from the *Yersinia enterocolitica* 1B Ysa type III secretion system. *Infect Immun* **71**: 242-253.
- Franzmann, P.D., Bruton, H.R. y Mcmeekin, T.A. 1987. *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 27-34.
- Friedrich, A.B. y Antranikian, G. 1996. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2875-2882.
- Frings, E., Sauer, T. y Galinski, E.A. 1995. Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *J Biotechnol* **43**: 53-61.
- Frillingos, S., Linden, A., Niehaus, F., Vargas, C., Nieto, J.J., Ventosa, A., Antranikian, G. y Drinas, C. 2000. Cloning and expression of α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *J Appl Microbiol* **88**: 495-503.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J.L., Meverch, M. y Shoham, M. 1996. Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat Struct Biol* **3**: 452-458.
- Fujiwara, N., Masui, A. y Imanaka, T. 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. *J Biotechnol* **30**: 245-256.
- Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M. y Nishikawa, K. 2003. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *J Mol Biol* **327**: 347-357.
- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A. y Usami, R. 2005. Organic solvent tolerance of halophilic amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles* **9**: 85-89.

- **Fulton, M., Halkias, D. y Yarashus, D.A.** 1960. Voges-Proskauer test using α -naphthol purified by steam distillation. *Appl Microbiol* **8**: 361-363.
- **Fusek, M., Lin, X.L. y Tang, J.** 1990. Enzymic properties of thermopsin. *J Biol Chem* **265**: 1496-1501.
- **Gavrilovic, L., O'Brien, R.W. y Sanders R. L.** 1982. Secretion of amylase by the marine bacterium *Alteromonas rubra*. *Aust J Biol Sci* **35**: 111-124.
- **Galinski, E.A y Tindall B.J.** 1992. Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. En R.D. Herbert y R.J. Sharp (eds.), *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. London: Blackie. pp. 76-114.
- **Galinski, E.A.** 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction. Stress protection. *Experientia* **49**: 487-495.
- **Galinski, E.A.** 1995. Osmoadaptation in bacteria. En R.K. Poole (ed.), *Advances in Microbial Physiology*. London: Academic Press. pp. 273-329.
- **Galinski, E.A. y Lippert, K.** 1991. Novel compatible solutes and their potential application as stabilizers in enzyme technology. En F. Rodríguez-Valera (ed.), *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. New York: Plenum Press. pp. 351-358.
- **Galinski, E.A. y Trüper, H.G.** 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95-108.
- **Galinski, E.A., Beckmann, M., Kunte, J. y Severin, J.** 1997. Patent DE19622168.
- **Gandbhir, M., Rasched, I., Marliere, P. y Mutzel, R.** 1995. Convergent evolution of amino acid usage in archaeobacterial and eubacterial lineages adapted to high salt. *Res Microbiol* **146**: 113-120.
- **Garabito, M.J., Arahall, D.R., Mellado, E., Márquez, M.C. y Ventosa, A.** 1997. *Bacillus salexigens* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species. *Int J Syst Bacteriol* **47**:735-741.
- **García de la Paz, A.M., Pérez Martínez, A., Calvo Sáinz, C. y Ramos-Cormenzana, A.** 1989. Isolation and characterization of bacteriophages active on moderately halophilic microorganisms. En M.S. Da Costa, J. C. Duarte y R.A.D. Willians (eds.), *Microbiology of Extreme Environments and its Potential for Biotechnology*. London: Elsevier. p. 425.
- **García-González, O., García, R.M., de la Garza, M., Vaca, S., Paniagua. G.L., Mejía, R., Tenorio, V.R. y Negrete-Abascal, E.** 2004. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expression. *FEMS Microbiol Lett* **234**: 81-86.
- **García, M.T., Gallego, V., Ventosa, A. y Mellado, E.** 2005a. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. *Int J Syst Ecol Microbiol* (en prensa).
- **García, M.T., Mellado, E., Ostos, J.C. y Ventosa, A.** 2004. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:1723-1728.

- **García, M.T., Ventosa, A. y Mellado, E.** 2005b. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* (en prensa).
- **García, M.T., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. y Kocur, M.** 1987. Taxonomy study and amended description of *Vibrio costicola*. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 251-256.
- **Gardy, J.L., Laird, M.R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C.J., Ester, M. y Brinkman F.S.L.** 2005. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* **21**: 617-623.
- **Gauthier, M.J.** 1976a. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **26**: 459-466.
- **Gauthier, M.J.** 1976b. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of some violet-pigmented bacteria isolated from seawater. *Can J Microbiol.* **22**:138-149.
- **Gauthier, M.J.** 1977. *Alteromonas citrea*, a new Gram-negative, yellow-pigmented species from seawater. *Int J Syst Bacteriol* **27**: 349-354.
- **Gauthier, M.J.** 1982. Validation of the name *Alteromonas luteoviolacea*. *Int J Syst Bacteriol* **32**: 82-86.
- **Gauthier, M.J., y Breittmayer V.A.** 1979. A new antibiotic-producing bacterium from seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **29**: 366-372.
- **Gauthier, G., Gauthier, M., y Christen, R.** 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 755-761.
- **Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. y Bertrand, J.C.** 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 568-576.
- **Genin, S. y Boucher, C.A.** 1994. A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in Gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol Gen Genet* **243**: 112-118.
- **Georgiou, G. y Valax, P.** 1999. Isolating inclusion bodies from Bacteria. *Methods Enzymol* **309**: 48-59.
- **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795.
- **Gibbs, M.D., Reeves, R.A. y Bergquist, P.L.** 1995. Cloning, sequencing, and expression of a xylanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 and activity of the enzyme on fiber-bound substrate. *Appl Environ Microbiol* **61**: 4403-4408.

- **Giménez, M.I., Studdert, C.A., Sánchez, J.J. y De Castro, R.E.** 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles* **4**: 181-188.
- **Gilboa, R., Greenblatt, H.M., Perach, M., Spungin-Bialik, A., Lessel, U., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Blumberg, S. y Shoham, G.** 2000. Interactions of *Streptomyces griseus* aminopeptidase with a methionine product analogue: a structural study at 1.53 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 551-558.
- **Gilboa, R., Spungin-Bialik, A., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Blumberg, S. y Shoham G.** 2001. Interactions of *Streptomyces griseus* aminopeptidase with amino acid reaction products and their implications toward a catalytic mechanism. *Proteins* **44**: 490-504.
- **Gilmour, D.** 1990. Halotolerant and halophilic microorganisms. En C. Edwards (ed.), *Microbiology of Extreme Environments*. Milton Keynes: Open University Press. pp. 147-177.
- **Goebel, W. y Hedgpeth, J.** 1982. Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **151**: 1290-1298.
- **Göller, K., Ofer, A. y Galinski, E.A.** 1998. Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 293-300.
- **González, C. y Gutiérrez, C.** 1970. Presence of lipase among species of extremely halophilic bacteria. *Can J Microbiol* **16**: 1165-1166.
- **González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R. y Amils, R.** 2003. Microbial ecology of an extremely acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4853-4865.
- **Good, W.A. y Hartman, P.A.** 1970. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **104**: 601-603.
- **Gopna, U., Ron, E.Z. y Graur, D.** 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- **Grammann, K., Volke, A. y Kunte, H.J.** 2002. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J Bacteriol* **184**: 3078-3085.
- **Grant, W.D., Gemmell, R.T. y McGenity, T.J.** 1998. Halophiles. En K. Horikoshi y W.D. Grant (eds.), *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environment*. New York: Wiley-Liss. pp. 93-132.
- **Grant, W.D. y Ross, H.N.** 1986. The ecology and taxonomy of halobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 9-15.
- **Grant, W.D. y Tindall, B.J.** 1986. The alkaline saline environment. En G.A. Codd y R.A. Herbert (eds.), *Microorganisms in Extreme Environments*. New York: Academic Press. pp. 24-25.
- **Grass, S. y St Geme, J.W. 3rd.** 2000. Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. *Mol Microbiol* **36**: 55-67.

- Greenblatt, H.M., Almog, O., Maras, B., Spungin-Bialik, A., Barra, D., Blumberg, S. y Shoham, G. 1997. *Streptomyces griseus* aminopeptidase: X-ray crystallographic structure at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* **265**: 620-636.
- Gregor, D. y Pfeifer, F. 2001. Use of a halobacterial *bgaH* reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. *Microbiology* **147**: 1745-1754.
- Guedin, S., Willery, E., Locht, C. y Jacob-Dubuisson, F. 1998. Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **29**: 763-774.
- Guenet, C., Lepage, P. y Harris, B.A. 1992. Isolation of the leucine aminopeptidase gene from *Aeromonas proteolytica*. Evidence for an enzyme precursor. *J Biol Chem* **267**: 8390-8395.
- Guex, N. y Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Hoog, S. y Plemenitas, A. 2000. Hypersaline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 235-240.
- Gupta, R., Beg, Q.K. y Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 15-32.
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R.X. y Khan, S. 1999. Bleach-stable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett* **21**: 135-138.
- Gutell, R.R., Weiser, B., Woese, C.R. y Noller, H.F. 1985. Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **32**: 155-216.
- Guzzo, J., Duong, F., Wandersman, C., Mugier, M. y Lazdunski, A. 1991a. The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* α -haemolysin. *Mol Microbiol* **5**: 447-453.
- Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A. y Murgier, M. 1991b. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* **173**: 5290-5297.
- Gray, L., Mackman, N., Nicaud, J.M. y Holland, I.B. 1986. The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **205**: 127-133.
- Ha, J.C., Kim, G.T., Kim, S.K., Oh, T.K., Yu, J.H. y Kong, I.S. 1997. β -Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity. *Biotechnol Appl Biochem* **26**: 1-6.
- Hales, L.M. y Suman, H.A. 1999. *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect Immun* **67**: 3662-3666.

- **Haller, J.C., Carlson, S., Pederson, K.J. y Pierson, D.E.** 2000. A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol Microbiol* **36**: 1436-1446.
- **Hamilton, C.M., Lee, H., Li, P.L., Cook, D.M., Piper, K.R., von Bodman, S.B., Lanka, E., Ream, W. y Farrand, S.K.** 2000. TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J Bacteriol* **182**: 1541-1548.
- **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- **Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En D.M. Glover (ed.), DNA Cloning; a Practical Approach. Oxford: IRL Press. pp. 109-135.
- **Hao, M.V., Kocur, M. y Komagata, K.** 1984. *Marinococcus* gen. nov., a new genus for motile cocci with meso-diaminopimelic acid in the cell wall; and *Marinococcus albus* sp. nov. and *Marinococcus halophilus* (Novitsky and Kushner) comb. nov. *J. Gen Appl Microbiol* **30**: 449-459.
- **Hardie, K.R., Lory, S. y Pugsley, A.P.** 1996a. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J* **15**: 978-988.
- **Hardie, K.R., Seydel, A., Guilvout, I. y Pugsley, A.P.** 1996b. The secretin-specific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions. *Mol Microbiol* **22**: 967-976.
- **Harold, C.N. y Heppel, L.A.** 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem* **240**: 3685-3692.
- **Hase, C.C. y Finkelstein, R.A.** 1991. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J Bacteriol* **173**: 3311-3317.
- **Hastings, E.G.** 1903. Milchagar als medium zur demonstration der erzeugung proteolitischer enzyme. *Zentbl Bakt Parasit Abt II* **10**: 384-387.
- **Hatada, Y., Saito, K., Hagihara, H., Ozaki, K. y Ito, S.** 2001. Nucleotide and deduced amino acid sequences of an alkaline pullulanase from the alkaliphilic bacterium *Bacillus* sp. KSM-1876. *Biochim Biophys Acta* **1545**: 367-371.
- **Hayes, V.E., Ternan, N.G. y McMullan, G.** 2000. Organophosphonate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 171-175.
- **Hebert, A.M. y Vreeland, R.H.** 1987. Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 347-350.
- **Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D. y Staley, J.T.** 2001. *Marinobacter* strain NCE312 has a *Pseudomonas*-like naphthalene dioxygenase. *FEMS Microbiol Lett* **201**: 47-51.

- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C. y Fraser, C.M. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477-483.
- Henderson, I.R., Capello, R. y Nataro, J.P. 2000. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *Trends Microbiol* **8**: 529-532.
- Henderson, I.R. y Lam, A.C. 2001. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.-autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol* **9**: 573-578.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. y Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F. y Nataro, J.P. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**: 370-378.
- Heussen, C. y Dowdle, E.B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrilamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* **102**: 196-202.
- Heyrman, J., Logan, N.A., Busse, H.J., Balcaen, A., Lebbe, L., Rodríguez-Díaz, M., Swings, J. y De Vos, P. 2003. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three new species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus* as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigenes* comb. nov. and emended description of the genus *Virgibacillus* *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 501-511.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Hinteregger, C. y Streichsbier, F. 1997. *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. *Biotech Lett* **19**: 1099-1102.
- Hiraga, K., Nishikata, Y., Namwong, S., Tanasupawat, S., Takada, K. y Oda, K. 2005. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 38-44.
- Hirokawa, T., Seah, B.C. y Mitaku, S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane protein. *Bioinformatics* **14**: 378-379.
- Hogrefe, H.H., Hansen, C.J., Scott, B.R. y Nielson, K.B. 2002. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 596-601.
- Hoiczyk, E. y Blobel, G. 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4669-4674.

- Hoiczuk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A. y Heesemann, J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989-5999.
- Holmes, M.L. y Dyll-Smith, M.L. 2000. Sequence and expression of a halobacterial β -galactosidase gene. *Mol Microbiol* **36**: 114-122.
- Holmes, P.K. y Halvorson, H.O. 1965. properties of a purified halophilic malic dehydrogenase. *J Bacteriol* **90**: 316-326.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197.
- Holmes, M.L., Scopes, R.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Englert, C., Pfeifer, F. y Dyll-Smith, M.L. 1997. Purification and analysis of an extremely halophilic β -galactosidase from *Haloflex alicantei*. *Biochim Biophys Acta* **1337**: 276-286.
- Holz, R.C., Bzymek, K.P. y Swierczek, S.I. 2003. Co-catalytic metallopeptidases as pharmaceutical targets. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 197-206.
- Honh, B. y Collins, J. 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragment. *Gene* **11**: 291-298.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. *Agri Biol Chem* **35**: 1407-1414.
- Horikoshi, K. y Grant, W.D. (eds.) 1998. Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments. New-York: Wiley-Liss.
- Hou, S., Saw, J.H., Lee, K.S., Freitas, T.A., Belisle, C., Kawarabayasi, Y., Donachie, S.P., Pikina, A., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Omelchenko, M.V., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Li, Q.X., Keum, Y.S., Campbell, S., Denery, J., Aizawa, S., Shibata, S., Malahoff, A. y Alam, M. 2004. Genome sequence of the deep-sea γ -proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 18036-18041.
- Howard, S.P., Meiklejohn, H.G., Shivak, D. y Jahagirdar, R. 1996. A TonB-like protein and a novel membrane protein containing an ATP-binding cassette function together in exotoxin secretion. *Mol Microbiol* **22**: 595-604.
- Hoyoux, H., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., François, J.M., Baise, E., Feller, G. y Gerday, C. 2001. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1529-1535.
- Huang, C.H., García, J.L., Patel, B.K.C., Cayol, J.L., Baresi, L. y Mah, R.A. 2000. *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis* subsp. nov., a halotolerant facultative anaerobe from Death Valley, and emended description of *Salinivibrio costicola*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 615-622.

- Huang, Q., Peng, Y., Li, X., Wang, H. y Zhang, Y. 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr Microbiol* **46**: 169-173.
- Hutadilok-Towatana, N., Painupong, A. y Suntainalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. PS719. *J Biosci Bioeng* **87**: 581-587.
- Huu, N.B., Denner, E.B., Ha, D.T., Wanner, G. y Stan-Lotter, H. 1999. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 367-375.
- Huval, J.H., Latta, R., Wallace, R., Kushner, D.J. y Vreeland, R.H. 1995. Description of two new species of *Halomonas*: *Halomonas israelensis* sp. nov. and *Halomonas canadensis* sp. nov. *Can J Microbiol* **41**: 1124-1131.
- Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G. y Nedkov, P. 1999. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can J Microbiol* **45**: 217-222.
- Inhoff, J.F., Sahl, H.G., Soliman, G.S. y Trüper, H.G. 1979. The Wadi Natrun: Chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiology* **1**: 219-234.
- International Union of Biochemistry. 1992, Enzyme Nomenclature. Orlando: Academic Press,.
- Inouye, M. 1991. Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. *Enzyme* **45**: 314-321.
- Ishikawa, K., Ishida, H., Matsui, I., Kawarabayasi, Y. y Kikuchi, H. 2001. Novel bifunctional hyperthermostable carboxypeptidase/aminoacylase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Appl Environ Microbiol* **67**: 673-679.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S. y Hatada, Y. 1998. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles* **2**: 185-190.
- Ivanova, E.P., Karyakin, A.A., Zhigalina, I.I., Mikhailov, V.V., Fedosov, Y.V., Rasskazov, V.A. y Elyakov, G.B. 1991. Optimization of nutrient medium for marine bacterium produced alkaline phosphatase. *Mikrobiol Zhurnal* **53**: 46-50.
- Ivanova, E.P. y Mikhailov, V.V. 1992a. Microorganism-associates of the mussel of *Crenomytilus grayanus* and their hydrolytical activities. *Mikrobiologiya* **61**: 514-519.
- Ivanova, E.P., Romanenko, L.A., Matte, M.H., Matte, G.R., Lysenko, A.M., Simidu, U., Kita-Tsukamoto, K., Sawabe, T., Vysotskii, M.V., Frolova, G.M., Mikhailov, V., Christen, R. y Colwell, R.R. 2001. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1071-1078.

- Ivanova, E.P., Sawabe, T., Alexeeva, Y.V., Lysenko, A.M., Gorshkova, N.M., Hayashi, K., Zukova, N.V., Christen, R. y Mikhailov, V.V. 2002a. *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 229-234.
- Ivanova, E.P., Sawabe, T., Lysenko, A.M., Gorshkova, N.M., Svetashev, V.I., Nicolau, D.V., Yumoto, N., Taguchi, T., Yoshikawa, S., Christen, R.Y. y Mikhailov, V.V. 2002b. *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov., isolated from marine invertebrates. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 235-240.
- Ivanova, E.P., Zhukova, N.V., Svetashev, V.I., Gorshkova, N.M., Kurilenko, V.V., Frolova, G.M. y Mikhailov, V.V. 2000. Evaluation of phospholipid and fatty acid compositions as chemotaxonomic markers of *Alteromonas*-like proteobacteria. *Curr Microbiol* **41**: 341-345.
- Iwobi, A., Heesemann, J., Garcia, E., Igwe, E., Noelting, C. y Rakin, A. 2003. Novel virulence-associated type II secretion system unique to high-pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **71**: 1872-9187.
- Izotova, L.S., Strongin, A.Y., Chekulaeva, L.N., Sterkin, V.E., Ostoslavskaya, V.I., Lyublinskaya, L.A., Timokhina, E.A. y Stepanov, V.M. 1983. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **155**: 826-830.
- Izawa, N. y Hayashi, K. 1996. Cloning and nucleotide sequencing of the aminopeptidase gene from *Aeromonas caviae* T-64. *J Ferment Bioeng* **82**: 544-548.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. y Antoine, R. 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**: 306-313.
- Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Willery, E., Renaud-Mongenier, G. y Locht, C. 1997. Lack of functional complementation between *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and *Proteus mirabilis* HpmA hemolysin secretion machineries. *J Bacteriol* **179**: 775-783.
- Jacob-Dubuisson, F., Striker, R. y Hultgren, S.J. 1994. Chaperone-assisted self-assembly of pili independent of cellular energy. *J Biol Chem* **269**: 12447-12455.
- Jacobson, J.W., Glick, J.L. y Madello, K.L. 1985. US Patent 4540506.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. y Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 29-63.
- James, S.R., Dobson, S.J., Franzmann, P.D. y Mcmeekin, T.A. 1990. *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes. *Syst Appl Microbiol* **13**: 270-278.
- Jang, H.J., Kim, B.C., Pyun, Y.R. y Kim, Y.S. 2002a. A novel subtilisin-like serine protease from *Thermoanaerobacter yonseiensis* KB-1: its cloning, expression, and biochemical properties. *Extremophiles* **6**: 233-243.

- Jang, H.J., Lee, C.H., Lee, W. y Kim, Y.S. 2002b Two flexible loops in subtilisin-like thermophilic protease, thermicin, from *Thermoanaerobacter yonseiensis*. *J Biochem Mol Biol* **35**: 498-507.
- Jankiewicz, U. y Bielawski, W. 2003. The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta Microbiol Pol* **52**: 217-231.
- Jarchau, T., Chakraborty, T., García, F. y Goebel, W. 1994. Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA. *Mol Gen Genet* **245**: 53-60.
- Javor, B.J. 1989. (ed.), Hipersaline Environments. Microbiology and Biogeochemistry. Berlin: Springer-Verlag.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**: 403-405.
- Jeffries, C.D., Holtman, D.F. y Guse, D.G. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* **73**: 590-591.
- Jeong, K.C., Jeong, H.S., Rhee, J.H., Lee, S.E., Chung, S.S., Starks, A.M., Escudero, G.M., Gulig, P.A. y Choi, S.H. 2000. Construction and phenotypic evaluation of a *Vibrio vulnificus* vvpE mutant for elastolytic protease. *Infect Immun* **68**: 5096-5106.
- Jiang, B. y Howard, S.P. 1994. The *Aeromonas hydrophila* *exeE* gene, required both for protein secretion and normal outer membrane biogenesis a member of a general secretion pathway. *Mol Microbiol* **6**: 1351-1361.
- Jobin, M.C., Martínez, G., Motard, J., Gottschalk, M. y Grenier, D. 2005. Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *J Bacteriol* **187**: 795-799.
- Johnson, J.L. 1981. Genetic characterization. En P Gerhardt (ed.), *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington, D.C: American Society for Microbiology. pp. 450-472.
- Johnvesly, B. y Naik, G.R. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem* **37**: 139-144.
- Johnvesly, B., Manjunath, B.R. y Naik, G.R. 2002. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresource Technol* **82**: 61-64.
- Jones, B.E. 2003. Industrial enzymes: Do halophiles and alkalophiles have a role to play?. En A. Ventosa (ed.), *Halophilic Microorganisms*. Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 275-284.

- Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W. y Owenson, G.G. 1998. Microbial diversity in soda lakes. *Extremophiles* **2**: 191-200.
- Jongeneel, C.V., Bouvier, J. y Bairoch, A. 1989. A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett* **242**: 211-214.
- Joo, W.A. y Kim, C.W. 2005. Proteomics of halophilic archaea. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **815**: 237-250.
- Jose, J., Jahnig, F. y Meyer, T.F. 1995. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* **18**: 378-380.
- Jukes, T.H. y Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. En H.N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press. pp. 21-132.
- Kagami, Y., Ratliff, M., Surber, M., Martinez, A. y Nunn, D.N. 1998. Type II protein secretion by *Pseudomonas aeruginosa*: genetic suppression of a conditional mutation in the pilin-like component XcpT by the cytoplasmic component XcpR. *Mol Microbiol* **27**: 221-233.
- Kamekura, M. 1986. Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 145-150.
- Kamekura, M. 1995. Halophilic proteases from halophilic archaea. En F.T. Robb y A.R. Place (eds.), *Archaea. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 89-93.
- Kamekura, M. y Onishi, H. 1974a. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. *J Bacteriol* **119**: 339-344.
- Kamekura, M. y Onishi, H. 1974b. Protease formation by a moderately halophilic *Bacillus* strain. *Appl Microbiol* **27**: 809-810.
- Kamekura, M. y Onishi, H. 1976. Effect of magnesium and some nutrients on the growth and nuclease formation of a moderate halophile, *Micrococcus varians* var. *halophilus*. *Can J Microbiol* **22**: 1567-1576.
- Kamekura, M. y Onishi, H. 1978a. Properties of the halophilic nuclease of a moderate halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. *J Bacteriol* **133**: 59-65.
- Kamekura, M. y Onishi, H. 1978b. Flocculation and adsorption of enzymes during growth of a moderate halophile, *Micrococcus varians* var. *halophilus*. *Can J Microbiol* **24**: 703-709.
- Kamekura, M. y Onishi, H. 1979. A medium for commercial production of the halophilic *Micrococcus* nuclease. *Can J Microbiol* **25**: 1113-1116.
- Kamekura, M. y Onishi, H. 1983. Inactivation of nuclease H of the moderate halophile *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* during cultivation in the presence of salting-in-type salts. *Can J Microbiol* **29**: 46-51.

- Kamekura, M. y Seno, Y. 1990. A halophilic extracellular protease from a halophilic archaeobacterium strain 172 P1. *Biochem Cell Biol* **68**: 352-359.
- Kamekura, M., Hamakawa, T. y Onishi, H. 1982. Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol* **44**: 994-995.
- Kamekura, M., Seno, Y. y Dyll-Smith, M. 1996. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: gene cloning, expresión and structural studies. *Biochim Biophys Acta* **1294**: 159-167.
- Kamekura, M., Seno, Y., Holmes, M.L. y Dyll-Smith, M.L. 1992. Molecular cloning and sequencing of the gene for a halophilic alkaline serine protease (halolysin) from an unidentified halophilic archaea strain (172P1) and expresión of the gene in *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol* **174**: 736-742.
- Knauf, V.C. y Nester, E.W. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* **8**: 45-54.
- Kanekar, P.P., Nilegaonkar, S.S., Sarnaik, S.S. y Kelkar, A.S. 2002. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. *Bioresour Technol* **85**: 87-93.
- Kang, B.S., Jeon, S.J., y Kim, Y.M. 1999. Purification and characterization of two extracellular proteases from *Oligotropha carboxydovorans* DSM 1227. *J Microbiol* **37**: 14-20.
- Kannan, Y., Koga, Y., Inoue, Y., Haruki, M., Takagi, M., Imanaka, T., Morikawa, M. y Kanaya S. 2001. Active subtilisin-like protease from a hyperthermophilic archaeon in a form with a putative prosequence. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2445-2452.
- Karlyshev, A.V. y MacIntyre, S. 1995. Cloning and study of the genetic organization of the exe gene cluster of *Aeromonas salmonicida*. *Gene* **158**: 77-82.
- Kashiwabara, S., Ogawa, S., Miyoshi, N., Oda, M. y Suzuki, Y. 1999. Three domains comprised in thermostable molecular weight 54,000 pullulanase of type I from *Bacillus flavocaldarius* KP1228. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 1736-1748.
- Kato, C. y Takai, K. 2000. Microbial diversity of deep-sea extremophiles-piezophiles, hiperthermophiles, and subsurface microorganisms. *Biol Sci Space* **14**: 341-352.
- Kato, T., Yamagata, Y., Arai, T. y Ichishima, E. 1992. Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* (natto) and elucidation of its distinct mode of action. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 1166-1168.
- Khasin, A., Alchanati, I. y Shoham, Y. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1725-1730.
- Kanechida, K. 2000. US Patent 6080689.

- **Kaye, J.-Z. y Baross, J.A.** 2000. High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 249-260.
- **Kaye, J.Z., Márquez, M.C., Ventosa, A. y Barros, J.A.** 2004. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 499-511.
- **Kawakami, K., Toma, C. y Honma, Y.** 2000. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular metalloprotease of *Aeromonas caviae*. *Microbiol Immunol* **44**: 341-347.
- **Kazmierczak, B.I., Mielke, D.L., Russel, M. y Model, P.** 1994. pIV, a filamentous phage protein that mediates phage export across the bacterial cell envelope, forms a multimer. *J Mol Biol* **238**: 187-198.
- **Khan, A.R. y James, M.N.** 1998. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* **7**: 815-836.
- **Kirk, O., Borchert, T.V. y Fuglsang, C.C.** 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 345-351.
- **Kulakova, L., Galkin, A., Kurihara, T., Yoshimura, T. y Esaki, N.** 1999. Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol* **65**: 611-617.
- **Kenny, A.J.** 1999. Introduction: Nomenclature and Classes of Peptidases. En E.E. Sterchi y W. Stöcker (eds.), *Proteolytic Enzymes*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. pp. 1-8.
- **Kerr, J.R. y Matthews, R.C.** 2000. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 77-88.
- **Kessler, E. y Ohman D.E.** 1998. Pseudolysin. En A.J., Barrett, N.D. Rawlings, y J.F. Woessner (eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (CD-ROM). Chapter 357. London: Academic Press.
- **Kessler, E., Safrin, M., Gustin, J.K. y Ohman, D.E.** 1998. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J Biol Chem* **273**: 30225-30231.
- **Khire, J.M.** 1994. Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt pan. *Lett Appl Microbiol* **19**: 210-212.
- **Kim, Y.J.** 2004. The influence of NaCl and carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone on the production of extracellular proteases in a marine *Vibrio* strain. *J Microbiol* **42**:156-159.
- **Kim, J. y Kendall, D.A.** 2000. Sec-dependent protein export and the involvement of the molecular chaperone SecB. *Cell Stress Chaperones* **5**: 267-275.
- **Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I. y Lee, S.** 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2482-2488.

- Kim, Y.K., Bae, J.H., Oh, B.K., Lee, W.H. y Choi, J.W. 2002. Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process. *Bioresour Technol* **82**: 157-164.
- Kirk, O., Borchert, T.V. y Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 345-351.
- Kleinsteuber, S., Muller, R.H. y Babel, W. 2001. Expression of the 2,4-D degradative pathway of pJP4 in an alkaliphilic, moderately halophilic soda lake isolate, *Halomonas* sp. EF43. *Extremophiles* **5**: 375-384.
- Klingeberg, M., Galunsky, B., Sjöholm, C., Kasche, V. y Antranikian, G. 1995. Purification and properties of a highly thermostable, sodium dodecyl sulfate-resistant and stereospecific proteinase from the extremely thermophilic archaeon *Thermococcus stetteri*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3098-3104.
- Kluge, A.G. y Farris, F.S. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool* **18**: 1-32.
- Knapp, S., Ladenstein, R. y Galinski, E.A. 1999. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**: 191-198.
- Knauf, V.C. y Nester, E.W. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* **8**: 45-54.
- Kobayashi, T., Kamekura, M., Kanlayakrit, W. y Onishi, H. 1986. Production, purification and characterization of an amylase of the moderate halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. *Microbios* **46**: 165-170.
- Kobayashi, H., Takaki, Y., Kobata, K., Takami, H. y Inoue, A. 1998. Characterization of α -maltotetraohydrolase produced by *Pseudomonas* sp. MS300 isolated from the deepest site of the mariana trench. *Extremophiles* **2**: 401-407.
- Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S., Hitomi, J., Yoshimatsu, T., Koike, K., Kawai, S. y Ito, S. 1995. Purification and properties of an alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. KSM-K16. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 473-481.
- Kobayashi, T., Hakamada, Y., Hitomi, J., Koike, K. y Ito, S. 1996. Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 63-71.
- Kobayashi, T., Kanai, H., Aono, R., Horikoshi, K. y Kudo, T. 1994. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the α -amylase gene from the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus* sp. strain Ah-36. *J Bacteriol* **176**: 5131-5134.
- Kobayashi, T., Kanai, H., Hayashi, T., Akiba, T., Akaboshi, R. y Horikoshi K. 1992. Haloalkaliphilic maltotriose-forming α -amylase from the archaebacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36. *J Bacteriol* **174**: 3439-3444.

- Kobayashi, T., Kimura, B. y Fujii, T. 2000a. Strictly anaerobic halophiles isolated from canned Swedish fermented herrings (Surstromming). *Int J Food Microbiol* **54**: 81-89.
- Kobayashi, T., Kimura, B. y Fujii, T. 2000b. Differentiation of *Tetragenococcus* populations occurring in products and manufacturing processes of puffer fish ovaries fermented with rice-bran. *Int J Food Microbiol* **56**: 211-218.
- Koebnik, R., Locher, K.P. y Van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**: 239-253.
- Kogut, M., Mason, J.R. y Russell, N.J. 1992. Isolation of salt-sensitive mutants of the moderately halophilic eubacterium *Vibrio costicola*. *Curr Microbiol* **24**: 325-328.
- Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M. y Gejyo, F. 1999. The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a protein inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**: 313-321.
- Koneman, E.W., Allen, D.S., Dowell, V.R. y Sommers, H.M. (eds.). 1983 Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires: Panamericana.
- Konninger, U.W., Hobbie, S., Benz, R. y Braun, V. 1999. The haemolysin-secreting ShlB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShlB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Mol Microbiol* **32**: 1212-1225.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. y Hughes, C. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**: 914-919.
- Koser, S.A. 1923. Utilization of the salt of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol* **8**: 493-520.
- Kothary, M.H. y Kreger, A.S. 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **50**: 534-540.
- Kouker, G. y Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. *Appl Environ Microbiol* **53**: 211-213.
- Kovacs, N. 1928. Eine vereinfachte methods zum nachwers der indolbildung durch bakterien. *Z Inmuforsch* **55**: 311-314.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by oxidase reaction. *Nature* **178**: 703-704.
- Kressler, B., de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. 1992. A general system to integrate *lacZ* fusion into the chromosome of Gram negative bacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.

- Kuehn, M.J., Heuser, J., Normark, S. y Hultgren, S.J. 1992. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* **356**: 252-255.
- Kumar, C.G. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett Appl Microbiol* **34**: 13-17.
- Kumar, C.G. y Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biol Adv* **17**: 561-594.
- Kundrya, V.A. y Simonenko, I.A. 1994. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 505-509.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J Gen Physiol* **30**: 291-310.
- Kunte, H.J. y Galinski, E.A. 1995. Transposon mutagénesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata*. *FEMS Microbiol Lett* **128**: 293-299.
- Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En D.J. Kushner (ed.), *Microbial Life in Extreme Environments*. London: Academic Press. pp. 317-368.
- Kushner, D.J. 1985. The *Halobacteriaceae*. En C.R. Woese y R.S. Wolfe (eds.), *The Bacteria*, vol. 8. London: Academic Press. pp. 171-214.
- Kushner, D.J. 1989. Halophilic bacteria: life in and out salt. En T. Hattori, Y. Ishida, Y. Maruyama, R.Y. Morita, y A. Uhida, (eds.), *Recent Advances in Microbial Ecology*. Tokyo: Japan Scientific Society Press. pp. 60-64.
- Kushner, D.J. 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria. En R.H. Vreeland y L.I. Hochstein (eds.), *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 87-103.
- Kushner, D.J. y Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. En F. Rodríguez-Varela (ed.), *Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 109-138.
- Ladant, D. y Ullmann, A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**: 172-176.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, E.M., Chesnokova, O., Banta, L.M. y Kado, C.I. 2000. Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **182**: 3705-3716.
- Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A. y Nicolaus, B. 2004. Purification and characterization of thermostable xylanase and beta-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Res Microbiol* **155**: 283-289.

- Lanyi, J.K. 1974. Salt-dependent properties of protein from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**: 272-290.
- Larsen, H. 1962. Halophilism. En I.C. Gunsalus y R.Y. Stainer (eds.), *The Bacteria*, vol. 3. New York: Academic Press. pp. 297-342.
- Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms, an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 3-7.
- Lau, S.C.K., Tsoi, M.M.Y., Li, X., Dobretsov, S., Plakhotnikova, Y., Wong, P.-K. y Qian, P.-Y. 2005. *Pseudoalteromonas spongiae* sp. nov., a novel member of γ -Proteobacteria isolated from the sponge *Mycale adhaerens* in Hong Kong waters. *Int J Syst Ecol Microbiol* (en prensa).
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K.D., Drummond, R. y Gelfand, D.H. 1989. Isolation, characterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* **264**: 6427-6437.
- Lee, C.A. 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol* **5**: 148-156.
- Lee, S.F., Forsberg, C.W. y Gibbins, L.N. 1985. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1068-1076.
- Lee, S.O., Kato, J., Nakashima, K., Kuroda, A., Ikeda, T., Takiguchi, N. y Ohtake, H. 2002. Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**:1366-1369.
- Lee, J.K., Kim, Y.O., Kim, H.K., Park, Y.S. y Oh, T.K. 1996. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA sequence of the encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 840-846.
- Lee, M.A. y Liu Y. 2000. Sequencing and characterization of a novel serine metalloprotease from *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 67-72.
- Lee, S.H., Minagawa, E., Taguchi, H., Matsuzawa, H., Ohta, T., Kaminogawa, S. y Yamauchi, K. 1992. Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase (carboxypeptidase Taq) from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 1839-1844.
- Lee, S.H., Taguchi, H., Yoshimura, E., Minagawa, E., Kaminogawa, S., Ohta, T. y Matsuzawa, H. 1994. Carboxypeptidase Taq, a thermostable zinc enzyme, from *Thermus aquaticus* YT-1: molecular cloning, sequencing, and expression of the encoding gene in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 1490-1495.
- Lee, H.M., Tyan, S.W., Leu, W.M., Chen, L.Y., Chen, D.C. y Hu, N.T. 2001. Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-xpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *J Bacteriol* **183**: 528-535.

- Lee, H.M., Wang, K.C., Liu, Y.L., Yew, H.Y., Chen, L.Y., Leu, W.M., Chen, D.C. y Hu, N.T. 2000. Association of the cytoplasmic membrane protein XpsN with the outer membrane protein XpsD in the type II protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* **182**: 1549-1557.
- Letellier, L., Howard, S.P. y Buckley, J.T. 1997. Studies on the energetics of proaerolysin secretion across the outer membrane of *Aeromonas species*. Evidence for a requirement for both the protonmotive force and ATP. *J Biol Chem* **272**: 11109-11113.
- Li, N., Patel, B.K., Mijts, B.N. y Swaminathan, K. 2002. Crystallization of an α -amylase, *AmyA*, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 2125-2126.
- Libinzon, A.E., Us, Z.I., Gatseva, G.V., Degtiareva, B.M. y Golkovskii, G.M. 1995. Phages of halophilic vibrios *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* **1**: 15-18.
- Lin, X. y Tang, J. 1990. Purification, characterization, and gene cloning of thermopsin, a thermostable acid protease from *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem* **265**: 1490-1495.
- Lineweaver, H. y Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* **56**: 658-666.
- Lindeberg, M. y Collmer, A. 1992. Analysis of eight out genes in a cluster required for pectic enzyme secretion by *Erwinia chrysanthemi*: sequence comparison with secretion genes from other Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **174**: 7385-7397.
- Lindeberg, M., Salmond, G.P. y Collmer, A. 1996. Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* out genes with *Erwinia carotovora* out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. *Mol Microbiol* **20**: 175-190.
- Linderoth, N.A., Model, P. y Russel, M. 1996. Essential role of a sodium dodecyl sulfate-resistant protein IV multimer in assembly-export of filamentous phage. *J Bacteriol* **178**: 1962-1970.
- Linderoth, N.A., Simon, M.N. y Russel, M. 1997. The filamentous phage pIV multimer visualized by scanning transmission electron microscopy. *Science* **278**: 1635-1638.
- Litchfield, C.D. y Gillevet, P.M. 2002. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 48-55.
- Litchfield, C.D., Irby, A. y Vreeland, R.H. 1999. The microbial ecology of solar salt plant. En A. Oren (ed.), *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Boca Raton: CRC Press. pp. 39-52.
- Liu, R., Qu, Y., Jiang, Y. y Gao, P. 1999. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Pseudomonas* G6-2. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **39**: 132-136.

- Liu, P.V. y Hsieh, H.C. 1969. Inhibition of protease production of various bacteria by ammonium salts: its effect on toxin production and virulence. *J Bacteriol* **99**: 406-413.
- Llamas, I., Béjar, V., Argandoña, M., Quesada, E. y del Moral, A. 1999. Chemical mutagenesis of *Halomonas eurihalina* and selection of exopolysaccharide-deficient variants. *Biotechnol Lett* **221**: 367-370.
- Llamas, I., Sánchez, M.J., Argandoña, M., Béjar, V., Quesada, E. y del Moral, A. 2002. Analysis of the genome of the moderate halophile *Halomonas eurihalina*. *Curr Microbiol* **45**: 233-239.
- Long, S., Mothibeli, M.A., Robb, F.T. y Woods, D.R. 1981. Regulation of extracellular alkaline protease activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain. *J Gen Microbiol* **127**: 193-199.
- Louis, P. y Galinski, E.A. 1997. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**: 1141-1149.
- Louis, P., Trüper, H.G. y Galinski, E.A. 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 648-688.
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. y Eck, J. 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 572-577.
- Ludwig, W. y Strunk, O. 1996. ARB a software environment for sequence data. <http://www.arb-home.de/>
- Maciver, B., McHale, R.H., Saul, D.J. y Bergquist, P.L. 1994. Cloning and sequencing of a serine proteinase gene from a thermophilic *Bacillus* species and its expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3981-3988.
- McConnell, D.J., Cantwell, B.A., Devine, K.M., Forage, A.J., Laoide, B.M., O'Kane, C., Ollington, J.F. y Sharp, P.M. 1986. Genetic engineering of extracellular enzyme systems of Bacilli. *Ann N Y Acad Sci* **469**: 1-17.
- McIver, K.S., Kessler, E. y Oman, D.E. 2004. Identification of residues in the *Pseudomonas aeruginosa* elastase propeptide required for chaperone and secretion activities. *Microbiology* **150**: 3969-3977.
- McCoy, M. 2000. Novozymes emerges. *Chem Eng News* **19**: 23-25.
- Madern, D., Ebel, C. y Zaccai, G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* **4**: 91-98.
- Madern, D., Pfister, C. y Zaccai, G. 1995. Mutation at behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *Eur J Biochem* **230**: 1088-1095.
- Madern, D. y Zaccai, G. 2004. Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein. *Biochimie* **86**: 295-303.

- Madigan M.T. y Oren, A. 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol* **2**: 265-269.
- Maeda, H. y Yamamoto, T. 1996. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**: 217-226.
- Mahadevan, D. y Saldanha, J.W. 1999. The extracellular regions of PSMA and the transferrin receptor contain an aminopeptidase domain: implications for drug design. *Protein Sci* **8**: 2546-2549.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M. y Iida, T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**: 743-749.
- Maltseva, O., McGowan, C., Fulthorpe, R. y Oriel, P. 1996. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. *Microbiology* **142**: 1115-1122.
- Mandel, M. y Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.
- Mane, R.R. y Bapat, M. 2001. A study of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM 2713. *Indian J Exp Biol* **39**: 578-583.
- Manting, E.H. y Driessen, A.J. 2001. *Escherichia coli* translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**: 226-238.
- Marchler-Bauber, A. y Bryant, S.H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**: W327-331.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Cherukuri, P.F., DeWeese-Scott, C., Geer, L.Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song, J.S., Thiessen, P.A., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D. y Bryant, S.H. 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**: D192-196
- Margesin, R. y Schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* **5**: 73-83.
- Markaryan, A., Lee, J.D., Sirakova, T.D. y Kolattukudy, P.E. 1996. Specific inhibition of mature fungal serine proteinases and metalloproteinases by their propeptides. *J Bacteriol* **178**: 2211-2215.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* **3**: 208-218.
- Marmur, J. y Doty, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**: 109-118.

- Márquez, M.C., Ventosa, A. y Ruiz-Berraquero. 1987. A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. *J Gen Microbiol* **133**: 45-56.
- Márquez, M.C., Ventosa, A. y Ruiz-Berraquero, F. 1990. *Marinococcus hispanicus*, a new species of moderately halophilic Gram-positive cocci. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 165-169.
- Márquez, M.C., Ventosa, A. y Ruiz-Berraquero, F. 1992. Phenotypic and chemotaxonomic characterization of *Marinococcus halophilus*. *Syst Appl Microbiol* **15**: 63-69.
- Martin, E.L., Reinhardt, R.L., Baum, L.L., Becker, M.R., Shaffer, J.J. y Kokjohn, T.A. 2000. The effects of ultraviolet radiation on the moderate halophile *Halomonas elongata* and the extreme halophile *Halobacterium salinarum*. *Can J Microbiol* **46**:180-187.
- Martín, S., Márquez, M.C., Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Arahál, D.R. y Ventosa, A. 2003. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1383-1387.
- Martín, S., Sánchez-Porro, C., Mellado, E. y Ventosa, A. 2004. Cloning and characterization of lipase and protease encoding genes from moderately halophilic bacteria. Biocat 2004. II International Congress on Biocatalysis. Hamburgo (Alemania). P-114.
- Martínez-Checa, F., Calvo, C., Caba, M.A., Ferrer, M.R., Béjar, V. y Quesada, E. 1996. Effect of nutritional conditions on the viscosity and emulsifying capacity of V2-7 biopolymer from *Volcaniella eurihalina*. *Microbiología SEM* **12**: 55-60.
- Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Vilchez, R., Quesada, E. y Calvo, C. 2002. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 358-63.
- Maskow, T. y Kleinstueber, S. 2004. Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol. *Extremophiles* **8**: 133-141.
- Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* **262**: 10035-10038.
- Matsumoto, K., Yamamoto, T., Kamata, R. y Maeda, H. 1984. Pathogenesis of serratial infection: activation of the Hageman factor-prekallikrein cascade by serratial protease. *J Biochem* **96**: 739-749.
- Matthews, B.W. 1988. Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc Chem Res* **21**: 333-340.
- Matthews, B.W., Jansonius, J.N., Colman, P.M., Schoenborn, B.P. y Dupourque, D. 1972. Three-dimensional structure of thermolysin. *Nat New Biol* **238**: 37-41.
- Maras, B., Greenblatt, H.M., Shoham, G., Spungin-Bialik, A., Blumberg, S. y Barra, D. 1996. Aminopeptidase from *Streptomyces griseus*: primary structure and comparison with other zinc-containing aminopeptidases. *Eur J Biochem* **236**: 843-846.

- Marie-Claire, C., Roques, B.P. y Beaumont, A. 1998. Intramolecular processing of prothermolysin. *J Biol Chem* **273**: 5697-5701.
- Mahadevan, D. y Saldanha, J.W. 1999. The extracellular regions of PSMA and the transferrin receptor contain an aminopeptidase domain: implications for drug design. *Protein Sci* **8**: 2546-2549.
- Maurer, J., Jose, J. y Meyer, T.F. 1999. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* **181**: 7014-7020.
- Maurer, K.H. 2004. Detergent proteases. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 330-334.
- May, B.K. y Elliott, W.H. 1968. Characteristics of extracellular protease formation by *Bacillus subtilis* and its control by amino acid repression. *Biochim Biophys Acta* **157**: 607-615.
- McIver, K., Kessler, E. y Oman, D.E. 1991. Substitution of active-site His-223 in *Pseudomonas aeruginosa* elastase and expression of the mutated lasB alleles in *Escherichia coli* show evidence for autoproteolytic processing of proelastase. *J Bacteriol* **173**: 7781-7789.
- McIver, K.S., Kessler, E., Olson y J.C. Oman, D.E. 1995. The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone required for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **18**: 877-889.
- McIver, K.S., Kessler, E, Oman y D.E. 2004. Identification of residues in the *Pseudomonas aeruginosa* elastase propeptide required for chaperone and secretion activities. *Microbiology* **150**: 3969-3977.
- McClelland, M., Hanish, J., Nelson, M. y Patel, Y. 1988. KGB: a single buffer for all restriction endonucleasas. *Nucleic Acids Res* **16**: 364-366.
- McMeekin, T.A., Nichols, P.D., Nichols, S.D., Juhasz, A. y Franzmann, P.D. 1993. Biology and biotechnological potential of halotolerant bacteria from Antarctic saline lakes. *Experientia* **49**: 1042-1046.
- Mellado, E., García, M.T., Nieto, J.J., Kaplan, S. y Ventosa, A. 1997. Analysis of the genome of *Vibrio costicola*: pulse-field gel electrophoretic analysis of the genome size and plasmid content. *Syst Appl Microbiol* **20**: 20-26.
- Mellado, E., García, M.T. Roldan, E., Nieto, J.J. y Ventosa, A. 1998. Analysis of the genome of the gram-negative moderate halophiles *Halomonas* and *Chromohalobacter* by using pulsed-field gel electrophoresis. *Extremophiles* **2**: 435.438.
- Mellado, E., Moore, E.R.B., Nieto, J.J. y Ventosa, A. 1995a. Phylogenetic inferences and taxonomic consequences of 16S ribosomal DNA sequence comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina*, and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 712-716.

- Mellado, E., Moore, E.R., Nieto, J.J. y Ventosa, A. 1996. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 817-821.
- Mellado, E., Nieto, J.J. y Ventosa, A. 1995b. Construction of novel shuttle vectors for use between moderately halophilic bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmid* **34**: 157-164.
- Mellado, E., Sánchez-Porro, C., Martín, S. y Ventosa, A. 2003. Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria. En A. Ventosa (ed.). *Halophilic Microorganisms*. Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 285-295.
- Mellado, E. y Ventosa, A. 2003. Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. En J.L. Barredo (ed.), *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*. Kerala: Research Signpost. pp. 233-256.
- Mevarech, M., Frolow, F. y Gloss, L.M. 2000. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys Chem* **86**: 155-164.
- Michel, G., Bleves, S., Ball, G., Lazdunski, A. y Filloux, A. 1998. Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144**: 3379-3386.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M. y Cornelis, G. 1990. Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* **58**: 2840-2849.
- Mijts, B.N. y Patel, B.K. 2002. Cloning, sequencing and expression of an α -amylase gene, *amyA*, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* **148**: 2343-2349.
- Miller, J.H. (ed.), 1972. *Experimental in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Milton, D.L., Norqvist, A. y Wolf-Watz, H. 1992. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **174**: 7235-7244.
- Mitaku, S. y Hirokawa, T. 1999. Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins; hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng* **12**: 953-957.
- Mitaku, S., Hirokawa, T. y Tsuji, T. 2002. Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water Interfaces. *Bioinformatics* **18**: 608-616.
- Mitaku, S., Ono, M., Hirokawa, T., Seah, B.C. y Sonoyama, M. 1999. Proportion of membrane proteins in proteomes of 15 single-cell organisms analyzed by the SOSUI prediction system. *Biophys Chem* **82**: 165-171.

- Miyamoto, K., Nukui, E., Hirose, M., Nagai, F., Sato, T., Inamori, Y. y Tsujibo, H. 2002b. A metalloprotease (MprIII) involved in the chitinolytic system of a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5563-5570.
- Miyamoto, K., Tsujibo, H., Nukui, E., Itoh, H., Kaidzu, Y. y Inamori, Y. 2002a. Isolation and characterization of the genes encoding two metalloproteases (MprI and MprII) from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 416-421.
- Miyoshi, S. y Shinoda, S. 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* **2**: 91-98.
- Moffat, J.F., Edelstein, P.H., Regula, D.P. Jr., Cirillo, J.D. y Tompkins, L.S. 1994. Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model. *Mol Microbiol* **12**: 693-705.
- Mori, H. y Ito, K. 2001. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol* **9**: 494-500.
- Morihara, K. 1998. Aeruginolysin. En A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner (eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (CD-ROM). Chapter 387. London: Academic Press.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T. e Imanaka, T. 1994. Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4559-4566.
- Mormile, M.R., Romine, M.F., García, M.T., Ventosa, A., Bailey, T.J. y Peyton, B.N. 1999. *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying, moderately haloalkaliphilic bacterium. *Syst Appl Microbiol* **22**: 551-558.
- Morita, Y., Hasan, Q., Sakaguchi, T., Murakami, Y., Yokoyama, K. y Tamiya, E. 1998. Properties of a cold-active protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 669-675.
- Mota, R.R., Márquez, M.C., Arahál, D.R., Mellado, E. y Ventosa, A. 1997. Polyphasic taxonomy of *Nesterenkonia halobia*. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1231-1235.
- Motitschke, L., Driller, H. y Galinski, E.A. 2001. Patent US6267973.
- Muderrizade, A., Ensari, N.Y., Aguloglu, S. y Otludil, B. 2001. Purification and characteristics of alkaline proteinase from alkalophylic *Bacillus* sp. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **37**: 674-677.
- Mullis, K.B. y Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth Enzymol* **155**: 335-350.
- Munro, G.K., McHale, R.H., Saul, D.J., Reeves, R.A. y Bergquist, P.L. 1995. A gene encoding a thermophilic alkaline serine proteinase from *Thermus* sp. strain Rt41A and its expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **141**: 1731-1738.

- Muñoz, J.A., Pérez-Esteban, B., Esteban, M., de la Escalera, S., Gómez, M.A., Martínez-Toledo, M.V., González-López, J. 2001. Growth of moderately halophilic bacteria isolated from sea water using phenol as the sole carbon source. *Folia Microbiol (Praha)* **46**: 297-302.
- Nagamune, K., Yamamoto, K., Naka, A., Matsuyama, J., Miwatani, T. y Honda, T. 1996. In vitro proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and other proteases. *Infect Immun* **64**: 4655-4658.
- Nakamura, Y., Gojobori, T. y Ikemura, T. 2000. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* **28**: 292.
- Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y. y Shinmyo, A. 2000. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol* **122**: 1239-1247.
- Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B.C., Choe, E.A., Hwang, J.K., Suhartono, M.T. y Pyun, Y.R. 2002. Native-feather degradation by *Ferrodobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch Microbiol* **178**: 538-547.
- Nakahama, K., Yoshimura, K., Marumoto, R., Kikuchi, M., Lee, I.S., Hase, T. y Matsubara, H. 1986. Cloning and sequencing of *Serratia protease* gene. *Nucleic Acids Res* **14**: 5843-5855.
- Narayanan, S.K., Nagaraja, T.G., Chengappa, M.M. y Stewart, G.C. 2002. Leukotoxins of Gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* **84**: 337-356.
- Narinx, E., Baise, E. y Gerday, C. 1997. Subtilisin from psychrophilic antarctic bacteria: characterization and site-directed mutagenesis of residues possibly involved in the adaptation to cold. *Protein Eng* **10**: 1271-1279.
- Narinx, E., Davail, S., Feller, G. y Gerday C. 1992. Nucleotide and derived amino acid sequence of the subtilisin from the antarctic psychrotroph *Bacillus* TA39. *Biochim Biophys Acta* **1131**: 111-113.
- Neklyudov, A.D., Invankin, A.N. y Berdutina, A.V. 2000. Properties and uses of protein hydrolases. *Appl Biochem Microbiol* **36**: 452-459.
- Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C. y Minshull, J. 2002. Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat Biotechnol* **20**: 1251-1255.
- Neurath, H. 1985. Proteolytic enzymes, past and present. *Fed Proc* **44**: 2907-2913.
- Ng, W.V., Kennedy, S.P., Mahairas, G.G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H.D., Lasky, S.R., Baliga, N.S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., May, J., Dahl, T.A., Welti, R., Goo, Y.A., Leithauser, B., Séller, K., Cruz, R., Danson, M.J., Hough, D.W., Maddocks, D.G., Jablonski, P.E., Krebs, M.P., Angevine, C.M., Dale, H., Isenbarger, T.A., Peck, R.F., Pohlschroder, M., Spudich, J.L., Jung, K.W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C.J., Dennis, P.P., Omer, A.D., Ehardt, H., Lowe,

- T.M., Liang, P., Riley, M., Hood, L. y DasSarma, S. 2000. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12176-12181.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot Eng* **10**: 1-6.
 - Nieto, J.J. 1991. The response of halophilic bacteria to heavy metals. En F. Rodríguez-Valera (ed.), *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. New York: Plenum Press. pp. 173-179.
 - Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., García, M.T., Mellado, E. y Ventosa, A. 1993. Survey of antimicrobial susceptibility of moderately halophilic eubacteria and extremely halophilic aerobic archaeobacteria: utilization of antimicrobial resistance as a genetic marker. *Syst Appl Microbiol* **16**: 352-360.
 - Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M.C., Ventosa, A., Quesada, E. y Ruiz-Berraquero, F. 1989. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl Environ Microbiol* **52**: 2385-2390.
 - Nieto, J.J. y Vargas, C. 2002. Synthesis of osmoprotectants by moderately halophilic bacteria: genetic and applied aspects. *Recent Res Devel Microbiology* **6**: 403-418.
 - Nieto, J.J., Vargas, C. y Ventosa, A. 2000. Osmoprotection mechanisms in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Recent Res Devel Microbiol* **4**: 43-54.
 - Nirasawa, S., Nakajima, Y., Zhang, Z.Z., Yoshida, M. y Hayashi, K. 1999a. Intramolecular chaperone and inhibitor activities of a propeptide from a bacterial zinc aminopeptidase. *Biochem J* **341**: 25-31.
 - Nirasawa, S., Nakajima, Y., Zhang, Z., Yoshida, M. y Hayashi, K. 1999b. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the extracellular endoprotease of *Aeromonas caviae* T-64, a pro-aminopeptidase processing enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1433**: 335-342.
 - Nissenbaum, A., 1975. The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microb Ecol* **2**: 139-161.
 - Norberg, P. y Von Hofsten, B. 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J Gen Microbiol* **55**: 251-256.
 - Norton, C.F. y Grant, W.D. 1988. Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystal. *J Gen Microbiol* **121**: 259-262.
 - Nouwen, N., Stahlberg, H., Pugsley, A.P. y Engel, A. 2000. Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy. *EMBO J* **19**: 2229-2236.
 - Novagen. 2002. pET System Manual TB055 10^o Edición. 07/02.
 - Novitsky, K.J. y Kushner, D.J. 1975. Influence of temperature and salt concentration on the growth of a facultatively halophilic "*Micrococcus*" sp. *Can J Microbiol* **21**: 107-110.

- Novitsky, K.J. y Kushner, D.J. 1976. *Planococcus halophilus* sp. nov., a facultatively halophilic coccus. *Int J Syst Bacteriol* **26**: 53-57.
- Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M. y Goldman, A. 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel β -roll. *EMBO J* **23**: 701-711.
- Nunn, D.N. y Lory, S. 1993. Cleavage, methylation, and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT, -U, -V, and -W. *J Bacteriol* **175**: 4375-4382.
- Ogino, H., Watanabe, F., Yamada, M., Nakagawa, S., Hirose, T., Noguchi, A., Yasuda, M. y Ishikawa, H. 1999. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. *J Biosci Bioeng* **87**: 61-68.
- Okamoto, T., Maruyama, A., Imura, S., Takeyama, H. y Naganuma, T. 2004. Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16S rRNA, *gyrB* and *ectBC* gene sequences. *Syst Appl Microbiol* **27**: 323-333.
- Oliver, D.C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. y Fernández, R.C. 2003. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* **47**: 1367-1383.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J.L. y Mah, R.A. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* **58**: 27-38.
- Olliver, B., Hatchikian, C.E., Prensier, G., Guezennec, J. y Garcia, J.L. 1991. *Desulfohalobium retbaense* gen. nov., a halophilic sulfate reducing bacterium from sediments of a hypersaline lake in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 74-81.
- Onishi, H. y Sodona, K. 1979. Purification and some properties of an extracellular amylase from a moderate halophile, *Micrococcus halobius*. *Appl Environ Microbiol* **38**: 616-620.
- Onishi, H. 1972. Halophilic amylase from a moderately halophilic *Micrococcus*. *J Bacteriol* **109**: 570-574.
- Onishi, H. y Hidaka, O. 1978. Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *Acinetobacter* sp. *Can. J. Microbiol* **24**: 1017-1023.
- Onishi, H. y Kamekura, M. 1972. *Micrococcus halobius* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **22**: 233-236.
- Onishi, H., Kamekura, M., Yokoi, H. y Kobayashi, T. 1988. Production of 5'-nucleotide by using halophilic nuclease H preferentially adsorbed on flocculated cells of the halophile *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. *Appl Environ Microbiol* **54**: 2632-2635.
- Onishi, H., Kobayashi, T. y Kamekura, M. 1982. Purification and some properties of an extracellular halophilic 5'-nucleotidase from a moderate halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **24**: 303-306.

- Onishi, H., Kobayashi, T. y Kamekura, M. 1984. Purification and some properties of an extracellular halophilic 5'-nucleotidase from a moderate halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **24**: 303-306.
- Onishi, H., Mori, T., Takeuchi, S., Tani, K., Kobayashi, T. y Kamekura, M. 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp.: production, purification, and characterization. *Appl Environ Microbiol* **45**: 24-30.
- Onishi, H., Yokoi, H. y Kamekura, M. 1991. An application of a bioreactor with flocculated cells of halophilic *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* which preferentially adsorbed halophilic nuclease H to 5'-nucleotide production. En F. Rodríguez-Valera (ed.), *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. New York: Plenum Press. pp. 341-349.
- Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M. y Murooka, Y. 1999. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol* **181**: 91-99.
- O'Reilly, T. y Day, D.F. 1983. Effects of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1132-1135.
- O'Donohue, M.J. y Beaumont, A. 1996. The roles of the prosequence of thermolysin in enzyme inhibition and folding in vitro. *J Biol Chem* **271**: 26477-26481.
- Oren, A. 1983a. A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the Dead Sea. *Cur Microbiol* **8**: 225-230.
- Oren, A. 1983b. *Clostridium lortetii* sp. nov., a halophilic obligatory anaerobic bacterium producing endospores with attached gas vacuoles. *Arch Microbiol* **136**: 42-48.
- Oren, A. 1986. Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius*. *Can J Microbiol* **22**: 4-9.
- Oren, A. 1988. The microbial ecology of the Dead Sea. En K.C. Marshall (ed.), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 10, New York: Plenum Publishing. pp. 193-229.
- Oren, A. 1991. Estimation of the contribution of archaeobacteria and eubacteria to the bacterial biomass and activity in hypersaline ecosystems: novel approaches. En F. Rodríguez-Valera (ed.), *General and Applied Aspects of Halophilic Bacteria*. New York: Plenum Press. pp. 25-31.
- Oren, A. 1993. Ecology of extremely halophilic microorganisms. En R.H. Vreeland y L.I. Hochstein (eds.), *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 25-53.
- Oren, A. 2002a. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 58-63.
- Oren, A. 2002b. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microb Ecol* **39**: 1-7.

- Oren, A., Bratbak, G. y Haldal, M. 1997. Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea. *Extremophiles* **1**: 143-149.
- Oren, A., Guverich, P., Azachi, M. y Henis, Y. 1992. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation* **3**: 387-398.
- Oren, A., Guverich, P., Azachi, M. y Henis, Y. 1993. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations, En E. Rosenberg (ed.), *Microorganisms to Combat Pollution*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 263-274.
- Oren, A., Gurevich, P. y Henis, Y. 1991. Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3367-3370.
- Oren, A., Haldal, M., Norland, S. y Galinski, E.A. 2002. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* **6**: 491-498.
- Oren, A., Kessel, M. y Stackebrandt, E. 1989. *Ectothiorhodospira marismortui* sp. nov., an obligatory anaerobic, moderately halophilic purple sulfur bacterium from a hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea. *Arch Microbiol* **151**: 524-529.
- Oren, A. y Mana, L. 2002. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles* **6**: 217-23.
- Oren, A. y Mana, L. 2003. Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 83-87.
- Oren, A., Larimer, F., Richardson, P., Lapidus, A. y Csonka, L.N. 2005. How to be moderately halophilic with a broad salt tolerance: clue from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extremophiles*. (en prensa).
- Oren, A., Pohla, H. y Stackebrandt, E. 1987. Transfer of *Clostridium lortetii* to a new genus *Sporohalobacter* gen. nov. as *Sporohalobacter lortetii* comb. nov., and description of *Sporohalobacter marismortui* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **9**: 239-246.
- Oren, A., Paster, B.J. y Woese, C.R. 1984a. Haloanaerobiaceae: a new family of moderately halophilic, obligatory anaerobic bacteria. *Syst Appl Microbiol* **5**: 58-70.
- Oren, A. y Rodríguez-Valera, F. 2001. The contribution of *Salinibacter* species to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* **36**: 123-130.
- Oren, A., Rodríguez-Valera, F., Antón, J., Benlloch, S., Rosselló-Mora, R., Amann, R., Coleman, J. y Russell, N.J. 2003. Red, extremely halophilic, but not archaeal: the physiology and ecology of *Salinibacter ruber*, a bacterium isolated from saltern crystallizer ponds. En A. Ventosa (ed.), *Halophilic Microorganisms A*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 63-76.

- Oren, A., Weisburg, W.G., Kessel, M. y Woese, C.R. 1984b. *Halobacteroides halobius* gen. nov., sp. nov. a moderately halophilic anaerobic bacterium from the bottom sediments of the Dead Sea. *Syst Appl Microbiol* **5**: 58-70.
- Owen, R.J. y Hill, L.R. 1979. The estimation of base compositions, base pairing and genome sizes of bacterial deoxyribonucleic acids. En F.A. Skinner y D.W. Lovelock (eds.), *Identification Methods for Microbiologists*. 2ª ed. London: Academic Press. pp 277-296.
- Owen, R.J. y Pitcher, D. 1985. Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. En M. Goodfellow y D.E. Minnikin (eds.), *Chemical Methods in Bacterial Systematic*. London: Academic Press. pp 67-93.
- Oyama, H., Kinjoh, M., Watari, M. y Murao, S. 1997. Purification and characterization of an alkaline proteinase produced by *Pimelobacter* sp. Z-483. *J Ferment Bioeng* **84**: 351-353.
- Pérez, R. 2004. Producción de xantano y gelano a partir de coproductos de la industria azucarera. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Palmer, T. y Berks, B.C. 2003. Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology* **149**: 547-556.
- Pansegrau, W. y Lanka, E. 1996. Enzymology of DNA transfer by conjugative mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**: 197-251.
- Patenge, N., Haase, A., Bolhuis, H. y Oesterhelt, D. 2000. The gene for a halophilic β -galactosidase (bgaH) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **36**: 105-113.
- Pavlova, I.N., Rotanova, T.V. y Zholner, L.G. 1989. Aminopeptidase from a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Mikrobiol Zh* **51**: 47-52.
- Pedersen, K., Nilsson, E., Arlinger, J., Hallbeck, L. y O'Neill, A. 2004. Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. *Extremophiles* **8**: 151-164.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J.I., Maclean, M.H., Medina, G., Marrasé, C., Gasol, J.M. y Guixa-Boixereu, N. 2000. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 143-155.
- Peek, K., Veitch, D.P., Prescott, M., Daniel, R.M., MacIver, B. y Bergquist, P.L. 1993. Some characteristics of a proteinase from a thermophilic *Bacillus* sp. expressed in *Escherichia coli*: comparison with the native enzyme and its processing in *E. coli* and *in vitro*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1168-11675.
- Perea, A., Ugalde, U., Rodríguez, I. y Serra, J.L. 1993. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microbiol Technol* **15**: 418-423.

- Pérez-Fernández, M.E., Quesada, E., Gálvez, J. y Ruiz, C. 2000. Effect of exopolysaccharide V2-7, isolated from *Halomonas eurihalina* on the proliferation in vitro of human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharm Immunotoxicol* **22**: 131-141.
- Pérez-Pomares, F., Bautista, V., Ferrer, J., Pire, C., Marhuenda-Egea, F.C. y Bonete, M.J. 2003. α -amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* **7**: 299-306.
- Petinate, S.D., Branquinha, M.H, Coelho, R.R., Vermelho, A.B. y Giovanni-De-Simone, S. 1999. Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of *Streptomyces cyaneus* isolated from Brazilian cerrado soil. *J Appl Microbiol* **87**: 557-563.
- Peyton, B.M., Mormile, M.R., Alva, V., Oie, C., Roberto, F., Apel, W.A. y Oren A. 2004. Biotransformation of toxic organic and inorganic contaminants by halophilic bacteria. En A. Ventosa (ed.), *Halophilic Microorganisms*. New York: Springer-Verlag. pp. 315-331.
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M. y Herzberg, O. 1998. Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* **6**: 75-88.
- Plano, G.V., Day, J.B. y Ferracci, F. 2001. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol Microbiol* **40**: 284-293.
- Possot, O.M., Letellier, L. y Pugsley, A.P. 1997. Energy requirement for pullulanase secretion by the main terminal branch of the general secretory pathway. *Mol Microbiol* **24**: 457-464.
- Possot, O.M., Vignon, G., Bomchil, N., Ebel, F. y Pugsley, A.P. 2000. Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE. *J Bacteriol* **182**: 2142-2152.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. y Meyer, T.F. 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.
- Post, F.J. 1977. The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb Ecol* **3**: 143-165.
- Potempa, J. y Pike, R.N. 2005. Bacterial peptidases. *Contrib Microbiol* **12**: 132-180.
- Prentki, P. y Krish, H.M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Prescott, M., Peek, K. y Daniel, R.M. 1995. Characterization of a thermostable pepstatin-insensitive acid proteinase from a *Bacillus* sp. *Int J Biochem Cell Biol* **27**: 729-739.
- Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.
- Pugsley, A.P. y Dupuy, B. 1992. An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Mol Microbiol* **6**: 751-760.

- Pugsley, A.P., Francetic, O., Possot, O.M., Sauvonnnet, N. y Hardie, K.R. 1997. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria—a review. *Gene* **192**: 13-19.
- Py, B., Loiseau, L. y Barras, F. 1999. Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. *J Mol Biol.* **289**: 659-670.
- Py, B., Loiseau, L. y Barras, F. 2001. An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep* **2**: 244-248.
- Quandt, J. y Hynes, M.F. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**: 15-21.
- Quesada, E., Béjar, V. y Calvo, C. 1993. Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* **49**: 1037-1041.
- Quesada, E., Béjar, V., Valderrama, M.J. y Ramos-Cormenzana, A. 1987. Growth characteristics and salt requirement of *Deleya halophila*. *Curr Microbiol* **16**: 21-25.
- Qesada, E., Valderrama, M.J., Béjar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. 1990. *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic non-motile Gram-negative rod. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 261-267.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Megías, L. y Ramos-Cormenzana, A. 1983. Numerical taxonomy of moderate halophiles from hypersaline soils. *J Gen Microbiol* **129**: 2649-2657.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F. y Ramos-Cormenzana, A. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J Appl Bacteriol* **53**: 155-161.
- Quesada, E., Ventosa, A., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. 1984. *Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **34**: 287-292.
- Rahman, R.N.M.N., Razak, C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W.M.Z.W. y Salleh, A.B. 1994. Purification and characterization of heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**: 822-827.
- Rao, B.L., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. y Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 597-635.
- Ramos-Cormenzana, A. 1991. Halophilic organisms and the environment. En F. Rodríguez-Valera (ed.), *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. New York: Plenum Press. pp. 15-24.
- Rattray, F.P., Fox, P.F. y Healy, A. 1997. Specificity of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174 on bovine beta-casein. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2468-2471.
- Rawlings, N.D. y Barret, A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290**: 205-218.

- Rawlings, N.D. y Barrett, A.J. 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol* **248**: 183-228.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. y Barrett, A.J. 2004. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **32**: 160-164.
- Rawlings, N.D., O'Brien, E. y Barrett, A.J. 2002. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **30**: 343-346.
- Reiland, V., Fundoiano-Hershcovitz, Y., Golan, G., Gilboa, R., Shoham, Y. y Shoham, G. 2004. Preliminary crystallographic characterization of BSAP, an extracellular aminopeptidase from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2371-2376.
- Reese, M.G. y Eckman, F.H. 1995. Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. Accepted talk for the 7th International Genome Sequencing and Analysis Conference. Hilton Head Island, South Carolina. pp. 16-20.
- Reeves, P.J., Whitcombe, D., Wharam, S., Gibson, M., Allison, G., Bunce, N., Barallon, R, Douglas, P., Mulholland, V. Stevens, S. Walker, S. y Salmond, G.P.C. 1993. Molecular cloning and characterization of 13 out genes from *Erwinia carotovora* subspecies carotovora: genes encoding members of a general secretion pathway (GSP) widespread in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **8**: 443-456.
- Riessen, S. y Antranikian, G. 2001. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles* **5**: 399-408.
- Rinderknecht, R., Georkas, M.C., Silverman, P. y Haverback, B.J. 1968. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clinica Chimica Acta* **21**: 197-203.
- Ring, G. y Eichler, J. 2004. Extreme secretion: protein translocation across the archeal plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr* **36**: 35-45.
- Ríos, M., Nieto, J.J. y Ventosa, A. 1998. Numerical taxonomy of heavy metal-tolerant nonhalophilic bacteria isolated from hypersaline environments. *Int Microbiol* **1**: 45-51.
- Roberts, J.A., Marklund, B.I., Ilver, D., Haslam, D., Kaack, M.B., Baskin, G., Louis, M., Mollby, R., Winberg, J. y Normark, S. 1994. The Gal (α 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11889-11893.
- Rodríguez-Valera, F. 1988. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En F. Rodríguez-Valera (ed.), *Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 3-30.
- Rodríguez-Valera, F. (ed.), 1991. *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. London: Plenum Press.

- **Rodríguez-Valera, F.** 1992. Biotechnological potential of halobacteria. *En* M.J. Danson, D.W. Hough, y G.G. Lunt (eds.), *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. London: Plenum Press. pp. 135-147.
- **Rodríguez-Valera, F.** 1993. Introduction to saline environments. *En* R.H. Vreeland y L. Hochstein (eds.), *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 1-23.
- **Rodríguez-Valera, F., Acinas, S.G. y Antón, J.** 1999. Contribution of molecular techniques to the study of microbial diversity in hypersaline environments. *En* A. Oren (ed.), *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Boca Raton: CRC Press. pp. 27-38.
- **Rodríguez-Valera, F. y Ruiz-Berraquero, F.** 1983. Halobacterias. *Investigación y Ciencia* **80**: 94-102.
- **Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. e Imhoff, J.F.** 1985. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multipond saltern. *Microbiol Ecol* **11**: 107-115.
- **Röling W.F.M. y Van Verseveld, H.** 1996. Characterization of *Tetragenococcus halophila* population in Indonesian soy mash (kecap) fermentation. *Appl Environ Microb* **62**: 1203-1207.
- **Romano, I., Nicolau, B., Lama, L., Manca, M.C. y Gambacorta, A.** 1996. Characterization of a haloalkalophilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. *Syst Appl Microbiol* **19**: 326-333.
- **Romero, F.J., García, L.A., Salas, J.A., Díaz, M. y Quirós, L.M.** 2001. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marscescens* grown on whey. *Process Biochem* **36**: 507-515.
- **Romling, U., Bian, Z., Amar, M., Sierralta, W.D. y Normark, S.** 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* **180**: 722-731.
- **Rose, R.W., Bruser, T., Kissinger, J.C. y Pohlschroder, M.** 2002. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* **45**: 943-950.
- **Rosenberg, A.H., Lada, B.N., Chui, D., Lin, S.W., Dunn, J.J. y Studier, W.** 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**: 125-135.
- **Rosqvist, R.K.E., Magnusson, E. y Wolf-Watz, H.** 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* **13**: 964-972.
- **Roy, I. y Gupta, M.N.** 2002. Purification of a bacterial pullulanase on a fluidized bed of calcium alginate beads. *J Chromatogr A* **950**: 131-137.
- **Rudenskaia, G.N., Revina, L.P., Griaznova, B., Lysogorskaia, E.N., Oksenoit, E.S., Filippova, I., Stepanov, V.M. e Ivanova, I.I.** 1992. Serine proteinase from the archaeobacterium *Halobacterium mediterranei*-an analog of eubacterium subtilisin. *Biokhimiia* **57**: 1230-1241.

- Rüdiger, A., Jorgensen, P.L. y Antranikian, G. 1995. Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 567-575.
- Rudolph, R. y Lilie, H. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* **10**: 49-56.
- Russel, M. 1994. Mutants at conserved positions in gene IV, a gene required for assembly and secretion of filamentous phages. *Mol Microbiol* **14**: 357-369.
- Russell, N.J. 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *J Bioenerg Biomembr* **21**: 93-113.
- Russell, N.J. y Kogut, M. 1985. Haloadaptation: salt sensing and cell envelope changes. *Microbiol Sci* **2**: 345-349.
- Ryu, K., Kim, J. y Dordick, J.S. 1994. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microbiol Technol* **16**: 266-275.
- Saeki, K., Hitomi, J., Okuda, M., Hatada, Y., Kageyama, Y., Takaiwa, M., Kubota, H., Hagihara, H., Kobayashi, T., Kawai, S. e Ito, S. 2002. A novel species of alkaliphilic *Bacillus* that produces an oxidatively stable alkaline serine protease. *Extremophiles* **6**: 65-72.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (eds.), 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press.
- Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. y Ventosa, A. 2003a. Proteases from extremophilic microorganisms. En S.G. Pandalai (ed.), *Recent Research Developments in Microbiology*. Vol 7, Part II. Kerala: Reseach Signpost. pp 561-585.
- Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. y Ventosa, A. 2003b. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* **94**: 295-300.
- Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G. y Ventosa, A. 2003c. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles* **7**: 221-228.

- Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Martín, S. Ventosa, A. 2003d. Proteasa producida por una bacteria halófila moderada: modo de producción de la enzima. Patente española. P200300745.
- Sandkvist, M. 2001a. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* **40**: 271-283.
- Sandkvist, M. 2001b. Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* **69**: 3523-3535.
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S.P. y DiRita, V.J. 1995. Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J* **14**: 1664-1673.
- Sandkvist, M., Hough, L.P., Bagdasarian, M.M. y Bagdasarian, M. 1999. Direct interaction of the EpsL and EpsM proteins of the general secretion apparatus in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **181**: 3129-3135.
- Sandkvist, M., Keith, J.M., Bagdasarian, M. y Howard, S.P. 2000. Two regions of EpsL involved in species-specific protein-protein interactions with EpsE and EpsM of the general secretion pathway in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **182**: 742-748.
- Santini, C.L., Bernadac, A., Zhang, M., Chanal, A., Ize, B., Blanco, C. y Wu L.F. 2001. Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem* **276**: 8159-8164.
- Sargent, F., Berks, B.C. y Palmer, T. 2002. Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch Microbiol* **178**: 77-84.
- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C. y Palmer, T. 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J* **17**: 3640-3650.
- Satomi, M., Kimura, B., Mizoi, M., Sato, T. y Fujii, T. 1997. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 832-836.
- Sauer, T. y Galinski, E.A. 1998. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* **57**: 306-313.
- Schad, P.A., Bever, R.A., Nicas, T.I., Leduc, F., Hanne, L.F. y Iglewski, B.H. 1987. Cloning and characterization of elastase genes from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **169**: 2691-2696.
- Schallmeyer, M., Singh, A. y Ward, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* **50**: 1-17.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch M.C. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3381-3385.
- Schmidt, H., Henkel, B. y Karch, H. 1997. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 265-272.

- Schoenhofen, I.C., Stratilo, C. y Howard, S.P. 1998. An *ExeAB* complex in the type II secretion pathway of *Aeromonas hydrophila*: effect of ATP-binding cassette mutations on complex formation and function. *Mol Microbiol* **29**: 1237-1247.
- Schulein, R. y Dehio, C. 2002. The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol Microbiol* **46**: 1053-1067.
- Secades, P. y Guijarro, J.A. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3969-3975.
- Serour, E. y Antranikian, G. 2002. Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 73-83.
- Severin, J., Wohlfarth, A. y Galinski, E.A. 1992. The predominant role of the recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of the halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629-1638.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C. y Holden, D.W. 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2593-2597.
- Sher, J., Elevi, R., Mana, L. y Oren, A. 2004. Glycerol metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* **232**: 211-215.
- Shevchik, V.E. y Condemine, G. 1998. Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system. *Microbiology* **144**: 3219-3228.
- Shevchik, V.E., Robert-Baudouy, J. y Condemine, G. 1997. Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J* **16**: 3007-3016.
- Shibuya, Y., Yamamoto, T., Morimoto, T., Nishino, N., Kambara, T. y Okabe, H. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin. *Biochim Biophys Acta* **1077**: 316-324.
- Shieh, W.Y. y Jean, W.D. 1998. *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov. sp. nov. a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. *Can J Microbiol* **44**: 637-645.
- Shinde, U. y Inouye, M. 1993. Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends Biochem Sci* **18**: 442-446.
- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* **23**: 15-22.

- Sijbrandi, R., Urbanus, M.L., Hagen-Jongman, C.M., Bernstein, H.D., Oudega, B., Otto, B.R. y Luirink, J. 2003. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J Biol Chem* **278**: 4654-4659.
- Simon, R.D., Abeliovich, A. y Belkin, S. 1994. A novel terrestrial halophilic environment: the phylloplane of *Atripex halimus*, a salt-excreting plant. *FEMS Microbiol Ecol* **14**: 99-110.
- Simón, R.D., Priefer, U. y Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 99-110.
- Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Wu, Y.T., Pan, F.M. y Chen, S.T. 2001. Structural modeling and characterization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 868-875.
- Sing, J., Vohra, R.M. y Sahoo, DK. 2001. Purification and characterization of two extracellular alkaline proteases from a newly isolated obligate alkalophilic *Bacillus sphaericus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **26**: 387-393.
- Skerman, V.B.D. 1967. A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Skerman, V.B., McGowan, V. y Sneath, P.H.A. 1980. Approved list of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 225-420.
- Smacchi, E., Fox, P.F. y Gobetti, M. 1999. Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 327-333.
- Smith, A.W., Chahal, B. y French, G.L. 1994. The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **13**: 153-160.
- So, J., Shin, J. y Kim, B. 2000. Protease-catalyzed tripeptide (RGD) synthesis. *Enzyme Microbiol Technol* **26**: 108-114.
- Spungin, A. y Blumberg, S. 1989. *Streptomyces griseus* aminopeptidase is a calcium-activated zinc metalloprotein. Purification and properties of the enzyme. *Eur J Biochem* **183**: 471-477.
- Song, T., Toma, C., Nakasone, N. y Iwanaga, M. 2004. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *J Med Microbiol* **53**: 477-482.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S. y Chen, S.T. 2000. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expr Purif* **20**: 142-151.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Soto, G.E. y Hultgren, S.J. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**: 1059-1071.

- Sova, V.V., Elyakova, L.A., Ivanova, E. P., Fedosov, Y.V. y Mikhailov, V.V. 1994. Induced β -1,3-glucanase from marine bacterium *Alteromonas* sp. *Biokhimiya* **59**: 1369–1374.
- Staroscik, A.M., Denkin, S.M. y Nelson, D.R. 2005. Regulation of the *Vibrio anguillarum* metalloprotease EmpA by posttranslational modification. *J Bacteriol* **187**: 2257-2260.
- Struyve, M., Moons, M. y Tommassen, J. 1991. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**: 141-148.
- Szabady, R.L., Peterson, J.H., Skillman, K.M. y Bernstein, H.D. 2005. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 221-226.
- Spring, S., Ludwig, W., Márquez, M.C., Ventosa, A. y Schleifer, K.H. 1996. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 492-496.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. y Schumann, P. 1995. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 682-92.
- Stackebrandt, E.R., Murray, G.E. y Truper H.G. 1988. *Proteobacteria classis* nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. *Int J Syst Bacteriol* **38**: 321–325.
- St Geme, J.W. 3rd y Cutter, D. 2000. The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol* **182**: 6005-6013.
- St Geme, J.W. 3rd y Grass, S. 1998. Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins. *Mol Microbiol* **27**: 617-30.
- Stathopoulos, C., Hendrixson, D.R., Thanassi, D.G., Hultgren, S.J., St Geme, J.W. 3rd y Curtiss, R. 3rd. 2000. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect* **2**: 1061-1072.
- Stefanova, M.E., Schwerdtfeger, R., Antranikian, G. y Scandurra, R. 1999. Heat-stable pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*: characterization and refolding after guanidinium chloride-induced unfolding. *Extremophiles* **3**: 147-152.
- Stepanov, V.M., Rudenskaya, G.N., Revina, L.P., Gryaznova, Y.B., Lysogorskaya, E.N., Filippova, I.Y.U. e Ivanova, I.I. 1992. A serine proteinase of an archaebacterium, *Halobacterium mediterranei*. A homologue of eubacterial subtilisins. *Biochem J* **285**: 281-286.
- Studdert, C.A., De Castro, R.E., Seitz, K.H. y Sánchez, J.J. 1997. Detection and preliminary characterization of extracellular proteolytic activities of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *Arch Microbiol* **168**: 532-535.

- Studdert, C.A., Herrera Seitz, M.K., Plasencia Gil, M.I., Sanchez, J.J. y de Castro, R.E. 2001. Purification and biochemical characterization of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus* extracellular serine protease. *J Basic Microbiol* **41**: 375-383.
- Subow, N.N. 1931. Oceanographical tables. Commissariat of agriculture of URSS. Hydro-Meteorological Committee of URSS. Moscow: Oceanographical Institute of URSS.
- Sumandeeep, B.B., Bhusham, B., Beg, Q.K. y Hoondal, G.S. 1999. Partial purification and characterization of a thermostable alkaline protease of an alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27. *Indian J Microbiol* **39**: 185-187.
- Sun, C., Jin, C., Yang, S. y Zhang, S. 1999. Purification and properties of genetic expressing product of thermostable protease from *Bacillus stearothermophilus* HY-69. *Chin J Biotechnol* **15**: 15-21.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. y Clare, B.W. 2002. Bacterial protease inhibitors. *Med Res Rev* **22**: 329-372.
- Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol* **16**: 41-46.
- Sutton, G.C., Russell, N.J. y Quinn, P.J. 1991. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major fosfolipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochim Biophys Acta* **1061**: 235-246.
- Taguchi, H., Hamaaki, M., Matsuzawa, H. y Ohta, T. 1983. Heat-stable extracellular proteolytic enzyme produced by *Thermus caldophilus* strain GK24, an extremely thermophilic bacterium. *J Biochem* **93**: 7-13.
- Takami, H., Akiba, T. y Horikoshi, K. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl Microbiol Biotechnol* **33**: 519-523.
- Takami, H., Akiba, T. y Horikoshi, K. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**: 120-124.
- Takami, H., Akiba, T. y Horikoshi, K. 1992a. Substrate specificity of thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 333-334.
- Takami, H., Akiba, T. y Horikoshi, K. 1992b. Cloning, expression, and characterization of a minor alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 510-511.
- Tampakaki, A.P., Fadoulglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J. y Kokkinidis, M. 2004. Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiol* **6**: 805-816.
- Tan, T.C., Yien, Y.Y., Patel, B.K., Mijts, B.N. y Swaminathan, K. 2003. Crystallization of a novel α -amylase, AmyB, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 2257-2258.

- Tanaka, S. y Iuchi, S. 1971. Induction and repression of an extracellular proteinase in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken J* **14**: 81-96.
- Tang, B., Nirasawa, S., Kitaoka, M. y Hayashi, K. 2002. The role of the N-terminal propeptide of the pro-aminopeptidase processing protease: refolding, processing, and enzyme inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 78-84.
- Tang, X.M., Lakay, F.M., Shen, W., Shao, W.L., Fang, H.Y., Prior, B.A., Wang, Z.X. y Zhuge, J. 2004. Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett* **26**: 1421-1424.
- Tardy-Jacquenod, C., Magot, M., Laigret, F., Kaghad, M., Patel, B.K., Guezennec, J., Matheron, R. y Caumette, P. 1996. *Desulfovibrio gabonensis* sp. nov., a new moderately halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from an oil pipeline. *Int J Sys Bacteriol* **46**: 710-715.
- Tauschek, M., Gorrell, R.J., Strugnell, R.A. y Robins-Browne, R.M. 2002. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7066-7071.
- Taylor, M.A., Baker, K.C., Briggs, G.S., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Pratt, K.A., Revell, D.F., Freedman, R.B. y Goodenough, P.W. 1995. Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV-are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Eng* **8**: 59-62.
- Tegos, G., Vargas, C., Vertholomatos, G., Perysinakis, A., Nieto, J.J. y Drinas, C. 1997. Identification of a promoter region on the *Halomonas elongata* cryptic plasmid pHE1 employing the *inaZ* reporter gene from *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 45-51.
- Terent'ev, L.L., Terenteva, N.A., Romanenko, L.A., Mikhailov, V.V. y Rasskazov V.A. 1998. Nucleoside kinases of marine bacteria: occurrence and properties *Mikrobiologiya* **67**: 496-504.
- Thanassi, D. 2002. Ushers and secretins: channels for the secretion of folded proteins across the bacterial outer membrane. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 11-20.
- Thanassi, D.G., Saulino, E.T. y Hultgren, S.J. 1998. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* **1**: 223-231.
- Thangam, E.B. y Rajkumar, G.S. 2002. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol Appl Biochem* **35**: 149-154.
- Thayer, M.M., Flaherty, K.M. y McKay, D.B. 1991. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution. *J Biol Chem* **266**: 2864-2871.
- Thomas, J.D., Reeves, P.J. y Salmund, G.P. 1997. The general secretion pathway of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: analysis of the membrane topology of OutC and OutF. *Microbiology* **143**: 713-720.

- Thomas, T. y Galinski, E.A. 1996. Anaerobic high-cell-density (HCD) fermentation and cyclic production of compatible solutes with halophilic, denitrifying bacteria. *En Abstracts of the First International Congress on Extremophiles*. Abstr 192. Estoril, Portugal.
- Thongthai, C y Suintanalert, P. 1991. Halophiles in Thai fish sauce (nam pla). *En F. Rodríguez-Valera (ed.), General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*. New York: Plenum Press. pp. 381-388.
- Tindall, B.J. 1988. Prokaryotic life in the alkaline, saline, athalassic environment. *En F. Rodríguez-Valera (ed.), Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 31-67.
- Titani, K., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. y Neurath, H. 1972. Amino-acid sequence of thermolysin. *Nat New Biol* **238**: 35-37.
- Toma, C. y Honma Y. 1996. Cloning and genetic analysis of the *Vibrio cholerae* aminopeptidase gene. *Infect Immun* **64**: 4495-500.
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. y Lazdunski, A. 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **9**: 73-90.
- Trevors, J.T., Oddie, K.M. y Belliveau, B.H. 1985. Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 39-54.
- Trüper, H.G. y Galinski, E.A. 1986. Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Experientia* **42**: 1182-1187.
- Tsai, R.T., Leu, W.M., Chen, L.Y. y Hu, N.T. 2002. A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. *Biochem J*. **367**: 865-871.
- Tsai, Y.C., Lin, Y.T., Li, Y., Yamasaki, M. y Tamura, G. 1986. Characterization of an alkaline elastase from alkalophilic *Bacillus* YA-B. *Biochim Biophys Acta* **883**: 439-447.
- Tsai, Y.C., Lin, Y.T., Yang, Y.B., Li, Y.F., Yamasaki, M. y Tamura, G. 1988. Specificity of alkaline elastase *Bacillus* on the oxidized insulin A- and B-chains. *J Biochem* **104**: 416-420.
- Tsai, Y.C., Yamasaki, M. y Tamura, G. 1984. Substrate specificity of a new alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biochem Int* **8**: 283-288.
- Tsai, Y.C., Yamasaki, M., Yamamoto-Suzuki, Y. y Tamura, G. 1983. A new alkaline elastase of an alkalophilic bacillus. *Biochem Int* **7**: 577-583.
- Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Sakashita, H. y Kimura, T. 1992. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 246-250.
- Tsuchiya, K., Sakashita, H., Nakamura, Y. y Kimura, T. 1991. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agri Biol Chem* **55**: 3125-3127.

- Tsujibo, H., Miyamoto, K., Hasegawa, T. y Inamori, Y. 1990. Purification and characterization of two types of alkaline serine proteases produced by an alkalophilic actinomycete. *J Appl Bacteriol* **69**: 520-529.
- Tsujibo, H., Miyamoto, K., Tanaka, K., Kawai, M., Tainaka, K., Imada, C., Okami, Y. y Inamori, Y. 1993. Cloning and sequence of an alkaline serine protease-encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7. *Gene* **136**: 247-251.
- Tsujibo, H., Miyamoto, K., Tanaka, K., Kaidzu, Y., Imada, C., Okami, Y. y Inamori, Y. 1996. Cloning and sequence analysis of a protease-encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 1284-1288.
- Tsuruoka, N., Nakayama, T., Ashida, M., Hemmi, H., Nakao, M., Minakata, H., Oyama, H., Oda, K. y Nishino, T. 2003. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Appl Environ Microbiol* **69**: 162-169.
- Tyagi, R.D., Sikati Foko, V., Barnabe, S., Vidyarthi, A.S., Valero, J.R. y Surampalli, R.Y. 2002. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Sci Technol* **46**: 247-254.
- Uchida, K. y Kanbe, C. 1993. Occurrence of bacteriophages lytic for *Pediococcus halophilus*, a halophilic lactic-acid bacterium, in soy sauce fermentation. *J Gen Appl Microbiol* **39**: 429-437.
- Ubben, D. y Schmitt, R. 1986. Tn 1721 derivatives for transposons mutagénesis, restriction mapping and nucleotide sequence analysis. *Gene* **41**: 145-152.
- Valderrama, M.J., Quesada, E., Béjar, V., Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. 1991. *Deleya salina* sp. nov., a moderately halophilic Gram-negative bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 377-384.
- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* **6**: 213-218.
- Van Qua, D., Simudu, U. y Taga, N. 1981. Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp. *Can J Microbiol* **27**: 505-510.
- Van Heeke, G., Denslow, S., Watkins, J.R., Wilson, K.J. y Wagner, F.W. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio proteolyticus* aminopeptidase gene. *Biochim Biophys Acta* **1131**: 337-340.
- van Wely, K.H., Swaving, J., Freudl, R., y Driessen, A.J. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 437-454.
- Vargas, C., Calderón, M.I., Capote, N., Carrasco, R., García, R., Morón, M.J., Ventosa, A y Nieto, J.J. 2003. Genetics of osmoadaptation by accumulation of compatible solutes in the moderate halophile *Chromohalobacter salexigens*: its potential in agriculture under osmotic stress conditions. En A. Ventosa (ed.), *Halophilic Microorganisms*. Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 285-295.

- Vargas, C., Coronado, M.J., Ventosa, A. y Nieto, J.J. 1997. Host range, stability, and compatibility of broad host-range plasmids and a shuttle vector in moderately halophilic bacteria. Evidence of intragenic and intergenic conjugation in moderate halophiles. *Syst Appl Microbiol* **20**: 173-181.
- Vargas, C., Fernández-Castillo, R., Cánovas, D., Ventosa, A. y Nieto, J.J. 1995. Isolation of cryptic plasmid from moderately halophilic eubacteria of the genus *Halomonas*. Characterization of a small plasmid from *H. elongata* and its use for shuttle vector construction. *Mol Gen Genet* **246**: 411-418.
- Vasantha, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J. y Filipula, D. 1984. Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyloliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *J Bacteriol* **159**: 811-819.
- Veiga, E., de Lorenzo, V. y Fernández, L.A. 1999. Probing secretion and translocation of a β -autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol* **33**: 1232-1243.
- Venkateswaran, K. y Dohmoto, N. 2000. *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 565-574.
- Ventosa, A. 1988. Taxonomy of moderately halophilic heterophilic eubacteria. En F. Rodríguez-Valera (ed.), *Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 71-84.
- Ventosa, A. 1993. Taxonomy of Gram-positive moderately halophilic cocci. *Experientia* **49**: 1055-1058.
- Ventosa, A. 1994. Taxonomy and phylogeny of moderately halophilic bacteria. En F.G. Priest, A. Ramos-Cormenzana y B.J. Tindall (eds.), *Bacterial Diversity and Systematics*. New York: Plenum Press. pp. 231-242.
- Ventosa, A., Arahál, D.R. y Volcani, B.E. 1999. Studies on the microbiota of the Dead Sea- Fifty years later. En A. Oren (ed.), *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Boca Raton: CRC Press. pp. 139-147.
- Ventosa, A., García, M.T., Kamekura, M., Onishi, H., Ruiz-Berraquero, F. 1989a. *Bacillus halophilus* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species. *Syst Appl Microbiol*. **12**: 162-166.
- Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., García, M.T. y Ruiz-Berraquero, F. 1989b. Classification of "*Chromohalobacter marismortui*" in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **39**: 382-386.
- Ventosa, A., Márquez, M.C., Ruiz-Berraquero, F., Kocur, M. 1990. *Salinicoccus roseus*, gen. nov., sp. nov., a new moderately halophilic Gram-positive coccus. *Syst Appl Microbiol* **13**: 29-33.
- Ventosa, A., Márquez, M.C., Garabito, M.J. y Arahál, D.R. 1998b. Moderately halophilic Gram positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* **2**: 297-304.

- **Ventosa, A., Márquez, M.C., Kocur, M. y Tindall, B.J.** 1993. Comparative study of "*Micrococcus* sp." strains CCM 168 and CCM 1405 and members of the genus *Salinicoccus*. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 245-248.
- **Ventosa, A., Márquez, M.C., Weiss, N. y Tindall, B.J.** 1992. Transfer of *Marinococcus hispanicus* to the genus *Salinicoccus* as *Salinicoccus hispanicus* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* **15**: 530-534.
- **Ventosa, A. y Nieto, J.J.** 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microb Biotechnol* **11**: 85-94.
- **Ventosa, A., Nieto, J.J. y Oren, A.** 1998c. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504-544.
- **Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana.** 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol* **128**: 1959-1968.
- **Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Poindexter, J.S. y Reznikoff, W.S.** 1984. Selection for moderately halophilic bacteria by gradual salinity increases. *Can J Microbiol* **30**: 1279-1282.
- **Ventosa, A., Sánchez-Porro, C., Martín, S. y Mellado, E.** 2005. Halophilic archaea and bacteria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. *En: N. Gunde-Cimerman, A. Oren y A. Plemenitas* (eds.), *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Heidelberg: Springer-Verlag (en prensa).
- **Vezi, A., Campanaro, S., D'Angelo, M., Simonato, F., Vitulo, N., Lauro, F.M., Cestaro, A., Malacrida, G., Simionati, B., Cannata, N., Romualdi, C., Bartlett, D.H. y Valle, G.** 2005. Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* **307**: 1459-1461.
- **Villeret, V., Chessa, J.P., Gerday, C. y Van Beeumen, J.** 1997. Preliminary crystal structure determination of the alkaline protease from the Antarctic psychrophile *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Sci* **6**: 2462-2464.
- **Volcani, B.E.** 1940. Studies on the microflora of the Dead Sea. PhD Thesis. The Hebrew University, Jerusalem.
- **Voorhorst, W.G., Eggen, R.I., Geerling, A.C., Platteeuw, C., Siezen, R.J. y Vos, W.M.** 1996. Isolation and characterization of the hyperthermostable serine protease, pyrolysin, and its gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* **271**: 20426-20431.
- **Voulhoux, R, Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F. y Filloux, A.** 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**: 6735-6741.
- **von Heijne G.** 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**: 17-21.

- **Vreeland, R.H.** 1992. The family *Halomonadaceae*. En A. Ballows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, y K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 2nd ed. Vol IV. New York: Springer-Verlag. pp. 3181-3188.
- **Vreeland, R.H. y Hochstein, L.I.** 1993. (eds.), *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press.
- **Vreeland, R.H. y Martin, E.L.** 1980. Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity on the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Can J Microbiol* **26**: 746-752.
- **Vreeland, R.H., Litchfield, C.D., Martin, E.L. y Elliot, E.** 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 485-495.
- **Waibel, A.H., Hanazawa, T., Hinton, E., Shikano, K. y Lang, K.J.** 1989. Phoneme recognition using Time-Delay Neural Networks. En *IEEE transactions on acoustic, speech and signal processing*. **37**: 328-339.
- **Waino, M. e Ingvorsen, K.** 2003. Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles* **7**: 87-93.
- **Waino, M., Tindall, B.J., Schumann, P. y Ingvorsen, K.** 1999. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **2**: 821-831.
- **Ward, O.P.** 1985. Proteolytic enzymes. En M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology, The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products*. Vol 3. Oxford: Pergamon Press. pp 789-818.
- **Watanabe, K.** 2004. Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**: 520-526.
- **Watanabe, H., Miyoshi, S., Kawase, T., Tomochika, K. y Shinoda, S.** 2004. High growing ability of *Vibrio vulnificus* biotype 1 is essential for production of a toxic metalloprotease causing systemic diseases in humans. *Microbiol Pathog* **36**: 117-123.
- **Wandersman, C.** 1989. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol Microbiol* **3**: 1825-1831.
- **Watson, M.E.E.** 1984. Compilation of published signal sequences. *Nucleic Acids Res* **12**: 5145-5164.
- **Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A. y Turner, R.J.** 1998. A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**: 93-101.
- **Weiss, A.A., Johnson, F.D. y Burns, D.L.** 1993. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2970-2974.
- **Wetmore, D.R., Wong, S.L. y Roche, R.S.** 1992. The role of the pro-sequence in the processing and secretion of the thermolysin-like neutral protease from *Bacillus cereus*. *Mol Microbiol* **6**: 1593-1604.

- Whooley, M.A., O'Callaghan, J.A. y McLoughlin, A.J. 1983. Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *J Gen Microbiol* **129**: 981-988.
- Wiersma, M., Hansen, T.A. y Harder, W. 1978. Effect of environmental conditions on the production of two extracellular proteolytic enzymes by *Vibrio* SA1. *Antonie van Leeuwenhoek* **44**: 129-140.
- Williams, W.D. 1981. Inland salt lakes: an introduction. *Hydrobiology* **81**: 1-14.
- Winkler, U.K. y Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **138**: 663-670.
- Winther, J.R., Sorensen, P. y Kielland-Brandt, M.C. 1994. Refolding of a carboxypeptidase Y folding intermediate in vitro by low-affinity binding of the proregion. *J Biol Chem* **269**: 22007-22013.
- Wintrode, P.L., Miyazaki, K. y Arnold, F.H. 2000. Cold adaptation of a mesophilic subtilisin-like protease by laboratory evolution. *J Biol Chem* **275**: 31635-31640.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Woese, C.R. y Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5088-5090.
- Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R. y Noller, H.F. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol Rev.* **47**: 621-69.
- Woessner, J.F. 1998. *Legionella* metalloendopeptidase. En A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner (eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes (CD-ROM). Chapter 358. London: Academic Press.
- Wohlfart, A., Severin, J. y Galinski, E.A. 1990. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *J Gen Microbiol* **136**: 705-712.
- Wolz, R.L. 1999. Strategies for inhibiting proteases of unknown mechanism. En E.E. Sterchi y W. Stöker (eds.), Proteolytic Enzymes. Tool and targets. New York: Springer. pp. 90-108.
- Woolard, C.R. y Irvine, R.L. 1992. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Abstr Ann Water Environ Fed Conf.* New Orleans, USA.
- Wu, W., Badrane, H., Arora, S., Baker, H.V. y Jin, S. 2004a. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**: 7575-7585.
- Wu, J., Bian, Y., Tang, B., Chen, X., Shen, P. y Peng, Z. 2004b. Cloning and analysis of WF146 protease, a novel thermophilic subtilisin-like protease with four inserted surface loops. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 251-258.
- Wu, L.F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y. y Fichant, G. 2000. Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 179-189.

- Yahr, T.L., Mende-Mueller, L.M., Friese, M.B. y Frank, D.W. 1997. Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **179**: 7165-7168.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Wagner, F., Moore, E., Abraham, W.R., y Timmis, K.N. 1996. New moderately halophilic marine strain MM1 produces novel class of biosurfactants. *En Abstracts of the First International Congress on Extremophiles*. Abstr 182. Estoril, Portugal.
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. y Tanaka, N. 2002. The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nat Struct Biol* **9**: 691-695.
- Yanagida, N., Uozumi, T. y Beppu, T. 1986. Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **166**: 937-944.
- Yaphe, W. 1957. The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (*Rhodophyceae*). *Can J Microbiol* **3**: 987-993.
- Yeats, C., Bentley, S. y Bateman, A. 2003. New knowledge from old: in silico discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiol* **3**: 3.
- Yeon, S.H., Jeong, W.J. y Park, J.S. 2005. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J Microbiol* **43**: 1-10.
- Yoon, J.H., Lee, K.C., Kho, Y.H., Kang, K.H., Kim, C.J. y Park, Y.H. 2002. *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 123-130.
- Yoshikawa, M., Matsuda, F., Naka, M., Murofushi, E. y Tsunematsu, Y. 1974. Pleiotropic alteration of activities of several toxins and enzymes in mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **119**: 117-122.
- Yu, T.X. 1991. Protease of haloalkalophiles, *En* K. Horikoshi and W.D. Grant (eds.), Superbugs. Microorganisms in Extreme Environments. Tokyo: Springer-Verlag. pp. 76-83.
- Yum, D.Y., Chung, H.C., Bai, D.H., Oh, D.H. y Yu, J.H. 1994. Purification and characterization of alkaline serine protease from an alkalophilic *Streptomyces* sp. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**: 470-474.
- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N. y Eisenberg, H. 1989. Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J Mol Biol* **208**: 491-500.
- Zeikus, J.G., Hegge, P.W., Thompson, T.E., Phelps, T.J. y Langworthy, T.A. 1983. Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov. and sp. nov., an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments. *Curr Microbiol* **9**: 225-234.
- Zeng, R., Zhang, R., Zhao, J. y Lin, N. 2003. Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: enzyme purification and characterization. *Extremophiles* **7**: 335-337.

- Zhang, Z.Z., Nirasawa, S., Nakajima, Y., Yoshida, M., Kusakabe, I. y Hayashi, K. 2001. Characterization of the pro-aminopeptidase from *Aeromonas caviae* T-64. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 420-423.
- Zhang, Z.Z., Nirasawa, S., Nakajima, Y., Yoshida, M. y Hayashi, K. 2000. Function of the N-terminal propeptide of an aminopeptidase from *Vibrio proteolyticus*. *Biochem J* **350**: 671-676.
- Zhang, W., Xue, Y., Ma, Y., Grant, W.D., Ventosa, A. y Zhou, P. 2002a. *Marinospirillum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphilic helical bacterium from Haoji soda lake in Inner Mongolia Autonomous Region of China. *Extremophiles* **6**: 33-37.
- Zhang, W., Xue, Y., Ma, Y., Zhou, P., Ventosa, A. y Grant W.D. 2002b. *Salinicoccus alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphile and moderate halophile from Baer Soda Lake, in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 789-793.
- Zhilina, T.N. y Zavarzin, G.A. 1990. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **87**: 315-322.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. y Winans, S.C. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol* **182**: 3885-3895.
- Zink, S.D., Pedersen, L., Cianciotto, N.P. y Abu-Kwaik, Y. 2002. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun* **70**: 1657-1663.
- ZoBell, C.E. y Upham, H.C. 1944. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bull Scripps Inst Oceanogr* **5**: 239-292.
- Zuker, M., Mathews, D.H. y Turner, D.H. 1999. J. Barciszewski y B.F.C. Clark (eds.), Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology, Kluwer Academic Publishers.