

## **4. METODOLOGÍA**



## 4.1. CEPAS BACTERIANAS ESTUDIADAS

### 4.1.1. Muestras de origen antártico

Las muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislamientos bacterianos estudiados en la presente Memoria Doctoral proceden de tres zonas de la Antártida: Johnson's Dock y Chlorite Bay en la isla de Livingston, donde se encuentra la Base Antártica Española "Juan Carlos I", y Admiralty Bay situada en la isla del Rey Jorge. Concretamente las islas de Livingston y del Rey Jorge son las de mayor superficie dentro del conjunto de las Shetland del Sur.

Un primer grupo de muestras proceden de Johnson's Dock e Inlet Admiralty Bay y fueron tomadas durante el verano austral de 1987-1988. Concretamente las de la cala Johnson proceden de sedimentos del fondo, además del producto resultante del filtrado de 25 litros de agua a través de diversos filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro. Las muestras se guardaron en recipientes estériles sin adición de ningún tipo de medio de cultivo. La muestra procedente de Inlet Admiralty Bay corresponde a un lodo glaciar recogido en una zona donde el hielo y la tierra se mezclan, de ahí su aspecto de lodo. La muestra fue extraída del hielo de forma aséptica e introducida en un recipiente adecuado para su transporte.

Un segundo grupo de muestras, concretamente de aguas, fue tomado durante el verano austral de 1988-1989, en una zona de deshielo de un glaciar en Johnson's Dock.

El último grupo de muestras procede de sedimentos de Chlorite Bay, en la Península de Byers, y fueron recogidas durante el verano austral de 1990-1991. Al igual que en los casos anteriores las muestras fueron introducidas asépticamente en recipientes estériles sin medio de cultivo.

#### 4.1.2. Aislamiento de los biotipos bacterianos estudiados

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron los siguientes medios de cultivo sólidos:

1. TSA, Triptona Soja Agar
2. TSA con Agua de Mar Artificial
3. Sabouraud glucosado Agar
4. Medio de Goodfellow:

Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	1
FePO <sub>4</sub>	0.01
Agua de Mar Artificial	42
Agar	15 g/L

pH 7.2

En el caso del primer grupo de muestras (verano austral 1987-1988) se procedió a la dilución de alícuotas en tubos de Ringer 1/4 con 1, 2 y 3 mL de la solución. A partir de las diluciones y tras su correcta homogenización se procedió a la siembra en los medios de cultivo.

El segundo y el tercer grupo de muestras, correspondientes a las campañas del verano austral 1988-1989 y 1990-1991 respectivamente, fueron sembrados directamente en los distintos medios de cultivo.

Tras una primera incubación a 11 °C durante un período de 6 d se procedió a la selección de las colonias aparecidas en función de su morfología y la respuesta a la tinción de Gram. Los biotipos seleccionados se sometieron a sucesivas resiembras sobre TSA y TSA con agua de mar artificial para asegurar la obtención de cultivos puros. Las condiciones iniciales de incubación durante las resiembras fueron siempre de 6 d a 11 °C. A los tres días las colonias ya estaban bien formadas pero aquellas que eran pigmentadas no daban su coloración característica hasta los 6 días.

La denominación de cada una de las cepas aisladas, así como las muestras a partir de las cuales proceden y los lugares de toma de las muestras, se señalan en la tabla 4.1. que se muestra a continuación.

**Tabla 4.1.** Relación de aislamientos obtenidos, muestras de las que proceden y lugares de origen de las muestras.

<b>CEPA</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>ORIGEN MUESTRA</b>
<b>NF1</b>	Lodo glaciario	Inlet Admiralty Bay
<b>NF7</b>	Lodo glaciario	Inlet Admiralty Bay
<b>NF8</b>	Lodo glaciario	Inlet Admiralty Bay
<b>NF11</b>	Lodo glaciario	Inlet Admiralty Bay
<b>NF12</b>	Lodo glaciario	Inlet Admiralty Bay
<b>NF18</b>	Filtrado de 25 L de agua	Cala Johnson
<b>NF19</b>	Filtrado de 25 L de agua	Cala Johnson
<b>NF20</b>	Filtrado de 25 L de agua	Cala Johnson
<b>NF22</b>	Filtrado de 25 L de agua	Cala Johnson
<b>NF23</b>	Sedimentos	Cala Johnson
<b>NF24</b>	Sedimentos	Cala Johnson
<b>EN1</b>	Agua de deshielo	Cala Johnson
<b>EN2</b>	Agua de deshielo	Cala Johnson
<b>EN4</b>	Agua de deshielo	Cala Johnson
<b>20 CM</b>	Sedimentos	Chlorite Lake
<b>20 CO</b>	Sedimentos	Chlorite Lake

#### **4.1.3. Mantenimiento de la microbiota aislada**

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo y mantenimiento de los microorganismos ha sido el TSA. Las resiembras de los biotipos bacterianos se realizan habitualmente en tubos de TSA inclinados correctamente oxigenados. Los cultivos se incuban a 15 °C durante 48 h.

Normalmente las resiembras de los aislamientos bacterianos de origen antártico se realizan cada 15 d y se mantienen en nevera a 4 °C. Como indica Morita (1975), los cultivos stock de las bacterias psicrófilas y psicotrofas deben ser resemebrados frecuentemente, ya que la temperatura de los refrigeradores de laboratorio suele quedar cercana a la temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos.

Los distintos biotipos aislados se mantienen mediante multicopias congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  utilizando para ello cultivos en medio líquido, TSB (Caldo de triptona soja), a los que se ha añadido un agente crioprotector. En este caso el crioprotector utilizado ha sido dimetilsulfoxido (DMSO) que se añade en una proporción de 0.9 mL por cada 10 mL de cultivo. Para facilitar su almacenamiento y manipulación se reparte en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorfs estériles.

También ha sido utilizado el sistema de mantenimiento en CRYOBILLES (AES, AEB400100, Combourg, France) para mantener los biotipos bacterianos congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **4.2. MORFOLOGÍA**

### **4.2.1. Tinciones**

#### **4.2.1.1. TINCIÓN DE GRAM**

Las bacterias se dividen fundamentalmente en dos grandes grupos en función de la respuesta que presentan frente a la tinción de Gram (Bartholomew, 1962) que permite distinguir dos tipos de estructura de pared celular.

Para determinar la reacción de Gram se ha utilizado el método de Gram modificado por Hucker (1923), en el cual se emplea el cristal violeta de Hucker, una solución de lugol como mordiente y una solución de safranina como colorante de contraste.

#### **4.2.1.2. MÉTODO DE MUIR**

Para determinar la presencia de material capsular se hizo una tinción de cápsula según el método de Muir tal como describe Cowan & Steel's (1993).

La cápsula se tiñe con el mordiente de Muir mientras que las bacterias son contrastadas con una solución de fucsina.

Esta tinción se ha practicado sobre los microorganismos desarrollados en TSA a 15 °C durante 6 d.

#### **4.2.1.3. TINCIÓN DE TINTA CHINA**

Otra tinción realizada para ver la presencia de cápsula en los microorganismos es la de la tinta china. Para ello se prepara una suspensión del microorganismo problema en una gota de glucosa al 6 % sobre un portaobjetos, se añade una gota de tinta china y se mezcla con la suspensión bacteriana. Una vez seca la extensión al aire, sin calentar, se cubre con metanol y se fija a la llama. A continuación se tiñe con azul de metileno durante 1-2 min, se lava con agua y se seca.

La preparación se observa con el objetivo de inmersión de manera que si el microorganismo tiene cápsula las células bacterianas se ven grises y rodeadas de un halo azul pálido. El fondo de la preparación queda negro.

Para la realización del ensayo se han utilizado cultivos sólidos desarrollados en el medio de TSA durante 6 d a 15 °C.

#### **4.2.1.4. TINCIÓN DE ESPORAS**

Para determinar la presencia de esporas en los cultivos bacterianos se utilizó la tinción de esporas según Schaeffer y Fulton (1933), que utiliza verde de malaquita para la tinción de la espora y una solución de safranina como colorante de contraste.

### ***4.2.2. Estudio de la morfología***

#### **4.2.2.1. CULTIVOS BACTERIANOS EN MEDIOS LÍQUIDOS**

La morfología celular se observó en el microscopio óptico a partir de cultivos líquidos. Para ello se inocularon tubos con 10 mL de caldo TSB. Los cultivos se incubaron estáticamente a 15 °C y se realizaron observaciones a partir de las 7 h de incubación hasta los 6 d.

Se visualizaron dos tipos de preparaciones, las de gota pendiente a partir del cultivo fresco, que fueron examinadas en el microscopio de contraste de fases, y las correspondientes a tinciones de Gram.

#### **4.2.2.2. CULTIVOS BACTERIANOS EN MEDIOS SÓLIDOS**

A partir de cultivos sólidos se estudio la morfología colonial y la morfología celular. Se utilizó el TSA como medio de cultivo.

Las placas se incubaron a 15 °C y fueron examinadas a partir de los 2 d de incubación hasta los 6-7 d, momento en el que se realizaron tinciones de Gram para el estudio de la morfología celular.

#### **4.2.3. Movilidad**

Para determinar la movilidad de los microorganismos se han utilizado dos procedimientos. El primero ha consistido en la observación directa de cultivos líquidos mediante el microscopio de contraste de fases, igual como se ha descrito en el apartado 4.2.2.1).

El segundo método utilizado ha consistido en la observación del desarrollo de los microorganismos en un medio de cultivo semisólido. Para ello, los microorganismos se inoculan en profundidad, de manera que tras el período de incubación los microorganismos inmóviles sólo crecerán a lo largo de la estría, mientras que los móviles podrán emigrar de la línea de inoculación y originar una turbidez en las zonas que la rodean.

El medio de cultivo semisólido empleado es el indicado por Cowan & Steel's (1993):

Gelatina	80
Peptona	10
Extracto de Carne	3
NaCl	5
Agar-Agar	4 g/L



El medio de cultivo se reparte a razón de 10 mL por tubo y se esteriliza en autoclave a 121 °C, 20 min.

La siembra de los microorganismos se realiza en profundidad hasta la mitad del tubo y se incuba durante 5 d a 15 °C. A partir de aquí se observa el desarrollo de los microorganismos a lo largo de todo el tubo o solamente en la zona del inóculo. La extensión del crecimiento delatará la movilidad del microorganismo que se examina.

#### **4.2.4. Microscopía electrónica**

##### **4.2.4.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MES)**

Para profundizar en la morfología celular se han realizado también estudios de microscopía electrónica de barrido. Para ello se han seguido las técnicas habituales de fijación, deshidratación, secado por punto crítico y recubrimiento en oro.

Como material de partida se ha resuspendido una pequeña cantidad de biomasa celular, obtenida a partir de placas de TSA incubadas durante 48 h a 15 °C, en 1 mL de tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4. También se han utilizado cultivos líquidos en TSB incubados durante 24 h a 15 °C y 150 rpm, en este caso el crecimiento se centrifuga a 6000 rpm durante 15 min y antes de resuspender las células en el tampón fosfato se lavan dos veces con una solución de Ringer 1/4.

Las células resuspendidas en tampón fosfato se dejan 10 min a 4 °C y a continuación se centrifugan a 6.000 rpm durante 15 min. El proceso de lavado con tampón fosfato se repite dos veces más.

La fijación de las células se realiza añadiendo glutaraldehído al 2.5 % en tampón fosfato de sodio 0.1 M y dejándolas en contacto con la solución fijadora durante 1 h a 4 °C. Una vez concluido este período se elimina la solución fijadora y se efectúan 4 lavados con el tampón fosfato de sodio. Finalmente se efectúan dos lavados de 10 min a 4 °C con agua destilada antes de proceder a la deshidratación.

Las células bacterianas se deshidratan mediante pases de 10 minutos por una serie de alcoholes, resuspendiendo y centrifugando cada vez. Se empieza con un pase en

alcohol al 50 %, 60 %, 70 % y 90 %, dos pases en alcohol de 95 % y finalmente dos pases en alcohol absoluto.

Posteriormente las células se someten a un secado por punto crítico en un POLARON E 300 y recubrimiento en oro en un POLARON E 500. Las preparaciones se observan en un microscopio electrónico de barrido Hitachi modelo S-3200 y Hitachi H-2300.

Para el aislamiento bacteriano 20CM también se han preparado muestras para la observación mediante microscopía electrónica de barrido utilizando poly-L-lisina (Nagarajan y Bates, 1981; Marchant y Thomas, 1983). Como material de partida se han utilizado cultivos desarrollados sobre TSA durante 72 h de incubación, a partir de los que se preparan suspensiones bacterianas en Ringer  $\frac{1}{4}$ .

En este caso, una gota de poly-L-Lisina al 0.1 % se deposita sobre un cubreobjetos redondo, dejándolo 1 min a temperatura ambiente. Seguidamente se lava el cubreobjetos por inmersión durante 30 seg con agua destilada y posteriormente se deja secar al aire, pero cubierto para evitar el polvo.

Una gota de la suspensión bacteriana se coloca sobre el cubreobjetos durante 10-30 min. Seguidamente se realizan varios lavados suaves con agua destilada y se procesa el cubreobjetos para microscopía electrónica de barrido tal como se ha indicado anteriormente, por deshidratación y secado por punto crítico. Las observaciones se han realizado en un microscopio electrónico de barrido modelo Hitachi 4100 FE.

#### **4.2.4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN**

Mediante microscopía electrónica de transmisión se ha podido profundizar en el estudio de la ultraestructura de las bacterias y en el estudio de los flagelos. En el primer caso, las células bacterianas se incluyen en bloques de resina Spurr para la obtención de cortes ultrafinos, que son los que se observarán al microscopio electrónico. En cambio, para la observación de flagelos se utilizan técnicas de tinción negativa sobre células bacterianas enteras.

Para el estudio de la ultraestructura del aislamiento bacteriano 20CM también se ha empleado la técnica de criofijación por alta presión o “High pressure freezing”, antes de la inclusión de las células en la resina Epon, para la obtención posterior de cortes ultrafinos (Apartado 4.2.4.2.2.).

#### **4.2.4.2.1. Cortes ultrafinos**

El proceso de obtención de cortes ultrafinos para su observación en el microscopio electrónico de transmisión es laborioso y comprende varias etapas que se resumen a continuación:

##### **1. Obtención de cultivos celulares**

Como material de partida para la preparación de las muestras se utilizan cultivos de 250 mL en TSB de 24 h de incubación y agitación orbital (150 rpm). El matraz Erlenmeyer se inocula a su vez con 5 mL de una suspensión bacteriana en Ringer ¼, obtenida a partir del crecimiento bacteriano en un tubo de TSA de 48 h de incubación a 15 °C.

Las células se recogen por centrifugación a 6.000 rpm, 15 min a 10 °C. El sedimento se resuspende en 25 mL de Ringer ¼ y se transfieren 1.5 mL de la suspensión a un tubo Eppendorf, preparándose así tres viales. A continuación se centrifuga y se lava con una solución de tampón fosfato sódico 0.1 M a pH 7.4 para luego proceder a la fijación de las células bacterianas.

##### **2. Fijación de las células bacterianas**

La fijación se realiza con una solución de paraformaldehído 2 % - glutaraldehído 2.5 % en tampón fosfato de sodio 0.1 M a pH 7.4. Las bacterias se resuspenden en la solución fijadora y se dejan en nevera a 4 °C durante 3 h. Tras la fijación se practican sucesivos lavados durante un período de 3 h con tampón fosfato de sodio 0.1 M.

### 3. Tinción de las células bacterianas

Las células lavadas se someten a tinción con tetróxido de osmio al 1 % en tampón fosfato de sodio 0.1 M, durante 1 h a 4 °C y preservando los viales de la luz.

Para eliminar el osmio se realizan sucesivos lavados de las células con agua destilada durante unas cuatro horas, desechando cada vez el sobrenadante. En los últimos lavados no se resuspenden las células y simplemente se cambia el agua utilizándose una velocidad de centrifugación superior (10.000 rpm) para obtener un sedimento muy compacto en el fondo del tubo Eppendorf.

### 4. Deshidratación de las células bacterianas

A continuación se efectúa la deshidratación utilizando disoluciones de acetona; se inicia el proceso con acetona al 50 % y después al 70 %, 90 %, 96 % y por último al 100 %. Se realizan tres tratamientos de 10 min para cada concentración de acetona. Todos los lavados se realizan sin resuspender nunca las células, las cuales deben estar bien compactas en el fondo del tubo Eppendorf.

### 5. Inclusión de las bacterias en resina Spurr (1969)

La resina Spurr de dureza normal presenta los siguientes componentes:

<b>NSA</b> (Endurecedor) (Nonenyl succinic anhydride, Fluka)	26.0 g
<b>D.E.R. 736</b> (Flexibilizador) (Diglycidyl ether of polypropylene glycol, Fluka)	6.0 g
<b>DMAE o S-1</b> (Acelerador) (Dimethyl amino etanol, Fluka)	0.4 g
<b>DBP</b> (Plastificante) (Dibutyl phthalate, Fluka)	0.8 g

Los componentes, una vez pesados, se mezclan bien con un agitador magnético o con una varilla de vidrio. En el caso de que en este paso se formen burbujas, la resina se deja reposar dentro o fuera de la estufa hasta que estas desaparezcan. Para obtener

una resina más o menos dura que la estándar solamente hay que modificar la cantidad del componente DER.

Las células se tratan durante 4 h con una dilución 1:3 de resina Spurr:acetona, luego 4 h más con resina Spurr 2: acetona 2 y 6 h más con resina Spurr 3: acetona 1. Los siguientes pasos se realizan con resina pura; primero 5 h, a continuación se cambia y se deja toda la noche en agitación lenta y finalmente se realiza un pase de 4 h. Tras la inclusión, se procede a la confección de los bloques en unos moldes adecuados que se llenan de resina y en uno de los extremos se deposita una pequeña fracción de la muestra embebida en la resina. Para permitir la polimerización de la resina se introducen los moldes con los bloques en una estufa a 60 °C durante 48 h.

#### 6. Piramidado de los bloques de resina, obtención de cortes semifinos y ultrafinos

Una vez que los bloques están bien polimerizados se confeccionan pirámides truncadas en un piramitomo (Reichert, MT 60 Piramiton), con objeto de preparar el extremo del bloque por donde se efectuarán los cortes.

Para cortar se utilizan cuchillas de vidrio. Es necesario montar sobre ellas un pocillo con la ayuda de una cinta metálica impermeable y parafina, ésta última permite cerrar bien el pocillo que debe llenarse de agua para que los cortes que se realicen después con el ultramicrotomo queden flotando en ella.

Los cortes semifinos y ultrafinos se llevan a cabo en un mediante cuchillas de vidrio recién preparadas. Primero se hacen cortes semifinos para saber si la muestra se ha preparado correctamente. Los cortes se fijan sobre un porta, se tiñen con azul de metileno y se observan al microscopio óptico a 40 aumentos. Si la muestra se ha preparado correctamente se procede a realizar los cortes ultrafinos que se van recogiendo sobre rejillas de cobre.

#### 7. Contrastado de los cortes y observación al microscopio electrónico de transmisión

Para la observación de los cortes debe procederse al contrastado, primero con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2 % durante 30 min, lavado con agua destilada y posteriormente contrastando con la solución de Reynolds durante 10 min.

La composición de la solución de Reynolds es la siguiente:

Pb(NO) <sub>2</sub>	1.33 g
Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )·H <sub>2</sub> O	1.76 g
H <sub>2</sub> O	30 mL

Agitar 30 min y añadir:

NaOH 1N	8 mL
H <sub>2</sub> O hervida c.s.p.	50 mL

Las muestras se han observado en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301 y Hitachi H600 AB.

#### 4.2.4.2.2. Criofijación por alta presión

El material de partida para la preparación de las muestras fueron cultivos en TSA de 72 h de incubación a 15 °C. El protocolo de preparación de las muestras se detalla a continuación:

1. Criofijación por alta presión con el equipo Leica EM Pact a una presión de 2.020 bares y un descenso de la temperatura de 7.500-8000 °C/seg.
2. Criosustitución del hielo por acetona conteniendo 2 % de tetróxido de osmio y 0.1 % de acetato de uranilo. El proceso tiene lugar a -90 °C durante 72 h.
3. Aumento de la temperatura a 5 °C por hora hasta llegar a 4 °C. Se deja 2 h a 4 °C y a continuación 2 h a temperatura ambiente.
4. Lavados a temperatura ambiente con acetona durante una hora.

## 5. Infiltración en resina Epon:

Resina : Acetona	Tiempo
1 : 3	3 horas
2 : 2	3 horas
3 : 1	noche
Epon puro	8 horas
Epon puro	noche
Epon puro	8 horas
Epon puro	noche

## 6. Polimerización de la resina durante 48 horas a 60 °C.

7. Una vez polimerizados los bloques se piramidizan para obtener una cara pequeña a partir de la cual se realizan los cortes semifinos de 1µm para poder localizar la zona deseada en un microscopio óptico. Posteriormente se realizan cortes ultrafinos, de 50-60 nm que se recogen en rejillas de cobre recubiertas con Formvar y carbono.

8. Las secciones obtenidas se contrastan con acetato de uranilo al 2 % en agua durante 30 min a temperatura ambiente.

9. Lavado de la muestra con abundante agua y contrastado de la muestra con citrato de plomo durante 5-6 min en presencia de lentejas de NaOH y en una atmósfera cerrada en ausencia de CO<sub>2</sub>.

10. Observación de los cortes en el microscopio electrónico de transmisión a 80 Kv. Las placas fotográficas se escanean y procesan mediante el programa IMAT de los Servicios Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona.

**4.2.4.2.3. Tinciones negativas**

Las tinciones negativas de bacterias permiten dilucidar la estructura, forma y disposición de los flagelos y fimbrias que puedan presentar las células bacterianas (Glauert y *col.*, 1963; Duguid, 1959; Thornley y Horne, 1962).

Las tinciones negativas se han efectuado según el método descrito por Brenner y Horne (1959), utilizando ácido fosfotúngstico.

Para la realización de las tinciones negativas se han utilizado cultivos líquidos en TSB de 24 h de incubación a 15 °C y en el caso de los aislamientos 20CM y 20CO de 48 horas a 15 °C. El caldo de cultivo se centrifuga a 6.000 rpm, 15 min a 10 °C y se hace un lavado con Ringer ¼ dejando que las células se resuspendan libremente, sin agitar, para evitar que los flagelos se desprendan de la bacteria. Normalmente la turbidez resultante suele ser suficiente. Como material de partida se toman 2 mL de la suspensión, si esta fuera muy densa se añade más Ringer ¼ para diluir.

Como soporte para preparar las tinciones negativas se utilizan rejillas con membrana de carbón que se despolarizan durante 30 seg a 500 voltios y en corriente continua.

Sobre la membrana despolarizada se coloca una pequeña gota de la suspensión bacteriana (5 µL) que se deja durante 1 min. A continuación se elimina el exceso de gota con un papel de filtro y se deja secar durante 2 min. Añadimos luego una gota (5 µL) de ácido fosfotúngstico al 2 % pH 7.2 (ajustado con KOH 0.1 N) que se deja durante 1 min en contacto con la preparación. El exceso se retira también con la ayuda de un papel de filtro, quedando las muestras listas para su observación al microscopio.

Las tinciones negativas así preparadas han sido observadas en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H 600 AB.

También se han realizado tinciones negativas utilizando ácido fosfotúngstico al 0.5 % pH 6.0 (ajustado con KOH 0.1 N). En este caso las observaciones se han realizado en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301.

### **4.3. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS**

#### ***4.3.1. Rango de temperatura de crecimiento***

Para determinar el rango de temperaturas en el que se desarrollan los microorganismos estudiados se utilizó un medio de cultivo sólido como el TSA.



El rango de temperaturas de incubación estudiado osciló entre los 4 °C y los 40 °C. Cada biotipo bacteriano se inoculó mediante estría superficial en placa de TSA para determinar su crecimiento, el cual fue observado a partir de las 24 h hasta los 14 d dependiendo de la temperatura de incubación.

#### **4.3.2. Rango de tolerancia de pH**

El estudio del intervalo de tolerancia de pH se ha realizado modificando el pH del medio de cultivo, en este caso TSB, en un rango de valores que ha oscilado entre 4 y 10.

Para la realización del ensayo se preparan soluciones de TSB cuyo pH se ajusta añadiendo HCl 1N para la obtención de valores ácidos y NaOH 1N para los valores básicos. Estas soluciones se esterilizan en autoclave en las condiciones habituales (121 °C, 20 min) y posteriormente se toman alícuotas de cada solución para volver a comprobar los valores de pH que se tomarán como definitivos. Las distintas soluciones de TSB se reparten en placas de microtiter en cantidades de 200µL por pocillo.

Para la preparación de los inóculos de cada una de las cepas se utilizan tubos de Ringer 1/4 con 2 mL de solución, de manera que se obtengan suspensiones de una turbidez igual a 1 de la escala de McFarland. Para inocular los tubos de Ringer ¼ se utilizan cultivos en TSA de 3 d a 15 °C.

Una vez preparadas las suspensiones bacterianas se inocula la placa microtiter con 10µL de la suspensión bacteriana por pocillo. Los cultivos se incuban a 15 °C durante 14 d revisando los resultados a partir del tercer día.

Como control del medio se deja un pocillo de cada valor de pH sin inocular. Para el control de la turbidez se inocula un pocillo de Ringer ¼ para poder comparar si la turbidez es debida al inóculo o al desarrollo bacteriano.

### 4.3.3. Tolerancia al NaCl

El estudio de la tolerancia al NaCl se realizó corrigiendo la cantidad de dicha sal en TSA hasta alcanzar las concentraciones deseadas. El rango de concentraciones ensayadas varió desde el 0.6 % hasta el 20 % (p/v).

Los distintos medios inoculados se incubaron a 15 °C, revisándose los resultados diariamente hasta los 25 d de incubación.

### 4.3.4. Requerimiento de ión Na<sup>+</sup>

Mediante este ensayo se estudia la necesidad del aporte del ión Na<sup>+</sup> al medio de cultivo para el desarrollo del microorganismo. La composición del medio de cultivo sólido diseñado para determinar si existe requerimiento de Na<sup>+</sup> es la siguiente:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.028	
CaCl <sub>2</sub>	0.05	
NH <sub>4</sub> Cl	7	
Extracto de levadura	5	
Agar-Agar	20 g/L	pH 7.0

Para la elaboración del medio de cultivo se disuelven todos los componentes, a excepción del CaCl<sub>2</sub> y del FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y se esterilizan a 121 °C, 20 min. De los dos componentes restantes se preparan soluciones concentradas de 0.05 g/mL para el CaCl<sub>2</sub> y 0.028 g/mL para el FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, que se esterilizan en autoclave y por filtración, respectivamente. Después se añaden de forma aséptica a razón de 0.1 mL a la solución principal.

Paralelamente se preparan dos medios control que contienen 1 y 5 g de NaCl respectivamente, añadidos a la fórmula original. Estos medios permiten asegurar los resultados que se obtengan con el medio citado en primer lugar y que carece de NaCl.

Los microorganismos se inoculan en los tres medios de cultivo y se incuban durante 14 d a 15 °C, leyendo los resultados a partir del segundo día.

#### **4.3.5. Tolerancia a las sales biliares**

En el grupo de aislamientos constituido por los biotipos bacterianos de morfología cocobacilar NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4, se determinó la tolerancia a las sales biliares.

El ensayo se realizó sobre placas de Agar Nutritivo corregido con diversas concentraciones de sales biliares. Las concentraciones de sales biliares estudiadas fueron del 0.5, 3, 4, y 5 % (p/v).

Los aislamientos bacterianos fueron sembrados mediante estría superficial incubándose las placas a 15 °C. Los resultados fueron revisados diariamente a partir del segundo día de incubación hasta los 31 d.

Para el control del ensayo se utilizaron las cepas tipo *Psychrobacter immobilis* CECT 5008<sup>T</sup>, *Psychrobacter frigidicola* ACAM 304<sup>T</sup>, *Psychrobacter urativorans* ACAM 534<sup>T</sup> y *Psychrobacter glacincola* ACAM 483<sup>T</sup>. Las placas correspondientes se incubaron también a 15 °C, temperatura próxima a la óptima para las distintas cepas tipo, y se hicieron lecturas de los resultados diariamente a partir del segundo día de incubación hasta un máximo de 31 d según la cepa.

#### **4.3.6. Crecimiento en presencia de lisozima**

La resistencia a lisozima se determinó según Claus y Berkeley (1986) en los dos únicos aislamientos esporulados estudiados. Para ello se utilizaron placas de Agar Nutritivo con concentraciones de lisozima del 0.01 % y del 0.001 % (p/v).

Para la elaboración del medio de cultivo la lisozima se prepara en solución acuosa y se esteriliza por filtración. Luego se añade sobre Agar Nutritivo estéril mantenido a 45 °C y se reparte en placas de Petri.

Los biotipos bacterianos se siembran mediante estría superficial, incubándose las placas durante 14 d a 15 °C.

### **4.3.7. Producción de ácido a partir de carbohidratos**

#### **4.3.7.1. OXIDACIÓN Y/O FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA**

Para determinar la vía de degradación oxidativa y/o fermentativa de la glucosa se utilizó el medio O/F (DIFCO) descrito por Hugh y Leifson (1953).

El medio de cultivo se distribuye en tubos estrechos de 10 mm de diámetro y se inocula con la cepa problema en profundidad y por duplicado. Uno de los dos tubos se cubre con una capa de vaselina estéril para crear una atmósfera sin oxígeno y luego se incuban durante 14 d a 15 °C, revisando los virajes del indicador del medio de cultivo diariamente. La producción de ácido a partir de glucosa se manifiesta por un viraje de color verde a amarillo.

#### **4.3.7.2. OXIDACIÓN Y/O FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO MOF**

La producción de ácido a partir de carbohidratos, en dos de los grupos de aislamientos antárticos, se ensayo en el medio MOF (Leifson, 1963), diseñado para la determinación del metabolismo de carbohidratos en bacterias marinas.

La composición por 100 mL del medio MOF corresponde a % (p/v):

Casitona	0.1
Extracto de levadura	0.01
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.05
Tampón Tris	0.05
Agar-agar	0.3
Rojo fenol	0.001 (1.0 mL de una solución acuosa del 0.1%)

Ajustar el pH a 7.5 con HCl (Aprox. 0.3 mL de HCl 1N por 100 mL de medio)

Agua de mar artificial 1/2 concentrada	
Carbohidrato	0.5 - 1.0

Todos los ingredientes del medio excepto la fuente de carbono y el agua de mar se disuelven en agua destilada para una concentración doble y se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 20 min. El pH después de autoclavar debe ser aproximadamente de 8, si hay mucha variación debe de ajustarse con HCl estéril.

Separadamente se esteriliza en autoclave un volumen igual de agua de mar artificial a una concentración normal la cual es añadida de forma estéril sobre la anterior para dar una concentración en agua de mar  $\frac{1}{2}$  concentrada y la indicada en el resto de componentes. La solución concentrada de fuente de carbono se esteriliza por filtración y se añade al final. El volumen de agua inicial será corregido en función del volumen de solución añadida de fuente de carbono.

El medio así preparado se distribuye asépticamente en tubos de O/F (10x100 mm) en volúmenes de 3 mL por tubo. Igual que en el apartado anterior, la mitad de los tubos se cubren con vaselina estéril tras ser inoculados para crear una atmósfera exenta de oxígeno, mientras que la otra mitad se dejan sin vaselina para observar el crecimiento en condiciones de oxidación.

La concentración de fuente de carbono utilizada en el ensayo ha sido del 1 %. En el caso del grupo de aislamientos constituido por los biotipos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4 el agua de mar artificial del medio se sustituye por NaCl al 1.5 % (p/v) (Bowman y *col.*, 1996), mientras que para los biotipos NF12, NF22 y NF24 se ha utilizado el medio MOF tal y como se ha descrito.

Los azúcares ensayados en el caso del grupo NF12, NF22 y NF24, fueron los siguientes:

- D-Glucosa
- N-Acetil glucosamina
- D-Celobiosa
- Maltosa
- D-Manitol
- Sacarosa
- D-Galactosa
- D-Manosa
- D-Xilosa
- Trehalosa

Como control para la realización del ensayo se han utilizado las cepas *Shewanella algae* CECT 331, *Shewanella baltica* CECT 323<sup>T</sup> y *Shewanella hanedai* CECT 5017<sup>T</sup>. Los aislamientos bacterianos de origen antártico han sido incubados a 15 °C, mientras que las cepas control se han desarrollado a temperatura ambiente (20-22 °C). La

producción de ácido se observó diariamente a partir del segundo día de incubación durante 14 d.

En el caso de los biotipos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4, los azúcares ensayados han sido los siguientes:

- D-Glucosa
- N-Acetil glucosamina
- D-Celobiosa
- Maltosa
- D-Manitol
- L-Arabinosa
- $\alpha$ -Lactosa
- $\alpha$ -L-Ramnosa
- Sacarosa
- D-Galactosa
- D-Manosa
- D-Xilosa
- D-Melibiosa
- Fructosa
- D-Rafinosa

Para este grupo bacteriano se han utilizado como cepas control del ensayo *Psychrobacter immobilis* CECT 5008<sup>T</sup>, *Psychrobacter frigidicola* ACAM 304<sup>T</sup>, *Psychrobacter glacincola* ACAM 483<sup>T</sup> y *Psychrobacter urativorans* ACAM 534<sup>T</sup>. La temperatura de incubación utilizada en el ensayo ha sido de 15 °C en todos los casos.

La producción de ácido fue observada diariamente a partir del segundo día de incubación hasta un máximo de 21 d.

#### **4.3.8. Utilización de fuentes de carbono**

Las fuentes de carbono utilizadas por los aislamientos bacterianos antárticos han sido determinadas mediante el desarrollo en medios minerales y mediante la utilización de sistemas estandarizados para la determinación de caracteres fenotípicos. En este apartado se describen los medios minerales utilizados según el grupo bacteriano objeto de estudio y las fuentes de carbono ensayadas en cada caso. Los substratos carbonados no mencionados en este apartado se han determinado mediante los sistemas estandarizados (Ver apartado 4.3.17.).

##### **4.3.8.1. MEDIO MINERAL SEGÚN READ Y COSTERTON (1987)**

El estudio de compuestos orgánicos utilizados como fuente de carbono para el desarrollo de los biotipos NF12, NF22 y NF24, se realizó en el medio mineral descrito

por Read y Costerton (1987), con una concentración de fuente de carbono del 1% de acuerdo a la indicada por Palleroni y Doudoroff (1972) y con un suplemento de vitaminas según Guinard y Snell (1981).

La composición por litro del medio mineral corresponde a (g/L):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
NaCl	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4
CaCl <sub>2</sub>	0.1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.018
NH <sub>4</sub> Cl	3
Fuente de Carbono	10

Vitaminas (mg/L):

Biotina	0.01
Acido nicotínico	1
Tiamina HCl	0.5

pH 7.0

Para la elaboración del medio de cultivo se preparan soluciones concentradas de FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, vitaminas y fuentes de carbono, que se esterilizan por filtración. El resto de componentes se esterilizan juntos, en una solución doble concentrada a 115 °C durante 30 min. Sobre esta solución se añaden los restantes componentes para la obtención del medio de cultivo mineral con su respectiva fuente de carbono.

Paralelamente se prepara el mismo medio de cultivo pero con extracto de levadura (10 g/L), como sustituto de la fuente de carbono, que servirá como control del inóculo.

Para la realización del ensayo, el medio de cultivo se distribuye en placas de microtiter (200 µL/pocillo). Como control del inóculo se utiliza el medio con extracto de levadura y Ringer ¼. Como blanco se utiliza el medio mineral sin inocular.

Los pocillos se inoculan con 10 µl de una suspensión bacteriana en 2 mL de Ringer ¼, de una turbidez igual a 1 de la escala de McFarland. La suspensión bacteriana se prepara a partir de los microorganismos desarrollados en placas de TSA durante 3 d a 15 °C.

La temperatura de incubación para el ensayo de utilización de fuentes de carbono ha sido 15 °C y las lecturas de crecimiento se han realizado a partir del tercer día y hasta los 14 d de incubación.

A continuación se da la relación de las diferentes fuentes de carbono ensayadas en este medio mineral:

- Succinato
- α-Lactosa
- D-Manitol
- Ácido pimélico
- D-Fructosa
- D-Glucosa
- L-Glutamato
- Acetato
- D-Celobiosa
- D-Xilosa
- α-L-Ramnosa
- Ácido subérico
- Ácido sebácico
- DL-malato
- Ácido tartárico
- DL-Hidroxibutirato
- D-Arabinosa
- L-Arabinosa
- Ácido Itacónico
- Ácido adípico
- Ácido glucónico
- L-Prolina
- L-Fenilalanina
- Citrato

#### **4.3.8.2. MEDIO MINERAL SEGÚN BOWMAN Y COL. (1996)**

La utilización de fuentes de carbono por los aislamientos bacterianos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4 se ensayó en el medio mineral descrito por Bowman y *col.* (1996) para el estudio de especies del género *Psychrobacter*.

La composición por litro de medio mineral es la siguiente g/L:

NH <sub>4</sub> Cl	2
Tampón Fosfato-Na 1M (pH 7.0)	2 mL
SL 10	2 mL
NaCl	15

Ajustar el pH a 7.0 con KOH 1 M

El medio se solidifica con Agar Bacteriológico (Difco) al 1.3 % y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min.



La solución de elementos traza SL 10 (Widdel y col., 1983) corresponde a:

HBO <sub>3</sub>	6 mg/ L
CuCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	2 mg/ L

Al medio mineral se le añade la fuente de carbono para dar una concentración final de ensayo del 2 %. En el caso de carbohidratos la concentración de estudio es del 0.5 %. Las soluciones concentradas de fuentes de carbono se esterilizan por filtración y el substrato concentrado se añade al medio mineral estéril, mantenido a 45 °C. Antes de distribuir el medio en placas Petri se comprueba de nuevo el pH y se ajusta si es necesario.

La relación de fuentes de carbono ensayadas en este medio mineral es la siguiente:

- L-Histidina
- L-Hidroxiprolina
- Ácido L-málico
- Succinato sódico
- L-Arginina
- L-Glutamina
- L-Asparagina
- DL-Fenilalanina
- D-Fructosa
- L-Fenilalanina
- L-Prolina
- L-Serina
- L-Alanina
- D-Alanina
- L-Ornitina
- Glicina
- Ácido fenilacético
- Ácido 5 -aminovalérico
- D-Sorbitol
- Celobiosa
- L-Arabinosa
- D-Arabinosa
- D-Manosa
- D-Manitol
- Levulosa
- Putrescina
- D-Galactosa
- D-Glucosa
- D-Xilosa
- D-Trehalosa
- D-Melibiosa
- *myo*-Inositol
- Sacarosa
- Maltosa
- Tartrato sódico
- D-Rafinosa
- α-L-Ramnosa
- α-Lactosa
- Ácido D-glucónico
- Ácido D-glucurónico
- Glicerol
- Etanol
- 1-Butanol
- Acetato sódico
- Citrato sódico
- Piruvato sódico
- Ácido propiónico
- Ácido adípico
- Ácido subérico
- Tween 80
- N-Acetil glucosamina

Como control del ensayo se ha utilizado la especie tipo *Psychrobacter immobilis* CECT 5008<sup>T</sup>. La temperatura de incubación ha sido de 15 °C para los aislamientos antárticos y temperatura ambiente (20-22 °C) para la cepa tipo control. Las lecturas del ensayo se han realizado a partir del segundo día de incubación hasta los 14 d, observando el desarrollo bacteriano sobre el medio de cultivo.

#### **4.3.9. Crecimiento en anaerobiosis**

Para comprobar el desarrollo de los aislamientos en anaerobiosis se utilizó un medio de cultivo nutritivo con glucosa. En nuestro caso utilizamos TSB al que se añadió agar bacteriológico en una concentración del 1.5 % (p/v).

Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis mediante el sistema Gas Pack®, durante 5 d a 15 °C.

#### **4.3.10. Reducción anaeróbica de aceptores de electrones Fe(III) y TMAO**

La reducción anaeróbica del hierro y de la trimethylamina N-óxido se estudió para las cepas bacterianas NF12, NF22 y NF24.

La reducción del hierro en anaerobiosis fue ensayada en un medio definido (Myers y Nealson, 1990), con un suplemento de lactato 30 mM como fuente de carbono y energía y Fe(III) citrato 50 mM como aceptor terminal de electrones (Lovley y col., 1992). El medio sólido definido (DiChristina y DeLong, 1994), se preparó añadiendo Bacto-Agar (Difco) hasta una concentración final del 1.5 % (p/v). El crecimiento anaeróbico en presencia de trimethylamina N-óxido (TMAO) 25 mM (Saffarini y col., 1994) como único aceptor final de electrones se ensayó en el mismo medio sólido definido, pero omitiendo el Fe(III) citrato.

Composición del medio sólido definido:

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.0 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.3 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2.0 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.0 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.49 mM
EDTA Na <sub>2</sub>	67.2 μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	56.6 μM
NaCl	10.0 μM
FeSO <sub>4</sub>	5.4 μM

CoSO <sub>4</sub>	5.0 μM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ni(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5.0 μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	3.9 μM
NaSeO <sub>4</sub>	1.5 μM
MnSO <sub>4</sub>	1.3 μM
ZnSO <sub>4</sub>	1.0 μM
CuSO <sub>4</sub>	0.2 μM
L-arginina	20 μg/ mL
L-glutamato	20 μg/ mL
L-serina	20 μg/ mL
Lactato	30 mM
Aceptor de electrones	
Bacto-agar	1.5 %
Casaminoácidos	0.01 %

pH 7.4

Para la elaboración de los medios de cultivo se prepararon soluciones concentradas de todos los componentes. Las soluciones de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, EDTA Na<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaCl, L-arginina, L-glutamato, L-serina, Lactato y casaminoácidos, se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min, mientras que el resto de los componentes, incluyendo el Fe(III) citrato (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O) y el TAMAO, se esterilizaron por filtración.

El agar se disuelve en la cantidad de agua suficiente para preparar el medio y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min. Sobre el agar fundido mantenido a 45 °C se añade, en condiciones estériles, los volúmenes correspondientes de cada solución concentrada. Antes de distribuir el medio en placas se revisa y ajusta el pH a 7.4, para ello se utilizan soluciones estériles de NaOH 2N y HCl 2N.

Se prepararon cinco series de medios de cultivo definidos, los dos medios objeto de estudio y otros medios de control en los que faltaban los aceptores de electrones o bien el sustrato carbonado:

1. Medio con aceptor de electrones Fe(III) citrato 50 mM y con donador de electrones Lactato 30 mM.
2. Medio con aceptor de electrones TMAO 25 mM y con donador de electrones Lactato 30 mM.
3. Medio sin aceptor de electrones y con donador de electrones Lactato 30 mM
4. Medio con aceptor de electrones Fe(III) citrato 50 mM y sin donador de electrones Lactato 30 mM.
5. Medio con aceptor de electrones TMAO 25 mM y sin donador de electrones Lactato 30 mM.

Las placas inoculadas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis mediante el sistema Gas Pack® durante 10 a 14 d, hasta que las placas mostraron un crecimiento visible. La incubación se realizó a oscuras. La temperatura de incubación fue de 15 °C para los aislamientos bacterianos y temperatura ambiente (20-22 °C) para las cepas control *Shewanella algae* CECT 331 y *Shewanella baltica* CECT 323<sup>T</sup>. Antes de la incubación de las jarras a 15 °C y temperatura ambiente, estas se mantuvieron durante una noche a 4 °C para asegurar las condiciones de anaerobiosis y evitar el crecimiento que pudiera producirse por la presencia de oxígeno residual antes de conseguirse las condiciones de anaerobiosis. El crecimiento en presencia de Fe (III) o en presencia de TMAO se comparó con el desarrollo aparecido en las placas control sin aceptor de electrones o sin substrato carbonado.

#### **4.3.11. Enzimas respiratorias**

##### **4.3.11.1. CITOCROMO OXIDASA**

La actividad citocromo C oxidasa se determinó por el método de Kovács (1956). La prueba de la oxidasa permite detectar la presencia del citocromo C como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria. Para ello se utiliza una solución de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 %, compuesto que sustituye al O<sub>2</sub> como aceptor terminal de electrones produciendo una coloración azul violácea por la acción de la citocromo oxidasa.

Para la realización de la prueba se utilizan cultivos en TSA de 6 d de incubación a 15 °C. Una colonia del microorganismo problema se deposita sobre un papel de filtro y se vierten unas gotas del reactivo para observar la presencia o ausencia del color violáceo en menos de 10 seg.

Paralelamente se determinó la actividad oxidasa de los biotipos en estudio mediante la utilización de las tiras reactivas Bactident®Oxidase (Diagnostica MERCH 13 300). Estas tiras reactivas contienen el sustrato N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride 0.1µmol, 1-naphtol 1.0 µmol. Este sustrato puede ser reducido por el enzima citocromo oxidasa en presencia de oxígeno molecular dando lugar a la formación de una molécula de condensación de color azul. La presencia de oxidasa se pone de manifiesto rápidamente por la aparición de color azul después de 20-60 seg de haber depositado una colonia del microorganismo sobre la zona reactiva de la tira.

#### **4.3.11.2. CATALASA**

La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. La actividad de la catalasa se detectó según el método de Cowan & Steel's (1993) que consiste en cubrir una pequeña cantidad de biomasa bacteriana depositada en un portaobjetos con 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %. La presencia del enzima se pone de manifiesto por el desprendimiento de burbujas de O<sub>2</sub> inmediatamente después de haber añadido el agua oxigenada.

Se utilizaron cultivos en TSA de 6 d de incubación a 15 °C.

#### **4.3.12. Voges-Proskauer**

La prueba de Voges-Proskauer permite determinar si la bacteria problema sigue la vía de la fermentación butanodiólica para la conversión del ácido pirúvico, produciendo mayoritariamente productos neutros como resultado del proceso de fermentación.

Esta prueba se ha realizado según el método de Barritt (1936) y consiste en la detección de la acetoina, producto intermedio en la fermentación butanodiólica, que se evidencia en un cultivo del microorganismo en caldo glucosa fosfato al añadir el reactivo de Barritt ( solución de α-naftol al 6 % en etanol y solución acuosa de KOH al 40 %) por la aparición de una coloración roja.

Para la realización del ensayo los biotipos bacterianos se han desarrollado en caldo glucosa fosfato, descrito por Cowan & Steel's (1993), durante 5 d a 15 °C.

En el caso de los biotipos 20CM y 20CO, antes de determinar la presencia de acetil-metil-carbinol (acetoína) se efectúa una lectura del pH final tras el desarrollo en el caldo de glucosa fosfato.

#### **4.3.13. Rojo de Metilo**

Esta prueba permite diferenciar los organismos capaces de producir ácidos fuertes y estables (láctico, acético o fórmico) como consecuencia de la degradación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta. Para ello se inoculan tubos con caldo glucosa fosfato, descrito por Cowan & Steel's (1993), durante 5 d a 15 °C.

Para realizar las lecturas se emplea el rojo de metilo como indicador de la concentración de hidrógeno. La prueba se considera positiva cuando al añadir el indicador se produce un viraje a rojo del medio, indicando un pH inferior a 4.4.

#### **4.3.14. Metabolismo de compuestos nitrogenados**

##### **4.3.14.1. REDUCCIÓN DE NITRATOS**

La capacidad reductora de nitratos se ha verificado según lo indicado por Cowan & Steel's (1993).

Las bacterias pueden reducir los nitratos por tres vías diferentes (Holding y *col.*, 1971). En el primer proceso denominado asimilación, los nitratos son reducidos a amonio mediante una serie de reacciones que incluyen el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como intermediario. Otra posibilidad es la desasimilación, en este caso los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) son utilizados como aceptores finales de electrones en condiciones críticas o ausencia de  $\text{O}_2$ . El último proceso posible es la desnitrificación en el cual las bacterias convierten los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en productos gaseosos tales como nitrógeno gas ( $\text{N}_2$ ) y óxido de nitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}$ ), aunque también se puede acumular nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como intermediario.

El ensayo se ha realizado utilizando un caldo de nitratos que se reparte en tubos con campana Durham para la detección de gas. La reducción de nitratos a nitritos se detecta al añadir al caldo nutritivo los reactivos de Griess-Ilosvay (nitratos A y nitratos B), que contienen  $\alpha$ -naftilamina y ácido sulfanílico respectivamente. Estos compuestos junto a los nitritos originados por la bacteria dan lugar a un compuesto diazoico de color rojo. Si no aparece coloración se añade Zn metálico, que reduce los nitratos a nitritos, de manera que si la bacteria no ha reducido los  $\text{NO}_3^-$  al añadir polvo de Zn se producirá una coloración roja. En el caso de que no se origine coloración significa que el microorganismo ha reducido los nitratos a  $\text{N}_2$  o bien a  $\text{NH}_4^+$ . Cuando la bacteria reduce los  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ , éste se detecta por la aparición de burbujas de gas en el interior de la campana Durham.

Los distintos biotipos fueron incubados durante cinco días a 15 °C para realizar la lectura de la prueba.

En el caso de los aislamientos esporulados 20C y 20CM el ensayo también se realizó incubando en jarra de anaerobiosis Gas Pack® en las mismas condiciones.

#### **4.3.14.2. INDOL**

Muchos microorganismos son capaces de producir indol a partir del triptófano mediante un complejo enzimático denominado de forma general triptofanasa. La capacidad para producir indol constituye una característica importante para la diferenciación de enterobacterias, pero también se utiliza con mucha frecuencia en la identificación de otros microorganismos.

La formación de indol a partir del triptófano se favorece con la presencia de oxígeno y se inhibe con la glucosa. Para favorecer la producción de indol los microorganismos se desarrollan en una agua de peptona, rica en el aminoácido aromático.

La lectura de la prueba se realiza añadiendo el reactivo de Kovács (1928), modificado por Gadebusch y Gabriel (1956), el cual contiene p-dimetilaminobenzaldehído que reacciona con el indol produciendo un anillo de color rojo cereza en la parte superior del tubo.

Las condiciones de incubación en el ensayo han sido de 5 d a 15 °C.

#### **4.3.14.3. UREASA**

Para demostrar la presencia de actividad hidrolítica de la urea se inocularon tubos conteniendo urea (Caldo Urea, DIFCO). El medio se incubó a 15 °C durante un periodo de 3 a 5 d.

El enzima ureasa se manifiesta por el viraje a rojo intenso del indicador del medio, provocado por la fuerte alcalinización que produce el amoníaco liberado en la hidrólisis de la urea.

#### **4.3.14.4. ARGININA DIHIDROLASA**

Para detectar la presencia del enzima arginina dihidrolasa se utilizó el método descrito por Thornley (1960) y modificado por Lelliot y col. (1966).

Para la realización del ensayo los biotipos bacterianos se hacen crecer en el medio de Thornley que contiene L-Arginina y rojo fenol como indicador. El medio de cultivo, distribuido en tubos estrechos, se inocula en profundidad sellándose los viales, a continuación, con parafina líquida para proporcionar una atmósfera anaeróbica. La presencia de arginina dihidrolasa se evidencia por un viraje del indicador, ocasionado por la producción de amonio a partir del aminoácido.

Las cepas se incuban durante 14 d a 15 °C revisándose los resultados diariamente.

#### **4.3.14.5. FENILALANINA DESAMINASA**

Algunas bacterias presentan la capacidad de desaminar oxidativamente la fenilalanina para convertirla en ácido fenilpirúvico.

Para determinar la presencia de esta actividad se procedió según Report (1958), inoculando en estría superficial tubos conteniendo Agar Fenilalanina (FLUKA), que fueron incubados durante 4-5 d a 15 °C. El revelado se realiza cubriendo el crecimiento con unas gotas de una solución de FeCl<sub>3</sub> al 10 %. La presencia de ácido



fenilpirúvico se evidencia por la aparición de un color verdoso característico en el medio de cultivo, cuando este reacciona con el hierro.

#### 4.3.14.6. DESCARBOXILACIÓN DE LA ORNITINA, ARGININA Y LISINA

Para comprobar la descarboxilación de la ornitina, arginina y lisina se utilizó el caldo base para descarboxilasas según Falkow (1958) indicado en Cowan & Steel's (1993).

Composición del medio de cultivo (g/L):

Peptona	5
Extracto de levadura	3
Glucosa	1
Solución acuosa de púrpura de bromocresol al 0.2 %	10 mL
Agua destilada	1000 mL

Disolver los tres primeros componentes en agua y ajustar el pH a 6.7. A continuación añadir la solución indicadora de pH.

El medio de cultivo base se divide en cuatro partes y se esteriliza a 115 °C durante 30 min. A continuación se añade a cada volumen uno de los diferentes aminoácidos para una concentración final en el medio de cultivo del 0.5 %, dejándose un volumen de medio de cultivo sin aminoácido.

- L-Arginina HCl 0.5
- L-Ornitina HCl 0.5
- L-Lisina HCl 0.5 g/100mL
- Se deja un volumen sólo con el cultivo base que servirá de control.

Se comprueba de nuevo que el pH es de 6.7 y se vuelve a ajustar si es necesario.

Una vez constituidos los cuatro medios se distribuyen en tubos pequeños estériles a razón de 2mL/tubo. Es conveniente sellar los tubos con una capa de aceite de vaselina estéril para evitar la oxidación espontánea.

Se inocula un tubo de cada uno de los aminoácidos y un tubo control sin aminoácido para cada una de las cepas a ensayar y se examinan diariamente durante 14 d.

En este medio de cultivo aparece, en primer lugar, un viraje del indicador a amarillo debido a la acidificación producida por la fermentación de la glucosa. Posteriormente, si se produce la descarboxilación del aminoácido, el medio se alcaliniza virando a color púrpura. Los tubos control siempre permanecerán amarillos.

#### 4.3.14.7. PRODUCCIÓN DE DIHIDROXIACETONA

La determinación de la producción de dihidroxiacetona en los aislamientos bacterianos 20C y 20CM se ha realizado de acuerdo a Claus y Berkeley (1986). Para ello los microorganismos se han desarrollado en un agar glicerol cuya composición corresponde a:

Agar Nutritivo	100 mL
Extracto de levadura	1 g
Glicerol	2 mL

El medio se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Los microorganismos se siembran mediante estría superficial en el agar glicerol y las placas se incuban durante 10 d a 15 °C. Tras el periodo de incubación, para efectuar el revelado, las placas se inundan con una mezcla de las siguientes soluciones:

<b>Solución A:</b>	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	34.66 g
	Agua destilada	500 mL
<b>Solución B:</b>	Tartrato sódico potásico (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	173 g
	NaOH	50 g
	Agua destilada	500 mL

Las soluciones A y B se conservan en nevera y se mezclan a partes iguales 1:1 justo antes de la lectura.

La placa inundada con la solución A y B se deja 2 h a temperatura ambiente. La aparición de un halo rojo alrededor del crecimiento bacteriano se interpreta como una lectura positiva de la prueba.

### **4.3.15. Hidrólisis de macromoléculas**

#### **4.3.15.1. HIDRÓLISIS DEL TWEEN 80**

La capacidad para hidrolizar el Tween 80 (mono-oleato de polietilen sorbitan) se ha determinado según el método de Sierra (1957). Para ello los microorganismos se hacen crecer en un agar nutritivo que contiene Tween 80 y CaCl<sub>2</sub>. Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el Tween 80 aparece en el medio de cultivo un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano debido a la combinación del Ca<sup>2+</sup> y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. Cuando la bacteria no posee la capacidad para hidrolizar el Tween no se observa ningún tipo de precipitado.

En el ensayo, el medio de cultivo se ha preparado tal y como indica Cowan & Steel's (1993). Los biotipos bacterianos se han incubado durante 5 d a 15 °C leyéndose los resultados a partir del segundo día.

#### **4.3.15.2. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN**

La actividad amilolítica se detecta según el método descrito por Cowan & Steel's (1993).

El medio de cultivo utilizado ha sido Agar Almidón.

El crecimiento bacteriano en una placa de agar almidón se cubre con una solución acuosa de yodo (British Pharmacopeia, 1963). El medio de cultivo se vuelve azul oscuro en las zonas donde el almidón no ha sido hidrolizado, mientras que la hidrólisis se manifiesta por los halos claros alrededor del crecimiento bacteriano.

En el ensayo las cepas se han incubado durante 5 d a 15 °C.

#### **4.3.15.3. HIDRÓLISIS DE LA CASEÍNA**

La capacidad para hidrolizar la caseína se determinó según Collins y *col.* (1989). Para ello los microorganismos se desarrollan en un medio que contiene caseína y que consta de dos fracciones:

1. TSA (20 g en 250 mL de agua destilada).
2. Leche descremada (10 g de en 250 mL de agua destilada).

Cada fracción se esteriliza por separado. Concretamente la solución de caseína conviene esterilizarla a 115 °C durante 30 min. Luego se dejan enfriar hasta 45 °C, se mezclan y se reparte el medio en placas Petri.

Las cepas se siembran mediante una estría central gruesa y la lectura de la prueba se realiza observando la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, cuando la bacteria es capaz de hidrolizar la caseína.

El periodo de incubación para las cepas objeto de estudio ha sido de 5 d a 15 °C.

#### **4.3.15.4. HIDRÓLISIS DE LA LECITINA**

La detección de la lecitinasa se realizó según Cowan & Steel's (1993). Para ello se utilizó un agar LV según describe Macfarlane *y col.* (1941) y que contiene:

1. Emulsión de yema de huevo estéril 100mL
2. Agar nutritivo 900mL

La emulsión de yema de huevo se mezcla de forma aséptica con el agar nutritivo estéril a 40-50 °C y se distribuye en placas Petri.

Las cepas se siembran en una estría central y se incuban hasta 14 d a 15 °C. Si hay actividad lecitínica el medio de cultivo se vuelve opalescente alrededor del crecimiento bacteriano. Para confirmar resultados dudosos puede cubrirse la placa con una solución acuosa de CuSO<sub>4</sub>, el exceso de solución se elimina y se deja secar en la estufa a 30 °C durante 20 min. La aparición de un precipitado de cobre de color gris-azulado en las zonas que contienen ácidos grasos libres confirmaría la presencia del enzima.

#### **4.3.15.5. HIDRÓLISIS DEL DNA**

Para la determinación de la actividad desoxirribonucleásica de los microorganismos se siguió el método de Jeffries *y col.* (1957).

Los biotipos bacterianos se siembran en un agar que contiene DNA. Las bacterias que son capaces de producir DNasa despolimerizan el DNA hasta fragmentos de nucleótidos.

La visualización de la despolimerización del DNA se consigue añadiendo HCl 1N sobre el microorganismo desarrollado en el medio de cultivo que contiene el DNA. El HCl precipita del DNA dando lugar a un enturbiamiento del agar. De esta manera, en las zonas donde el DNA se ha degradado no habrá precipitación y el agar queda transparente debido a que el HCl no reacciona con los fragmentos de nucleótidos.

Las cepas bacterianas objeto de estudio han sido sembradas mediante una estría central gruesa en una placa Petri con agar DNA, incubándose durante 5 d a 15 °C.

#### **4.3.15.6. HIDRÓLISIS DEL AGAR SANGRE**

La actividad hemolítica de los aislamientos bacterianos antárticos fue determinada de acuerdo a Cowan & Steel's (1993).

Para la realización del ensayo se inocularon placas de Agar Columbia con 5 % de sangre desfibrinada de cordero.

El crecimiento en agar sangre puede producir cambios en el aspecto del medio alrededor de las colonias. Esto es debido a que los eritrocitos pueden ser lisados por las células microbianas, total o parcialmente, lo que da lugar 3 tipos diferentes de hemólisis:

- a)  $\beta$ -hemólisis: los eritrocitos se lisan totalmente y la hemoglobina es degradada dando lugar a un halo claro alrededor de las colonias. Hemólisis total.

- b)  $\alpha$ -hemólisis: aparición de una zona marrón-verdosa alrededor de las colonias debido a la una lisis incompleta de los eritrocitos con cambio de color de la hemoglobina por pérdida de potasio. Hemólisis parcial.
- c)  $\gamma$ -hemólisis o no hemólisis. No hay cambio alrededor del crecimiento microbiano.

Los resultados se visualizaron a los 5 d de incubación a 15 °C.

#### **4.3.15.7. HIDRÓLISIS DE LA ESCULINA**

La hidrólisis de la esculina se determinó según Cowan & Steel's (1993). Para ello los aislamientos bacterianos fueron inoculados en Caldo Esculina, incubándose hasta 14 d a 15 °C.

Composición del caldo esculina según Cowan & Steel's (1993):

Esculina	1 g
Citrato férrico	0.5 g
Agua de peptona	1000 mL

La esculina y el hierro se disuelven en el agua de peptona y se esteriliza a 115 °C durante 15 min.

De forma general la hidrólisis de la esculina libera glucosa y esculetina y esta última se detecta porque reacciona con el ión férrico del medio dando unos precipitados negros que lo oscurecen.

#### **4.3.15.8. HIDRÓLISIS DE LA GELATINA**

La hidrólisis de la gelatina se determinó de acuerdo a la metodología descrita en Cowan & Steel's (1993). Para la realización de la prueba, los biotipos bacterianos se inocularon en placas de medio de Gelatina Nutritiva mediante estría por agotamiento.

Los biotipos bacterianos de origen antártico fueron incubados a 15 °C durante 20 d, examinando diariamente las placas para observar el crecimiento y la liquefacción de la gelatina

#### 4.3.15.9. HIDRÓLISIS DE LA QUITINA

La capacidad para hidrolizar la quitina se determinó en los biotipos bacterianos NF12, NF22 y NF24. Para ello se siguieron las indicaciones de Holding y Colle (1971) descritas en Cowan & Steel's (1993).

La quitina se añade en una proporción del 0.25 % en agar blando del 0.5 %, se distribuye en volúmenes de 3 mL y se esteriliza a 115 °C durante 30 min. El agar blando mantenido a 45 °C se vierte por un lado sobre placas de TSA ( 3 mL por placa) y por otro sobre placas de TSA preparadas con agua de mar artificial.

Para la realización del ensayo las distintas cepas bacterianas se siembran mediante estría por agotamiento en la superficie del agar. Concretamente los aislamientos bacterianos antárticos y una cepa control de *Escherichia coli* ATCC 10536 se sembraron sobre las placas con base de TSA, mientras que las cepas control *Shewanella baltica* CECT 323<sup>T</sup>, *Shewanella algae* CECT 331 y *Shewanella hanedai* CECT 5017<sup>T</sup> fueron inoculadas sobre placas con base de TSA + agua de mar artificial.

Las placas inoculadas fueron incubadas durante 6 d a 15 °C para NF12, NF22 y NF24. En el caso de los controles de *Shewanella* las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (20 - 22 °C) hasta los 6 d mientras que el control de *E.coli* fue incubado a 37 °C durante 48 h. Las placas se examinaron diariamente para observar la aparición de zonas claras alrededor del crecimiento bacteriano que indicarían que la quitina ha sido hidrolizada.

#### 4.3.15.10. HIDRÓLISIS DE LA TIROSINA

Para determinar la descomposición de la tirosina los biotipos bacterianos fueron inoculados en placas de Agar Tirosina examinando el desarrollo bacteriano durante 14 días, de acuerdo a las indicaciones de Claus y Berkeley (1986).

Para la elaboración del medio de cultivo se prepara una solución de L-tirosina de 0.5 g en 10 mL de agua destilada que se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min. Luego se mezcla con 100 mL de agar nutritivo estéril mantenido a 45 °C y se distribuye en placas de Petri.

La hidrólisis de la tirosina se determinó exclusivamente para los biotipos bacterianos 20 CM y 20 CO los cuales se inocularon mediante estría por agotamiento y se incubaron a 15 °C durante 14 d. Diariamente se observó la disolución de los cristales alrededor y bajo el crecimiento bacteriano.

#### **4.3.16. Desarrollo en Agar Triple Azúcar Hierro y en Kligler.**

Para determinar la producción de ácido sulfhídrico en el grupo bacteriano constituido por los aislamientos NF12, NF22 y NF 24 se desarrollaron los microorganismos en los medios de cultivo Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) y Agar Hierro Kligler.

El medio de cultivo, tanto el TSI como el Kligler, fue dispensado en tubos y solidificado en forma de pico de flauta. Para la realización del ensayo la inoculación se hizo en profundidad, por picadura, y en superficie.

Los aislamientos bacterianos inoculados en los dos medios de cultivo diferenciales fueron incubados hasta 7 d a 15 °C, examinando la aparición o no de un precipitado negro debido a la liberación de H<sub>2</sub>S que se combina con el hierro presente en el medio.

#### **4.3.17. Sistemas estandarizados para la determinación de características bioquímicas adicionales.**

Para la determinación de caracteres fenotípicos y de la actividad enzimática de los diferentes aislamientos bacterianos antárticos también se han utilizado distintos sistemas estandarizados de identificación dependiendo del grupo de aislamientos estudiado.

Concretamente se han utilizado seis sistemas estandarizados de identificación rápida "API SYSTEM" de la casa Biomerieux:

- API 20 NE: Sistema de Identificación de Bacilos No Enterobacterias
- API 20 E: Sistema de Identificación de Bacilos Enterobacterias.



- API 50 CH con el medio API 50 CHE: Sistema para el Estudio de la Fermentación de 49 Azúcares.
- API 20 B: Sistema de Identificación de Bacterias Heterotróficas.
- ATB32 GN: Sistema Automático de Identificación de Bacilos Gram Negativos.
- API ZYM: Sistema para la determinación de la Actividad Enzimática.

En los primeros cuatro sistemas estandarizados los biotipos bacterianos se han incubado a 15 °C durante 5 a 7 d, examinando los resultados diariamente en las pruebas de lectura directa. Para ATB 32GN la lectura se efectuó al 5º día de incubación a 15 °C mediante lector automático ATB (Software APILAB ATB 32). Para el sistema API ZYM la lectura se efectuó a las 24 h de incubación a 15 °C.

#### **4.4. SENSIBILIDAD FRENTE A LOS ANTIBIÓTICOS**

Para la realización de los ensayos antimicrobianos se ha seguido el método descrito por Kirby-Bauer (Bauer y *col.*, 1966). Como medio base para el ensayo se ha usado agar de Müller- Hinton. También se han utilizado suspensiones bacterianas de 2 mL en Ringer ¼ con una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland, preparadas a partir de colonias aisladas de cultivos de 5 d a 15 °C.

Las placas de Müller-Hinton se han sembrado de forma confluyente con 0.1 mL de la suspensión bacteriana. Después de dejar secar la superficie de la placa, se colocan de forma aséptica los discos de antibiótico a ensayar.

En todos los casos el período de incubación para determinar la sensibilidad a los antibióticos ha sido de 5 d a 15 °C. Tras este período, se ha procedido a la lectura de los halos de inhibición y correlación de estos con las CMI (concentración mínima inhibitoria), en función de la carga de antimicrobiano contenida en el disco.

Los antibióticos estudiados y los halos de inhibición que determinan la sensibilidad o resistencia se relacionan a continuación:

ANTIMICROBIANO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Penicilina 10 U/IE	≥ 22 mm	12-21 mm	≤ 11 mm
Cloranfenicol 30 µg	≥ 18 mm	13-17 mm	≤ 12 mm
Ac. Nalidíxico 10 µg	≥ 19 mm	14-18 mm	≤ 13 mm
Gentamicina 10 µg	≥ 13 mm	≤ 12 mm	≤ 10 mm
Estreptomicina 10 µg	≥ 15 mm	12-14 mm	≤ 11 mm
Furazolidona <sup>50</sup>	> 15 mm	/	≤ 15 mm
Carbenicilina 100µg	≥ 15 mm	13-14 mm	≤ 12 mm
Cefamandol 30 µg	≥ 18 mm	15-17 mm	≤ 14 mm
Colistina 10 µg	≥ 11 mm	9-10 mm	≤ 8 mm
Polimixina B 300 U	≥ 12 mm	9-11 mm	≤ 8 mm
Tobramicina 10 µg	≥ 15 mm	13-14 mm	≤ 12 mm
Tetraciclina 30 µg	≥ 19 mm	15-18 mm	≤ 14 mm

#### 4.5. TÉCNICAS ALTERNATIVAS A LA TINCIÓN DE GRAM : test del KOH y L-alanina aminopeptidasa

Aunque la tinción de Gram permite una diferenciación útil entre microorganismos Gram positivos y Gram negativos, algunos factores como el tiempo de cultivo o la composición del medio pueden alterar la respuesta a la reacción Gram. Un ejemplo sería el de bacterias Gram positivas anaeróbicas que se decoloran en la tinción de Gram, dando un resultado falso. Estos errores pueden conducir a una identificación incorrecta del microorganismo (Manafi y *col.*, 1990).

Un método alternativo de diferenciación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es el descrito por Cerny (1976, 1978) que utiliza un principio basado en la existencia de L-alanina aminopeptidasa en la mayoría de las bacterias Gram

negativas, mientras que las Gram positivas no presentan el enzima o como mucho sólo presentan una débil actividad. (Teuber y Cerny, 1973 ; Cerny, 1978).

Otra alternativa de fácil realización para diferenciar entre microorganismos Gram negativos y Gram positivos es el denominado test del KOH, descrito por Gregersen (1978), Halebian *y col.* ( 1981) y Bourgault *y col.* (1988). Este método está basado en la rotura de la pared celular de las bacterias al ponerlas en contacto con soluciones alcalinas diluidas. Una suspensión de células bacterianas en KOH al 3% toma un aspecto viscoso debido a la liberación del DNA cuando se trata de una bacteria Gram negativa. Sin embargo, Blachmann *y col.* (1980) y Bourgault *y col.* (1988) demostraron que el método del KOH no tiene una correlación muy precisa con la tinción de Gram.

Se han descrito otros ensayos de fácil realización (Ramsey *y col.*, 1980, Kwee *y col.*, 1988) para detectar el tipo de estructura de la pared celular. Sin embargo, estos métodos, aunque útiles, presentan ciertas limitaciones (Manafi *y col.*, 1990).

En el caso de los aislamientos que se describen en esta memoria doctoral se han utilizado además de la tinción de Gram, el test del KOH y el método de la L-alanina aminopeptidasa. El test del KOH, de fácil realización, se ha llevado a cabo tal como se ha indicado más arriba. La detección de la L-alanina aminopeptidasa, a diferencia del anterior, es un ensayo de probada utilidad para la diferenciación de la estructura de la pared celular (Hernández *y col.*, 1991) y la actividad enzimática se detecta mediante la L-alanina-4-nitroanilida que actúa como sustrato.

Para la realización del ensayo se ha utilizado el kit comercial Bactident<sup>R</sup> Aminopeptidase (Merck Diagnostics). Este sistema contiene unas tiras reactivas impregnadas con el sustrato. Las tiras se incuban en una suspensión acuosa que contiene la bacteria problema, a 37 °C durante 10-30 min. La presencia de L-alanina aminopeptidasa se manifiesta por la aparición de un color amarillo que indica el carácter Gram negativo de la bacteria.

Los cultivos utilizados para preparar las suspensiones bacterianas corresponden a 5 d de incubación a 15 °C, en placas de TSA. Las suspensiones bacterianas se prepararon resuspendiendo una colonia bien aislada en 0.2 mL de agua.

#### 4.6. DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE MEMBRANA EXTERNA

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar entre sus envueltas celulares una membrana externa rica en lipopolisacáridos, que no aparecen en los microorganismos Gram positivos.

Los lipopolisacáridos (LPS) que constituyen el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Nikaido *y col.*, 1979), juegan un papel importante en la permeabilidad de la membrana (Nikaido, 1979), en la resistencia a la fagocitosis (Rest *y col.*, 1977; Robertson *y col.*, 1979), como receptor en la adsorción de algunos bacteriófagos (Rapin *y col.*, 1971) y en los fenómenos de reconocimiento bacteriano (Russa *y col.*, 1982; Whatley *y col.*, 1976)

Los LPS bacterianos parecen estar constituidos, en general, por tres regiones (Nikaido *y col.*, 1979; Wicken *y col.*, 1980) unidas covalentemente: el lípido A, el core del polisacárido y la fracción O-antigénica.

El lípido A generalmente es un disacárido, fosfato de diglucosamina, esterificado con cinco o seis cadenas de ácidos grasos. Una importante fracción de estos ácidos grasos suele ser 2- o 3-hidroxiácidos, que son únicos en los LPS de bacterias Gram negativas (Nikaido *y col.*, 1979).

El core del LPS sirve de unión entre el lípido A y la fracción O-antigénica. Está compuesto, generalmente, por unos 10-12 azúcares de 6, 7 y 8 átomos de carbono. Entre las heptosas más relevantes se encuentra el ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (KDO), (Darveau *y col.*, 1983).

La fracción O-antigénica, es una cadena formada por un número variable de unidades repetitivas de monosacáridos, los más frecuentes son unidades de 3, 4 y 5 carbonos. Esta porción del LPS es la que determina el serotipo de la bacteria (Chester *y col.*, 1973).

Se ha recurrido a la detección de LPS y luego de KDO con la finalidad de dilucidar el carácter Gram positivo o Gram negativo del grupo bacteriano constituido por los aislamientos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4.

#### 4.6.1. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS se preparó a partir de lisados celulares totales digeridos mediante proteinasa K, según el método de Hitchcock y Brown (1983) y Mandatori y Penner (1989). Las preparaciones de LPS se separaron mediante una electroforesis sobre geles de SDS-poliacrilamida y se sometieron posteriormente a una tinción de plata para su observación (Hitchcock y Brown, 1983).

##### 1. Preparación del LPS

Para la obtención del LPS se utiliza una solución salina isotónica de tampón fosfato (IPBS), un tampón de lisis y una solución en proteinasa K:

IPBS: 17.5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  disueltos en 5 L de una solución salina de NaCl al 0.85 % pH 7.0.

TAMPÓN DE LISIS: Glicerol 20 %, 2-Mercaptoetanol 5 %, SDS 4.6 % Tris HCl (pH 6.8) 0.125 % y azul de bromofenol 0.004 %.

PROTEINASA K: 2.5 mg proteinasa K/1mL de tampón de lisis.

Para preparar el LPS de los aislamientos bacterianos antárticos se utilizaron cultivos en placas de TSA de 5 d de incubación a 15 °C. Para la realización del ensayo también se utilizaron tres cepas de referencia, *E. coli* HM42, *Staphylococcus aureus* HS93 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

La biomasa bacteriana de una placa se recoge con 5 mL de tampón IPBS frío y se diluye con el mismo tampón hasta obtener una absorbancia de 0.6 a 600 nm. Un volumen de 1.5 mL se transfieren a un Eppendorf y se centrifuga 3 min en una microcentrífuga (10.000 rpm). El sobrenadante se descarta y el sedimento se disuelve en 0.2 mL de tampón de lisis. La mezcla de células lisadas y componentes celulares solubilizados se calienta durante 10 min a 100 °C para favorecer la acción del tampón de lisis. Se deja enfriar y se añaden 40µL de la solución de proteinasa K para la digestión de las proteínas y con este fin la mezcla se incuba una noche a 37 °C. Los lisados tratados con el enzima se incuban durante 2 h a 65 °C para asegurar la autodigestión de la proteinasa K.

En el ensayo se han obtenido LPS de cada cepa partiendo de unas absorbancias de 0.6, 1.2 y 2.4 ( $\lambda=600\text{nm}$ ), procesando cada muestra por separado y con los mismos volúmenes de reactivos.

## 2. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

Para el fraccionamiento del LPS se realizó una electroforesis vertical en geles de SDS-poliacrilamida. El sistema de electroforesis utilizado fue el Protean II (BIO-RAD, USA). Para el montaje de los geles y la realización de las electroforesis se siguió el protocolo establecido por Sambrook y *col.* (1989).

Las soluciones que se utilizan para la preparación de los geles son las siguientes:

TRIS pH 6.8: TRIS-HCl 0.5 M con SDS al 0.4 %, pH 6.8

TRIS pH 8.8: TRIS-HCl 1.5 M con SDS al 0.4 %. pH 8.8

Solución de acrilamida: acrilamida 30 % y bisacrilamida 0.8 %

Tampón TRIS-Glicina-SDS: TRIS-HCl 25 mM, glicina 0.2 M con SDS al 0.1 %

Todas las soluciones se filtran y se guardan a 4 °C.

La composición de los geles iniciador y separador que se han utilizado en la electroforesis se describe a continuación señalándose las cantidades necesarias para preparar un gel de un tamaño final 16x16 cm.

- **Gel separador:** se utiliza un gel con una concentración de acrilamida del 12 %. Se mezclan 12 mL de la solución de Acrilamida, 7.5 mL de tampón Tris pH 8.8, 10.5 mL de agua, 100  $\mu\text{L}$  de persulfato amónico al 10 % recién preparado y 20  $\mu\text{L}$  de TEMED (N,N,N',N', tetrametil etilendiamina). Se mezcla bien y se utiliza inmediatamente.
- **Gel iniciador:** contiene 1.3 mL de la solución de acrilamida, 2.5 mL de tampón Tris pH 6.8, 6.1 mL de agua, 50  $\mu\text{L}$  de persulfato amónico al 10 % recién preparado y 10  $\mu\text{L}$  de TEMED. Se mezcla bien y se utiliza inmediatamente.

El agua que se utiliza para preparar los geles y las soluciones es agua destilada y filtrada a través de un sistema Milli Q (Millipore).

El gel separador se introduce entre las placas de vidrio que lo han de contener y se deja polimerizar cubriendo la superficie libre con una capa de isobutanol:agua a partes iguales para proporcionar una atmósfera libre de O<sub>2</sub>. Cuando la polimerización ha finalizado se lava la superficie con agua destilada y se introduce el gel iniciador y el peine que dará forma a los pocillos que servirán para contener las muestras. Se deja polimerizar y se lavan los pocillos primero con agua destilada y después con el tampón de electroforesis.

El tampón utilizado para la realización de la electroforesis, en el tanque superior e inferior, fue TRIS-Glicina-SDS. En los pocillos de los geles se introdujeron 10 µL de muestra en el mismo tampón de lisis que contiene glicina para aumentar la densidad y permitir que la muestra penetre en el pocillo y azul de bromofenol para permitir observar la posición del frente de la electroforesis.

Las condiciones para el desarrollo de la electroforesis fueron de 20 mA para el recorrido del gel iniciador aumentándose a 50 mA al alcanzar el gel separador.

### 3. Tinción de Plata

Para observar las bandas originadas por el desarrollo de la electroforesis se procede a realizar una tinción de plata. Las soluciones que se utilizan se detallan a continuación:

<u>Solución de fijación:</u>	Isopropanol	25 %
	Acido acético al 7 % (v/v)	75 %
<u>Solución de oxidación:</u>	Ac. Periódico	1.05 g
	Solución de fijación	4 mL
	Agua destilada	150 mL
<u>Solución de tinción:</u>	NaOH 0.1 N	28 mL
	NH <sub>4</sub> OH al 29.4 %	1.38 mL
	Nitrato de plata 20 %	5 mL

	Agua destilada	115 mL
<u>Solución de revelado:</u>	Ácido cítrico	50 mg
	Formaldehído al 37 %	0.5 mL
	Agua destilada c.s.p.	1 L
<u>Solución de interrupción:</u>	Ácido acético al 7 % (v/v)	10 mL
	Agua destilada	200 mL

Para realizar la tinción los geles se sumergen durante una noche en la solución de fijación. A continuación se someten 5 min a la acción de la solución de oxidación, se realizan 8 lavados de 30 min con agua destilada. Luego se procede a la tinción durante 10 min con la solución de nitrato de plata. Se hacen 4 lavados de 10 min con agua y se procede al revelado durante 10-20 min con la solución de revelado. Se pasa por la solución de interrupción durante 1 h y se lava finalmente con agua destilada.

Para la conservación de los geles se puede proceder al secado sobre papel Whatman durante 2 h en un desecador protegiendo la superficie del gel con un plástico fino.

#### **4.6.2. Ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico (KDO)**

La determinación del KDO se puede realizar sobre el LPS purificado o bien sobre una preparación de pared celular cruda (Hanson y col., 1981). En nuestro caso el KDO se ha detectado en muestras de pared celular extraídas según Work (1971). El método utilizado es el descrito por Weisbach y col. (1959) y modificado por Osborn (1963).

Como controles del ensayo se han utilizado seis cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 2594, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Planococcus citreus* ATCC 14404, *Micrococcus halophilus* (Dr.Ventosa) y *Marinococcus albus* CCM 3517. De todas ellas la primera contiene KDO mientras que las cuatro siguientes al ser Gram positivas no lo presentan y la última presenta KDO a pesar de ser un microorganismo Gram positivo.



## 1. Obtención de la pared celular

Para la obtención de la pared celular se ha partido de 250 mL de cultivo en fase exponencial incubado a 15 °C en el caso de los biotipos problema y a 37 °C y temperatura ambiente para las cepas de referencia. La incubación se ha realizado durante 24 h en agitación (150 rpm).

El sedimento se recoge por centrifugación a 6.000 rpm durante 15 min a 10 °C y se lava dos veces con 50 mL de solución salina fría de NaCl al 0.9 %. Las células lavadas se resuspenden en 20 mL de agua fría, manteniéndolas en hielo para evitar la autólisis. Se procede a sonicar (Sonifier 250, Branson) durante 2 min a intervalos de 30 seg y una intensidad de 60. Después de sonicar la suspensión de células se calienta a 60 °C durante 10 min para inactivar los enzimas autolíticos. Se eliminan los restos celulares a baja velocidad (6.000 rpm durante 10 min) y el sobrenadante que se obtiene se somete a centrifugación a 45.000 rpm, durante 20 min. El sedimento resultante de aspecto translúcido se disuelve en 5 mL de tampón Tris 0.1 M pH 7 frío, con la ayuda de una pipeta Pasteur. Si hubiera alguna fracción central opaca en el sedimento, se procede a disolver la parte translúcida en el tampón TRIS descartando la fracción opaca que corresponde a restos celulares y se vuelve a centrifugar, primero a 6.000 rpm y luego a 45.000 rpm igual que antes.

La solución en tampón Tris que contiene la pared celular se puede guardar en el congelador a -20 °C hasta el momento de procesar la muestra.

## 2. Detección del KDO

El KDO se determina colorimétricamente en la fracción de envueltas celulares obtenida en el apartado anterior. Los reactivos que se utilizan en la colorimetría son los siguientes:

Periodato:  $\text{HIO}_4$  0.025 N disuelto en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.125 N

Ácido Sulfúrico diluido:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N

Arsenito de sodio:  $\text{NaAsO}_2$  0.2 N disuelto en HCl 0.5 N

Ácido tiobarbitúrico: ácido tiobarbitúrico al 3 % disuelto en agua destilada, pH 2

Para proceder a la determinación del KDO en primer lugar se deseca la solución de pared celular en tampón Tris con la ayuda de un rotavapor. La fracción desecada se disuelve en 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N y se calienta durante 20 min a 100 °C con el fin de liberar el KDO del lipopolisacárido.

Sobre 0.1 mL del hidrolizado se vierten 0.1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N. Seguidamente se añaden 0.25 mL de periodato, se mezcla bien y se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo se añaden 0.5 mL de la solución de arsenito de sodio y se deja a temperatura ambiente durante 2 min. A continuación se añaden 2 mL del ácido tiobarbitúrico, se mezcla bien y se calienta a 100 °C durante 20 min. Se deja enfriar y pueden observarse las coloraciones rosas que producen aquellos microorganismos que contienen KDO.

Paralelamente se procesa un patrón de KDO de la misma manera. Para ello, evaporamos hasta sequedad en rotavapor 100 µL de una solución de KDO 0.125 mg/mL, luego se resuspende en 0.2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N y se somete a un proceso de hidrólisis igual que las muestras. El blanco de la colorimetría es H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N, sometido al mismo proceso.

Aunque pueden observarse las reacciones positivas visualmente, también se hace una lectura de las absorbancias a 548 nm. A esta longitud de onda, 0.01 µmoles de KDO poseen una absorbancia de 0.19.

#### **4.7. ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN**

El hallazgo de que diversas bacterias eran competentes para la transformación genética hizo posible el desarrollo del ensayo de transformación por Juni y Heym (1980) y ello permitió reconocer biotipos bacterianos genéticamente relacionados.

El ensayo de transformación facilitó la identificación de un grupo de bacterias de morfología cocobacilar, psicrotróficas, no pigmentadas, inmóviles, Gram negativas y oxidasa positivas, que se incluían en el grupo *Moraxella*-like (Shaw y Shewan, 1968) y que anteriormente habían sido asignadas al género *Achromobater* (Buttiaux y Gagnon, 1959; Shewan y col., 1960). Juni y Heym (1980) demostraron mediante este ensayo la

relación genética entre un gran número de achromobacters procedentes de fuentes muy diversas, utilizando muestras de DNA, las cuales eran capaces de transformar una cepa competente auxotrófica a la prototrofia.

En este estudio el ensayo de transformación se ha llevado a cabo con el grupo bacteriano constituido por los aislamientos antárticos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4

La cepa mutante utilizada como receptora ha sido *Psychrobacter immobilis* CECT 4646 (ATCC 43117) que es auxotrófica para la hipoxantina y que se denomina Hyx-7.

Como controles del ensayo se han utilizado las siguientes cepas bacterianas:

*Psychrobacter immobilis* CECT 5008<sup>T</sup> (ATCC 43116<sup>T</sup>)

*Moraxella nonliquefaciens* CECT 465<sup>T</sup> (ATCC 19975)

*Moraxella bobis* CECT 468<sup>T</sup> (ATCC10900)

Medios de Cultivo utilizados en el ensayo:

- Agar Infusión de Corazón y Cerebro (Brain-Heart Infusion agar, BHI): medio utilizado para el desarrollo de los diferentes biotipos bacterianos.
- Medio M9: medio utilizado para la detección de los transformantes prototróficos de la cepa mutante auxotrófica Hyx-7.

### **Medio M9:**

Para preparar el medio M9 se elaboran las siguientes fracciones:

#### Fracción 1:

Hidrolizado de caseína (Libre de vitaminas y de sales, ICN Pharmaceuticals)	3.2 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.12 g	(o Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 2.12 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g	
NaCl	2.0 g	
MgSO <sub>4</sub>	0.09 g	(o MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.18g)
H <sub>2</sub> O c.s.p.	200 mL	

Los cinco componentes se disuelven en 150 mL de agua destilada y luego se ajusta el volumen a 200 mL. El medio se esteriliza por filtración o bien en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Fracción 2: Agar al 3 %. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min y mantener fundido a 90-100 °C.

Agar Difco	6 g
H <sub>2</sub> O	200 mL

Fracción 3: Solución de glucosa al 50 %. Esterilizar por filtración.

Glucosa	50 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

Fracción 4: Solución de lactato sódico al 60 % (v/v). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Lactato sódico	60 mL
H <sub>2</sub> O	40 mL

#### **Constitución del medio M9:**

La fracción 1 mantenida a temperatura ambiente se mezcla con la fracción 2 mantenida a 90-100 °C. A continuación se añaden 3.2 mL de la solución de glucosa al 50 % (fracción 3) y 2 mL de la solución de lactato sódico al 60 % (fracción 4). El medio M9 así constituido se mezcla bien y se distribuye en placas de Petri a razón de 20 mL por placa.

#### **Preparación del DNA crudo transformante:**

A partir de las cepas que se utilizaran como donadoras se prepara un DNA crudo. Para ello las cepas donadoras se desarrollan en primer lugar sobre BHI. Las temperaturas de incubación han sido de 15 °C para los aislamientos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4, temperatura ambiente (20-22 °C) para *Psychrobacter immobilis* CECT 5008<sup>T</sup> y 30 °C para *Moraxella nonliquefaciens* CECT 465 y *Moraxella bobis* CECT 468.

Una pequeña porción de biomasa celular se recoge del crecimiento en BHI con la ayuda de una asa de Kolle y se disuelve a continuación en 0.5 mL de una solución lisante (Dodecil sulfato sódico, SDS, 0.05 %; NaCl, 0.15 M; Citrato trisódico, 0.15 M) contenida en tubos de 13 mm de diámetro. Las células se resuspenden bien con la ayuda de un Vortex. La cantidad de biomasa celular utilizada para la realización del ensayo no es crítica, es aproximada. La suspensión bacteriana en la solución lisante, se calienta a 60-70 °C en un baño de agua durante 1 h. En el caso de calentar la suspensión durante más tiempo la capacidad transformante del DNA no quedaría afectada.

Este tratamiento lisa las células liberando el DNA y otros productos celulares. El resultado es una solución de DNA libre de bacterias. Las muestras de DNA crudo pueden guardarse en nevera durante mucho tiempo sin perder la capacidad transformante siempre que no se evaporen hasta la sequedad o se congelen.

#### **Ensayo de transformación :**

Para la realización del ensayo de transformación se utiliza la cepa receptora Hyx-7 (*Psychrobacter immobilis* CECT 4646) desarrollada en agar BHI a temperatura ambiente (20-22 °C). Los pasos a seguir se detallan a continuación:

1. Marcar una placa de agar BHI tal como se indica en la figura 1 y poner una pequeña cantidad de biomasa de la cepa Hyx-7 en los seis puntos marcados en la placa como A, B, C, D, E y F.
2. Ensayar cinco muestras de DNA crudo de las cepas donadoras. Para ello se deposita una gota de DNA crudo en el cuadrado correspondiente (B, C, D, E, F) con la ayuda de una pipeta Pasteur y luego se mezcla bien con la biomasa de la cepa receptora Hyx-7 introducida previamente. La mezcla se extiende en una superficie de 5 a 8 mm de diámetro (Fig. 4.7.1.).

El SDS presente en la muestra difunde rápidamente en el agar, mientras que el DNA queda en la superficie para interactuar con la cepa receptora. El cuadrado

“A” quedará como control de la biomasa bacteriana de la cepa Hyx-7 ya que no se somete a ningún tratamiento.

Para el control de las suspensiones de DNA crudo se introduce una gota de cada una de ellas en los cuadrados anexos, que denominaremos B', C', D', E' y F' (Fig. 4.7.1.).

3. Incubar la placa de agar BHI de un día para otro (aproximadamente 16 h) a temperatura ambiente (20-22 °C). Puede incubarse por periodos más cortos de tiempo, 8 h por ejemplo, obteniéndose también resultados satisfactorios.
4. Tras la incubación “over night”, las mezclas de DNA con la cepa receptora (cuadrados B, C, D, E, F) y la cepa receptora sola (cuadrado A) aparecen desarrolladas, mientras que los cuadrados correspondientes al control del DNA crudo no muestran ningún tipo de crecimiento.
5. Con la ayuda de un asa de Kolle estéril se transfiere biomasa bacteriana de cada cuadrado a una placa de medio M9 sembrando una estría uniforme. En una misma placa de M9 se diferencian 6 sectores que tendrán la misma denominación que en la placa de agar BHI, sector A, B, C, D, E y F (Fig. 4.7.1.).

La placa con el medio M9 se incuba durante 3 d a temperatura ambiente (20 - 22 °C).

6. Después de incubar durante 3 d no aparece crecimiento alguno en el sector A donde se encuentra la cepa receptora Hyx-7, que no ha recibido ningún tipo de tratamiento. En el resto de sectores habrá crecimiento bacteriano sólo si se ha producido la transformación durante el desarrollo de la cepa receptora en presencia del DNA crudo de una cepa donadora.

El número de colonias transformantes varía considerablemente dependiendo de la muestra de DNA. Normalmente muestras distintas de DNA crudo de una misma cepa acostumbran a dar siempre el mismo número de colonias transformantes en ensayos repetitivos.

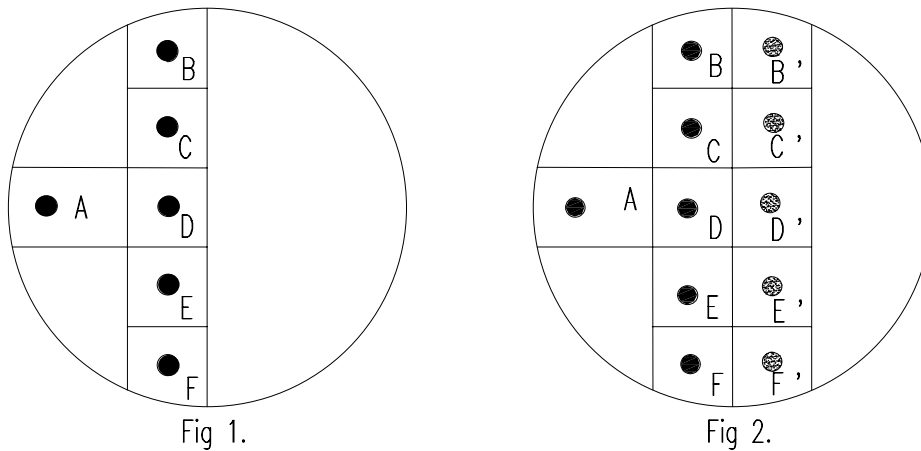
**Figura 4.7.1.** Ensayo de Transformación.

Fig 1.

Fig 2.

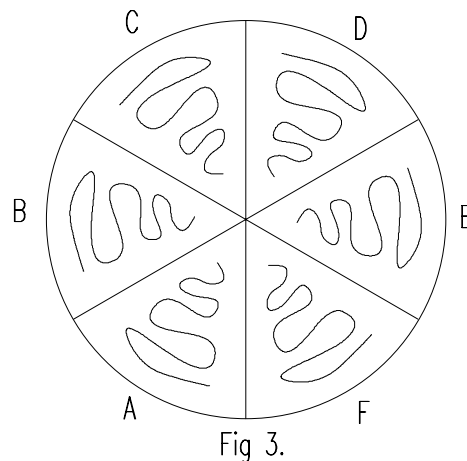


Fig 3.

**Fig 1.** Situación de la cepa receptora Hyx-7 para preparar las mezclas de transformación. La placa de agar infusión de corazón-cerebro se señala tal como se indica en la figura. En los cuadrados de la A a la F se coloca biomasa de Hyx-7.

**Fig 2.** Mezclas de transformación. En los cuadrados de la B a la F, se añaden cinco muestras de DNA crudo correspondientes a 5 biotipos bacterianos diferentes que se mezclan con la cepa Hyx-7 en una superficie de 5 a 8 mm de Ø. En los cuadrados B' a F' se colocan las muestras de DNA crudo correspondientes.

**Fig 3.** Transformación de la cepa Hyx-7 a la prototrofia. En una placa de medio M9 se siembran en estría las biomasas bacterianas procedentes de las mezclas de transformación desarrolladas en agar BHI. Una misma placa de M9 se divide en seis sectores con la misma denominación que en la placa de agar BHI. El sector A corresponderá a la cepa Hyx-7 que no ha sido tratada. Tras la incubación durante 3 d el sector A no debe mostrar crecimiento alguno.

#### 4.8. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los análisis cualitativos y cuantitativos de los ácidos grasos bacterianos se han utilizado ampliamente como herramienta válida para la identificación taxonómica de los microorganismos (Minnikin y *col.*, 1980; Moss, 1981; Suzuki y *col.*, 1983; Dees y *col.*, 1981; De Boer y *col.*, 1986). El estudio de la composición de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases ha culminado en el diseño de sistemas automatizados para la identificación bacteriana basados en este tipo de análisis.

En este sentido MIDI (115 Barksdale Prof. Center, Newark, DE19711, USA) ha creado un sistema rápido de identificación bacteriana mediante cromatografía de gases de los ácidos grasos celulares.

El sistema automatizado para la identificación microbiológica (MIS) consiste, en líneas generales, en una extracción sencilla de los ácidos grasos de la bacteria, seguida de un análisis de estos ácidos por cromatografía de gases y en último lugar se comparan los resultados obtenidos con una amplia base de datos que contiene más de 60.000 análisis de ácidos grasos de cepas de colección y cepas proporcionadas por expertos.

Para la realización de estos análisis debe utilizarse un medio sólido concreto, caldo de triptona-soja y agar. Este medio se prepara con 30 g/L de TSB al que se añaden 15 g/L de agar.

Para la determinación de la composición de los ácidos grasos los aislamientos bacterianos se han incubado a 15 °C durante 5 d. Con fines comparativos en el caso del grupo constituido por NF12, NF22 y NF24 también se ha ensayado la temperatura de 8 °C.

Para proceder al análisis se toman con un asa de platino varias colonias de modo que alcancen una biomasa de unos 40 mg (peso húmedo). Las células se transfieren a un tubo de 10 cm x 13 mm donde se procede a la saponificación, metilación, extracción de los ácidos grasos y lavado de la muestra. Al finalizar este procedimiento se pueden introducir en el cromatógrafo.



Los reactivos que se utilizan en la preparación de la muestra para el análisis por cromatografía de gases son los siguientes:

<b><u>Reactivo de saponificación:</u></b>	NaOH	45 g
	Metanol	150 mL
	H <sub>2</sub> O	150 mL
<b><u>Reactivo de metilación:</u></b>	HCl (6 N)	325 mL
	Metanol	275 mL
<b><u>Reactivo de extracción:</u></b>	Hexano	200 mL
	Metil-terbutil eter	200 mL
<b><u>Reactivo de lavado de muestra:</u></b>	NaOH	10.8 g
	H <sub>2</sub> O	900 mL

El primer paso de saponificación se realiza añadiendo 1.0 mL del reactivo correspondiente a cada uno de los tubos que contienen las respectivas biomazas celulares. Los tubos se sellan bien con tapones de teflón y se someten a 100 °C durante 5 min. Se agitan vigorosamente con la ayuda de un “vortex” durante 5-10 seg y se vuelven a introducir en el baño de agua a 100 °C durante 30 min.

Para proceder a la metilación los tubos se enfrían en hielo y se añaden 2 mL de reactivo de metilación. El pH disminuye a 1.5 o menos, causando la metilación de los ácidos grasos. En este punto los ésteres metílicos de los ácidos grasos son muy poco solubles en la fase acuosa. Para facilitar la metilación los tubos se calientan durante 10 min a 80 °C.

La extracción de los ácidos grasos se realiza mediante la adición de 1.25 mL del reactivo de extracción y se agita suavemente durante 10 min para facilitar la extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en la fase orgánica. La fase acuosa se elimina con la ayuda de una pipeta y se descarta.

El último paso a que se someten los extractos de ácidos grasos es el lavado con el correspondiente reactivo descrito. Para ello se añaden 3 mL del reactivo y se agita suavemente durante 5 min. Este paso permite reducir la posterior contaminación de la columna y del detector al procesar la muestra en el cromatógrafo de gases.

Para el análisis se toman 2/3 partes de la fase orgánica que se introducen en viales para cromatografía de gases. El sistema de cromatografía utiliza una columna capilar de sílice fundida y fenil metil silicona, de 25 m por 0.2 mm.

Para la calibración del sistema se utiliza una mezcla de ácidos grasos saturados de 9 a 20 átomos de carbono ( 9:0 a 20:0) y de 5 hidroxiácidos. El análisis de la mezcla de calibración se va realizando periódicamente, alternando con las muestras problema.

El sistema MIS trabaja automáticamente de manera que se introducen todas las muestras de extractos y la mezcla de calibración. El sistema va procesando cada una de ellas realizando el análisis por cromatografía de gases y luego compara los datos obtenidos con la base de datos, proporcionando finalmente la identificación del microorganismo, además de la composición cuantitativa de los ácidos grasos.

#### **4.9. ANÁLISIS DE QUINONAS**

La mayoría de las bacterias contienen quinonas isoprenoides, ya sean menaquinonas, ubiquinonas o ambas. Estos componentes celulares son en ocasiones altamente valiosos en la determinación del perfil taxonómico de las bacterias. En nuestro caso el análisis de quinonas se ha realizado solamente para los aislamientos NF12, NF22 y NF24. Con fines comparativos, se han utilizado como controles biotipos del género *Shewanella*.

Para la realización del ensayo los aislamientos bacterianos fueron desarrollados en TSB en volúmenes de 250 mL. Los cultivos se incubaron en agitación a 150 r.p.m. durante 24 h a 15 °C. La cepas de referencia fueron desarrolladas en TSB con agua de mar durante 24 h a temperatura ambiente (20-22 °C) y a 150 rpm. La biomasa bacteriana obtenida mediante centrifugación fue liofilizada para su análisis posterior.

Las quinonas isoprenoides fueron extraídas a partir de las células liofilizadas mediante el método de Minnikin *y col.* (1984). La composición de las quinonas isoprenoides fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo a Tamaoka *y col.* (1983).

Para la realización del ensayo se utilizó un cromatógrafo de líquidos CE Instruments modelo Phoenix 20 equipado con una columna fase reversa Spherisorb ODS2 (5 $\mu$ L) (4.6 mm i.d.x 150 mm) y un detector Kontron 535 UV.

Las muestras fueron eluidas con una mezcla de acetonitrilo-isopropanol (65:35 v/v) con un flujo de 1 mL/min. La identificación de las quinonas se realizó mediante un espectrómetro de masas (Platform Micromass) utilizando un divisor de flujo 1/50 para aplicar el caudal apropiado.

Las condiciones de la técnica de ionización utilizada, ionización química a presión atmosférica (APCI), fueron las siguientes:

- Voltaje de la aguja de descarga: 3000 voltios
- Voltaje del electrodo contador: 500 voltios
- Voltaje del cono de muestreo: 40 voltios
- Voltaje del fotomultiplicador: 650 voltios
- Temperatura de la fuente: 80 °C
- Temperatura del nebulizador: 400 °C

Para la determinación de las relaciones molares relativas de las quinonas homólogas se utilizó una mezcla estándar constituida por cantidades conocidas de MK-4 y Q-10.

#### **4.10. PERFIL DE PROTEÍNAS TOTALES**

Una técnica incorporada en los estudios quimiotaxonómicos para la caracterización e identificación bacteriana ha sido la electroforesis de proteínas totales de las células bacterianas. La expresión del genoma bacteriano da lugar a la biosíntesis de más de 2.000 proteínas por parte de la célula bacteriana. La electroforesis de estas proteínas dará lugar a unos perfiles electroforéticos determinados que pueden ser de gran utilidad en la sistemática bacteriana (Kerster y De Ley, 1980; Kersters, 1985; Jackman, 1985, Kersters, 1991).

La separación electroforética de las proteínas totales es una técnica sensible y de un valor taxonómico importante en tanto que aporta información sobre la situación de

proximidad entre especies, subespecies y biovariedades. Concretamente las áreas de aplicación de la separación de proteínas totales mediante electroforesis se podrían desglosar en los siguientes puntos (Kerstens, 1991):

1. Comprobación de la autenticidad bacteriana y diferenciación entre variantes de colonias y contaminantes (Gillis *y col.*, 1983).
2. Rápida agrupación de un amplio número de aislamientos en estudios ecológicos y epidemiológicos.
3. Contribución a la delimitación de nuevos taxones y a la clasificación de diversos grupos bacterianos (Kerstens y De Ley, 1980)

Quando este tipo de análisis se utiliza como complemento de otros estudios taxonómicos, como características fenotípicas, hibridación DNA-DNA y DNA-rRNA, etc., se pueden obtener buenos resultados a nivel de identificación.

El proceso experimental consta de varias etapas. En primer lugar la obtención de los extractos de proteínas a partir de las células enteras, la separación electroforética mediante geles de SDS-poliacrilamida y finalmente la comparación visual de los perfiles electroforéticos originados y los análisis densitométricos de estos perfiles.

A pesar de las ventajas que ofrece la identificación mediante esta técnica, debe señalarse que son muchas las causas que pueden dar lugar a resultados erróneos debido al gran número de etapas involucradas en el proceso. Es por tanto muy importante estandarizar las condiciones y extremar las precauciones (Kerstens and De Ley, 1980).

La comparación de los perfiles electroforéticos debe realizarse siempre con microorganismos que han crecido en las mismas condiciones: el mismo medio de cultivo y el mismo tiempo de incubación. La estrategia experimental que se ha seguido en nuestro caso corresponde a la descrita por Pot y Kersters (1991):

1. Obtención de los extractos de proteínas totales de la célula entera.
2. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.
3. Tinción de los geles.
4. Comparación de los perfiles electroforéticos.

### 1. Obtención de los extractos de proteínas totales

En primer lugar se describen las soluciones y reactivos utilizados para la obtención de los extractos de proteínas totales a partir de las células bacterianas enteras.

#### **Tampón salino de fosfato de sodio (NaPBS):**

NaCl	8 g
Tampón fosfato sódico 0.2 M (c.s.p.)	1 L    pH 7.3

#### **STB:**

Tris	0.75 g
Mercaptoetanol (SHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH)	5 mL
Sacarosa	5 g
Agua Milli Q (c.s.p.)	100 mL

Disolver 0.75 g de Tris en 50 mL de agua y ajustar el pH a 6.8 con HCl 1.72 N (3.45 mL). Añadir 5 mL de mercaptoetanol y completar con el volumen necesario de agua para 100 mL.

#### **Solución de SDS al 20 %:**

Dodecil sulfato de sodio	20 g
Agua milli Q (c.s.p.)	100 mL

En el proceso de obtención de los extractos de proteínas totales es muy importante estandarizar las condiciones de cultivo que se utilizan para obtener posteriormente resultados comparables. Para ello se realizan primeramente dos subcultivos en tubos inclinados de TSA de 48 h de incubación a 15 °C para todas las cepas problema de origen antártico y a la temperatura óptima para las cepas de referencia utilizadas.

El crecimiento del último subcultivo se resuspende en 2 mL de tampón fosfato de sodio 0.01 M, pH 7.0 y a partir de esta suspensión se siembran de forma confluyente tres placas de TSA con 0.1 mL. Los cultivos en placa TSA se incuban en las mismas condiciones que los subcultivos anteriores.

Tras el período de incubación el crecimiento bacteriano se recoge con 7 mL de NaPBS por placa. La suspensión bacteriana se filtra a través de una gasa de nylon para facilitar eliminación de material extracelular tipo polisacárido. Con este fin se puede añadir más volumen de NaPBS para limpiar. Se homogeniza bien la suspensión celular con un agitador magnético y luego se centrifuga a 6.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se descarta y el sedimento se disuelve en 30 mL de tampón NaPBS. Se centrifuga de nuevo a 6.000 rpm durante 20 min y se repite otro lavado con NaPBS, igual que antes.

Se pesan en un tubo Eppendorf 70 mg en peso húmedo del sedimento resultante y se añaden 0.9 mL de STB, mezclándolo bien con ayuda de un “vortex”. A continuación se adicionan 0.1 mL de la solución de SDS al 20 %. Se homogeniza bien y se calienta a 95 °C durante 10 min. Rápidamente se enfrían los Eppendorfs en hielo y se centrifugan a 10.000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga.

El sobrenadante que contiene las proteínas totales se guarda congelado hasta el momento del análisis. Para una buena conservación de los extractos es conveniente una temperatura de -80 °C.

En el caso de bacterias Gram positivas o con envueltas difíciles de romper se procedería a la sonicación de las células resuspendidas en el tampón STB durante 3 min a intervalos de 30 seg y a una intensidad de 60. El resto del proceso es igual al descrito.

## **2. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida**

La separación de proteínas totales se ha realizado mediante electroforesis vertical sobre geles de SDS-poliacrilamida. Para el montaje de los geles y la electroforesis se utilizó el sistema MINIPROTEAN II (BIO RAD, USA).

El protocolo seguido es el descrito por Pot y Kersters (1991) que básicamente coincide con el de Sambrook (1989) para electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida descrito en el apartado (4.6.1).

A continuación se indican las distintas soluciones utilizadas para la elaboración de los geles y el desarrollo de la electroforesis:

- Tampón separador: Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8
- Tampón iniciador: Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
- Solución de acrilamida:

Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g
Agua Milli Q c.s.p.	100 mL

(Conservar a 4 °C no más de 15 días)

- SDS: Solución de dodecil sulfato de sodio al 10 % (p/v)  
(Conservar a temperatura ambiente)
- Tampón para ajustar el volumen de la muestra:

Agua Milli Q	4.0 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10 %	1.6 mL
Mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.1 % (p/v)	0.2 mL

Repartir los 8 mL de tampón resultante en tubos eppendorfs y conservar a -20 °C hasta el momento de su utilización.

- Tampón del tanque superior de la electroforesis:

Tris	1.5 g
Glicina	7.2 g
SDS 10%	2.5 mL
Agua Milli Q c.s.p.	500 mL

(pH 8.59)

(Se prepara inmediatamente antes de usar)

- Tampón del tanque inferior de la electroforesis:

Tris	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS	1.0 g
Agua Milli Q c.s.p.	1000 mL

(pH 8.59)

(Conservar a temperatura ambiente no más de 7 días)

- Marcador de peso molecular: Estándar de bajo peso molecular, 14 a 97 Kdaltones. (Bio Rad)

Los geles separador e iniciador que se utilizan en la electroforesis tienen un 12 % y un 5 % de acrilamida respectivamente. Las cantidades que se utilizan para preparar dos geles se detallan a continuación:

- Gel separador:

Agua Milli Q	2.7 mL
Tampón separador	2.5 mL
Solución de acrilamida	4.7 mL
SDS 10%	100.0 µL
Mezclar bien y añadir:	
TEMED	5.0 µL
APS (Persulfato de Amonio al 10 %, recién preparado)	50.0 µL

Homogenizar bien e introducir rápidamente entre las placas de vidrio para preparar el gel separador.

- Gel iniciador:

Agua Milli Q	4.0 mL
Tampón Iniciador	1.75 mL
Solución de acrilamida	1.2 mL
SDS 10%	70.0 µL
Mezclar bien y añadir:	
TEMED	10.0 µL
APS 10%	50.0 µL

Homogenizar bien y utilizar inmediatamente como en el caso anterior.

El gel separador es el que se prepara en primer lugar y se vierte entre las placas de vidrio que lo han de contener. Para facilitar la polimeración del gel se cubre la superficie libre con una mezcla de isobutanol-agua (1:1) que proporciona una atmósfera sin oxígeno. Se deja polimerizar durante 30 min a temperatura ambiente (20-22 °C).

Tras la polimerización se elimina la capa de isobutanol:agua mediante lavados de la superficie del gel con agua destilada. A continuación se procede a introducir la solución del gel iniciador recién preparada y el peine para formar los pocillos. Dejar polimerizar durante 30 min a temperatura ambiente (20-22°C). Una vez polimerizado se saca el peine y se lavan los pocillos con agua. A continuación se montan los geles en la cubeta de electroforesis y se procede al llenado parcial del tanque inferior.



En este punto se introducen las muestras en cada pocillo, de 10 a 20  $\mu\text{L}$  de extracto proteico por pocillo. El volumen se completa hasta 30  $\mu\text{L}$  con el tampón para ajustar el volumen de la muestra.

Cuando las muestras están cargadas se acaba de llenar el tanque inferior y se procede al llenado del tanque superior con los tampones correspondientes.

Las condiciones de la electroforesis han sido de 40 mA.

### 3. Tinción de los geles

La observación de los perfiles electroforéticos se realiza mediante una tinción con Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G 250, Fluka). Las diferentes soluciones que se utilizan en el proceso son las siguientes:

- Solución de tinción: Azul de Coomassie al 0.25 % (p/v) en Metanol - Ac.acético - Agua 5:1:5 (v/v)

Azul de Coomassie	550 mg
Metanol	100 mL
Ácido acético	20 mL
Agua	100 mL

- Solución de decoloración: Metanol – Ácido acético – Agua 5:1:5 (v/v)

Metanol	100 mL
Ácido acético	20 mL
Agua	100 mL

- Solución de decoloración 2: Metanol – Ácido acético – Agua 1:1:18 (v/v)

Metanol	10 mL
Ácido acético	10 mL
Agua	180 mL

- Solución de hidratación:

Glicerol	5 %
Etanol	25 %
Agua	70 % (v/v)

Al finalizar la electroforesis los geles se sumergen en la solución de tinción. El proceso de tinción se realiza durante 1 h con agitación suave y a temperatura ambiente, igual que los siguientes pasos.

Tras la tinción los geles quedan totalmente azules y se decoloran mediante sucesivos pases en las soluciones de decoloración. Una hora en la primera solución de decoloración y a continuación otra hora en la segunda. En este momento las bandas ya se distinguen con claridad.

Finalmente, los geles se sumergen en una solución de hidratación durante una hora, antes de proceder al secado tal como se indica en el apartado (4.6.1).

#### **4. Comparación de los perfiles electroforéticos**

En nuestro caso, la comparación de los perfiles electroforéticos de las cepas problema respecto a las cepas de referencia se ha realizado de forma visual.

### **4.11. COMPOSICIÓN DE BASES DEL DNA BACTERIANO**

#### **1. Aislamiento y purificación del DNA**

El aislamiento y purificación del DNA bacteriano de todos los biotipos bacterianos, excepto 20 CM y 20 CO, se ha realizado de acuerdo al método de Marmur (1961), el cual utiliza cloroformo para eliminar las proteínas de los lisados celulares.

En la extracción del DNA se han utilizado los siguientes reactivos:

- Tampón EDTA salino: NaCl 0.15 M  
EDTA Na<sub>2</sub> 0.01 M  
pH 8.0
- SDS: Dodecil sulfato sódico al 20 % (p/v)
- Perclorato de sodio: NaClO<sub>4</sub> 5 M
- Cloroformo-isopentanol: 24:1 (v/v)

- SSC: NaCl 0.15 M  
Citrato trisódico 0.015 M  
pH 7.0

Las soluciones que realmente se utilizan son una dilución 1/10 (SSC x 0.1) y otra 20 veces concentrada (SSC x 20):

SSC x 0,1: NaCl 0.015 M  
Citrato trisódico 0.0015 M  
pH 7.0

SSC x 20: NaCl 3 M  
Citrato trisódico 0.3 M  
pH 7.0

- Ribonucleasa: RNasa bovina 1 mg/mL, en NaCl 0.15 M  
pH 5.0

Las bacterias se incuban en erlenmeyers con 250 mL de TSB, a 15 °C y en agitación (150 rpm), durante 24-48 h. Previamente, el medio de cultivo ha sido inoculado con 5 mL de una suspensión bacteriana en Ringer ¼, preparada con el crecimiento bacteriano de un tubo de TSA de 48 h de incubación a 15 °C.

El cultivo líquido se centrifuga a 6.000 rpm 15 min a 10 °C. Las células se lavan dos veces con 50 mL de tampón EDTA salino. El sedimento resultante, de 2 a 3 g de células en peso húmedo, se resuspende en 25 mL de solución EDTA salino. Se añade entonces SDS al 20 % hasta una concentración final del 1 %. La suspensión bacteriana se calienta entonces a 60 °C hasta que se produzca la lisis celular, la cual se detecta por un aumento de la viscosidad y por un cambio en el aspecto de la suspensión que pasa de turbia a opalescente.

En el caso de bacterias que no son sensibles a la lisis por SDS, como ocurre por ejemplo con la mayoría de las bacterias Gram positivas, debe de realizarse un tratamiento previo al SDS con lisozima. En nuestro caso todos los aislamientos bacterianos estudiados han sido sensibles a la lisis por SDS.

Los lisados celulares viscosos se enfrían para añadir la solución de perclorato hasta una concentración final 1 M. A partir de aquí se procede a la extracción de proteínas

con medio volumen de cloroformo-isopentanol, agitando los lisados durante 30 min. La agitación debe ser justa la necesaria para crear una emulsión. Una agitación muy vigorosa no es conveniente.

Para eliminar la proteína se centrifuga el lisado a 12.000 rpm a 4-10 °C durante 10 min. Quedan dos fases, la superior acuosa que contiene el DNA y la inferior clorofórmica. Entre las dos fases queda una interfase de proteína. La fase acuosa se extrae con mucho cuidado, con la ayuda de una pipeta despuntada o bien con una pipeta Pasteur con el extremo curvado, evitando así arrastrar la interfase de proteínas.

El proceso de extracción con cloroformo-isopentanol se va repitiendo hasta que quede muy poca proteína en la interfase, momento en el que se procede a precipitar el DNA con etanol del 96 % frío. Para ello se utilizan aproximadamente dos volúmenes de etanol por cada uno de fase acuosa. El DNA se recoge enrollado en una varilla de vidrio y se deja secar al aire hasta eliminar el exceso de alcohol. En el caso de que el DNA no se enrolle bien y queden hebras de DNA sueltas, se recogen centrifugando 10 min a 6.000 rpm a 10 °C.

El DNA se disuelve en 10 mL de SSC x 0.1. El volumen de SSC x 0.1 utilizado dependerá también de la cantidad de DNA recogido. Una vez disuelto el DNA se ajusta la concentración a SSC x 1 añadiendo 0.5 mL de SSC x 20 por cada 10 mL de SSC x 0,1. Posteriormente la solución de DNA se somete a la acción de la RNasa, añadiéndose ésta a una concentración final de 50 µg/mL e incubando durante 30 min a 37 °C. Una vez finalizado el tratamiento con la RNasa se procede a repetir extracciones con cloroformo-isopentanol durante 15 min hasta que quede muy poca proteína en la interfase. Una vez finalizada la purificación del DNA, éste se precipita con etanol frío y se disuelve en SSC igual como se ha indicado más arriba. Este proceso de precipitación y disolución se repite varias veces a fin de eliminar los restos de RNA que pudieran quedar.

El DNA así preparado se guarda congelado a -20 °C o en nevera con unas gotas de cloroformo.

La pureza del DNA bacteriano extraído se determinó por el cálculo de las relaciones de absorbancia  $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$  y  $A_{260\text{nm}} : A_{230\text{nm}}$  (Johnson, 1981). Cuando el DNA está libre de proteína y otros materiales contaminantes, las relaciones anteriores tienen un valor entre 1.8 y 2 para  $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$  y entre 2,0 y 2,2 para  $A_{260\text{nm}} : A_{230\text{nm}}$ .

La cepa 20 CM fue procesada en el Servicio de Identificación BCCM/LMG Bacteria Collection, del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent en Bélgica. En este caso el DNA bacteriano fue preparado de acuerdo al método de Gevers *et al.* (2001).

## 2. Determinación del contenido en C+G.

El contenido G+C del DNA bacteriano se determinó a partir de la temperatura media de fusión del DNA ( $T_m$ ), obtenida al realizar el perfil de desnaturalización del DNA (Marmur y Doty, 1962).

En primer lugar, las muestras de DNA conservadas en SSC se precipitan en etanol tal y como se ha indicado en el apartado anterior y luego el DNA se disuelve en SSC x 0.1. Posteriormente se procede a dializar durante 48 h en SSC x 0.1 a 4 °C, realizando 8 cambios de la solución de diálisis. Este proceso permite eliminar contaminantes como cationes divalentes o restos de cloroformo (Mandel y Marmur, 1968).

Para obtener el perfil de desnaturalización térmico, la solución de DNA se diluye en SSC x 0.1 hasta una absorbancia de 0.4 a 260 nm.

En el caso de los aislamientos NF12, NF22, NF24, NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20 y NF23, la curva de desnaturalización térmica se determina en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-VIS 551S a 260 nm. La temperatura inicial de partida fue de 25 °C, con incrementos de 1 °C/min hasta finalizar la desnaturalización del DNA.

Para los aislamientos EN1, EN2, EN4, la curva de desnaturalización se determina en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-210 a 259 nm, siendo la temperatura inicial de partida y los incrementos de temperatura igual que en el caso anterior.

La  $T_m$  se calcula gráficamente, tal y como describen Ferragut y Leclerc (1976), sobre las curvas obtenidas al representar la absorbancia frente a la temperatura.

Para el primer grupo de aislamientos mencionado el contenido en G+C se calcula a partir de la  $T_m$  obtenida en SSC x 0.1 aplicando la ecuación de Owen y Hill (1979), que corresponde a:

$$\%G+C = (T_m - T_m_{E.coli}) 2.08 + 50.9$$

El  $T_m$  del DNA de referencia de *E.coli* NCTC 9001 es igual a 74.6 °C en SSC x 0.1 (Owen y Pitcher, 1985).

Para los biotipos EN1, EN2, EN4, el contenido en G+C se calcula en cambio mediante la ecuación de Mandel y Marmur (1968):

$$\%G+C = (T_m - 53.9) 2.4$$

El contenido en G+C del biotipo 20 CM fue determinado mediante HPLC en el servicio de Identificación BCCM/LMG Bacteria Collection, del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent en Bélgica, tal como describe Mesbah *et al.* (1989).

#### **4.12. HIBRIDACIÓN DNA-DNA**

Los análisis de hibridación DNA-DNA fueron llevados a cabo en el Servicio de Identificación BCCM/LMG Bacteria Collection, del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent en Bélgica.

En el caso del grupo constituido por las cepas NF12, NF22 y NF24, los niveles de hibridación DNA-DNA entre los aislamientos bacterianos y las cepas tipo del género *Shewanella* se determinaron espectrofotométricamente mediante el método de De Ley

y *col.* (1970). Para ello, el DNA genómico fue extraído de acuerdo al método de Marmur (1961).

En el caso del grupo de aislamientos bacterianos NF1, NF7, NF8, NF11, NF18, NF19, NF20, NF23, EN1, EN2 y EN4 y también para la cepa 20 CM, el DNA genómico fue preparado mediante el procedimiento de Wilson (1987). El nivel de relación DNA-DNA entre los aislamientos de un mismo grupo y las correspondientes cepas tipo correspondientes a los géneros *Psychrobacter* y *Paenibacillus* respectivamente, fue determinado fluorimétricamente a 37 °C de acuerdo a una modificación del método descrito por Ezaki y *col.* (1989).

Para determinar la homología DNA-DNA según el método de Ezaki y *col.* (1989), se realizaron cuatro hibridaciones A X B y cuatro hibridaciones recíprocas B x A. De los ocho valores obtenidos se utilizan al menos dos valores de las hibridaciones A x B y dos valores de B x A. A continuación se calcula el valor medio para la serie A x B y el valor medio para la serie B x A. El nivel de relación DNA-DNA que se presentará en la tabla de resultados, corresponde al valor medio mas bajo multiplicado por la raíz cuadrada de la división entre el valor medio más alto por el valor medio más bajo. Este dato no corresponde exactamente a la media matemática, pero se encuentra muy próximo. Junto a este dato, que expresa la homología DNA-DNA en la tabla de resultados, se indica entre paréntesis la diferencia entre los valores medios de la serie A x B y la recíproca B x A. Con esta técnica, la media de la desviación estándar es de 14 unidades (Goris y *col.*, 1998). Desviaciones hasta 20-25 unidades son aún aceptables.

#### 4.13. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los análisis de secuenciación del rRNA 16S fueron llevados a cabo en el Servicio de Identificación BCCM/LMG Bacteria Collection, del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent en Bélgica.

Para la determinación de la secuencia del rRNA 16S, el DNA genómico fue extraído y preparado según Pitcher y *col.* (1989). Mediante la técnica de PCR (Saiki y *col.*, 1988) el gen rRNA 16S fue ampliado utilizando los siguientes *primers*:

Nombre <sup>a</sup>	Sinónimo	Secuencia (5' → 3')	Posición <sup>b</sup>
16F27	pA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8-27
16R1522	pH	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA	1541-1522

<sup>a</sup> F: *primer* iniciador/ R: *primer* finalizador

<sup>b</sup> Posición de hibridación referida a la secuencia del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*.

El DNA resultante de la amplificación por PCR fue purificado mediante la utilización de un kit para la purificación de PCR denominado QIAquick de Quiagen GmbH (Hilden, Alemania).

Los DNAs amplificados y purificados fueron secuenciados en un secuenciador de DNA (Applied Biosystems modelo 377; Perkin-Elmer, Applied Biosystems Div., Foster City, Ca., USA) tal como indica el fabricante, utilizando el kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit con AmpliTaq® DNA Polimerasa.

En la secuenciación fueron utilizados los siguientes *primers* :

Nombre <sup>a</sup>	Sinónimo	Secuencia (5' → 3')	Posición <sup>b</sup>
16F358	Gamma	CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT	339-358
16F536	PD	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	519-536
16F926	O	AAC TCA AAG GAA TTG ACG G	908-926
16F1112	3	AGT CCC GCA ACG AGC GCA AC	1093-1112
16F1241	R	GCT ACA CAC GTG CTA CAA TG	1222-1241
16R339	Gamma	ACT GCT GCC TCC CGT AGG AG	358-339
16R519	PD	GTA TTA CCG CGG CTG CTG	536-519
16R1093	3	GTT GCG CTC GTT GCG GGA CT	1112-1093

<sup>a</sup> F: *primer* iniciador/ R: *primer* finalizador

<sup>b</sup> Posición de hibridación referida a la secuencia del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*.

Las secuencias fueron ensambladas mediante el programa Auto Assembler™ de Applied Biosystems. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el software Gene Compar de Applied Maths (Kortrijk, Bélgica), permitiendo la comparación de la secuencia problema con las secuencias de las subunidades ribosomales pequeñas contenidas en la base de datos internacional de secuencias de nucleótidos de la



librería EMBL. El árbol filogenético fue construido aplicando el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987).

Las secuencias del rRNA 16S de los aislamientos bacterianos estudiados han sido depositadas en la base de datos Gen Bank/EMBL/DDBJ con su correspondiente número de acceso.