



Caracterización estructural de bacterias antárticas adaptadas al frío y detección de nuevos emulsionantes: estudio de la cepa *Shewanella vesiculosa M7^T*

Alina Frías Seoane

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias

Programa de Doctorado: Biotecnología

Bienio: 2010-2012

***“Caracterización estructural de bacterias antárticas adaptadas al frío y
detección de nuevos emulsionantes: estudio de la cepa
Shewanella vesiculosa M7^T”***

Memoria presentada por Alina Frías Seoane para optar por el grado de Doctora por la
Universidad de Barcelona

Directora de Tesis

Codirectora

Doctoranda

Dra: M. Elena Mercadé Gil

Dra. M. Angeles Manresa Presas

Alina Frías Seoane

Barcelona, Septiembre 2012

Este Tesis Doctoral ha sido realizada con el apoyo de:

-Beca AECI-MAEC del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación del Gobierno de España.

-Proyecto CTQ2010-21183-C02-01/PPQ del Ministerio de Ciencia e Innovación.

-Proyectos de la Generalitat de Catalunya, 2009SGR819 y 2009SGR1212

*A la memoria del profesor Dr. Jorge Martínez Silva
Universidad de La Habana*

*“Sólo si se sabe se puede divisar el bien”
Sócrates*

*A mi hijito, esperando que sepa comprender esta ausencia de su madre
A mis padres, por el titánico esfuerzo e incondicional apoyo
A mi hermano Luis Enrique, porque merecía cumplir sueños*

AGRADECIMIENTOS

Decía el poeta ... *“todo está dicho ya, pero mientras que las palabras sean sinceras son nuevas”*. Entonces no será difícil escribir agradecimientos por miles de razones a tantas personas que tuvieron a bien este trabajo.

Primeramente a la tutora de esta tesis Dra. Elena Mercadé, no sólo por dirigir este trabajo con excelencia siempre presta a ofrecer su caudal de conocimientos, sino también por su exquisita paciencia en estos años. Igualmente agradecida por siempre a la Dra. Angeles Manresa, por su gran amistad y confianza y un enorme apoyo demostrado del que me sentiré deudora eternamente.

Agradezco a los miembros de este tribunal por acceder desde el principio a estar presentes en este día. A la AECI por hacerme beneficiaria de una beca que ayudó a comenzar un sueño.

Agradecer el apoyo brindado por la Dra. Carmen López-Iglesias de la Unidad de Microscopía Electrónica (Servicios Científicos-Técnicos de la Universidad de Barcelona) y Elisenda Coll por la inestimable ayuda para adentrarme al fascinante mundo de la microscopía. De igual manera a la Dra. Eliandre Oliveira, de la Unidad de Proteómica, por su apoyo en estas técnicas, así como al Dr. Isidre Casals y Victoria Ruiz de la Unidad de Servicios Científicos Técnicos de la Universidad de Barcelona, por el apoyo ofrecido para la caracterización química.

Especial agradecimiento al claustro de profesores del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias, por hacerme sentir bienvenida desde el inicio y permitir la realización de esta tesis doctoral. Mención especial para María de Jesús, Lucía y Carmen por tantas atenciones inmediatas con el manejo del laboratorio. A la Dra. Josefa Badía por su increíble poder resolutivo de facilitar gestiones y ser tan accesible.

Especial agradecimiento a la familia Aquilini por el calor humano y en especial a la joya de la corona, su hija Eleonora, por una italianísima amistad y hospitalidad, que hicieron definitivamente mis días y mi vida mejores.

Al amigo Eriel, quien ha sido con su amistad y ejemplo muy importante para conseguir este día. A los amigos descubiertos en el laboratorio como Samira, por los momentos de paz que aun se extrañan, a la dulce Teresa por su compañía y amistad y a la gran Silvana por su alegría contagiosa y una amistad a toda prueba. Gracias a los que me han acompañado estos años en el laboratorio, Sara, Carla, Nacho y Ornella. A Rocío y Antonia por tanta cariño, a Xenia por su ayuda en los finales.

Mil agradecimientos al Dr. Manuel Mansur, a Mylene, Vivian, Hansel y Booby McFerrin, por la amistad, apoyo y sin dudas buenos momentos compartidos.

A la amiga y hermana Aouatef Kerkeb no sólo por su gran amistad y generosa hospitalidad sino también por una confianza digna de alabanzas en tiempos en que es tan raro. Gracias por el mecenazgo a esta tesis cuando ya todo parecía que no podía ser. Gracias a dos pequeños grandes hombres que son tus educados hijos, Neil y Ryan. Mi gratitud infinita hacia ti y tu familia, bien sabes que sin tu inmensa ayuda imposible haber llegado hasta aquí.

A mis amigos en Cuba, por un apoyo emocional a través de sus mensajes que ayudaron a minimizar esta distancia oceánica y estar al tanto de los míos. A Roxana, por su discreta amistad y sensibilidad. A Norka, por la energía positiva que siempre desprende en tiempos tan difíciles, a mi querido amigo Frank, por esa capacidad linda de poder contar siempre con él. A la dulce Amelia y al Dr. Dejongh por su cariño y aliento desde lejos.

A mi querido profesor Dr. Jorge Martínez Silva de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, por una amistad que tan lindos recuerdos aún conservo y porque no sé de qué manera premonitoria daba por hecho que lo conseguiría.

A mis mosqueteros de siempre que aunaron fuerzas para que este sueño se lograra. A mi querido hijito Ernesto, por su amor, comprensión, paciencia y saber estar, empleando este tiempo en convertirse en la personita linda que es, con un nivel de concentración en sus estudios dignos de admirar. Te quiero mi niño y eso es el principio de todo, sabes que la mejor herencia que puedo darte es un buen ejemplo y educación. Toma este día como

referente de perseverancia, de sueños por cumplir y sueña tu alto también que en el amor y en los sueños no hay imposibles.

A mi madre y mi padre por todo el cariño de siempre, por una confianza inagotable y un apoyo vitalicio, por enseñarme a pensar en plural, por el aliento de que había que continuar y por sugerir que siempre hay que ir a más. Sin ustedes realmente nada. A mi hermano Luis Enrique por un ejemplo de estudio que aún no alcanzo, te sigo extrañando mucho. Y al Dr. Joel Cagide, por iluminarme los días.

Sólo reafirmales que les tendré gratitud infinita a todos por siempre y parafraseando a un físico y no por ello menos poeta....” *si pude más fue porque me apoyé en hombros de gigantes*”.

Muchas gracias!

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I.INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS) | 1 |
| 1.1 Aspectos generales | 1 |
| 1.2 Funciones biológicas | 3 |
| 1.3 Composición química y producción de los EPS | 5 |
| 1.4 Visualización de los EPS | 9 |
| 1.5 Aplicaciones biotecnológicas | 11 |
| 1.6 EPS en ecosistemas marinos de la Antártida | 13 |
| 2. Vesículas de membrana externa (VME) | 19 |
| 2.1 Características generales de las VME | 20 |
| 2.2 Obtención y análisis del contenido de VME | 21 |
| 2.3 Funciones de las VME | 23 |
| 2.3.1 Las VME como sistema de secreción | 24 |
| 2.3.2 Las VME como factores de supervivencia | 25 |
| 2.3.3 Las VME en la adquisición de nutrientes | 26 |
| 2.3.4 Las VME como factores de patogenicidad | 26 |
| 2.3.5 Las VME en la transferencia de material genético | 28 |
| 2.3.6 Las VME en la comunicación celular y formación de biofilms | 29 |
| 2.4 Biogénesis de las VME | 32 |
| II.OBJETIVOS | 39 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 43 |
| 1. Microorganismos, medios, condiciones de cultivo y conservación | 43 |
| 1.1 Microorganismos | 43 |
| 1.2 Medios de cultivos | 43 |
| 1.3 Condiciones de cultivo | 46 |
| 1.3.1 Cultivos sólidos | 46 |
| 1.3.2 Cultivos líquidos | 46 |
| 1.4 Conservación y mantenimiento de las cepas | 47 |

| | |
|--|----|
| 2. Técnicas de microscopía | 47 |
| 2.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET) | 47 |
| 2.1.1 Tinción negativa de VME | 47 |
| 2.1.2 Criofijación por alta presión-Criosustitución-Inclusión (High Pressure Freezing and Freeze- Substitution, HPF-FS) | 47 |
| 2.1.3 Cortes ultrafinos | 48 |
| 3. Producción, aislamiento, cuantificación y purificación de VME y aislamiento de membrana externa celular | 48 |
| 3.1 Producción y aislamiento de VME | 48 |
| 3.2 Cuantificación de VME | 49 |
| 3.3 Purificación de VME | 49 |
| 3.4 Contenido de proteínas en VME | 50 |
| 3.5 Determinación de ácidos grasos de VME | 50 |
| 3.6 Obtención de membrana externa bacteriana (ME) | 51 |
| 3.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS | 51 |
| 4. Estudio proteómico para la identificación de proteínas de VME | 52 |
| 4.1 Electroforesis SDS-PAGE y tripsinización de las bandas | 52 |
| 4.2 Espectrometría de masas y análisis de datos | 52 |
| 5. Cribado inicial de la actividad emulsionante en cepas procedentes de la Antártida | 53 |
| 6. Cinética de crecimiento y actividad emulsionante de <i>Shewanella vesiculosa</i> M7^T en medio MM5 | 53 |
| 7. Obtención del material extracelular (EPS) de <i>S.vesiculosa</i> M7^T | 54 |
| 8. Caracterización química del EPS liofilizado de <i>S.vesiculosa</i> M7^T | 54 |
| 8.1 Determinación de la concentración de carbohidratos totales | 54 |
| 8.2 Determinación de proteínas totales del EPS | 55 |
| 8.3 Determinación de lípidos totales del EPS | 55 |
| 8.4 Extracción de lípidos polares del EPS y desarrollo de la TLC bidimensional | 55 |
| 8.5 Determinación de azúcares por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrómetro de masas (<i>High performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>) (HPLC/MS) | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 8.6 Determinación de aminoácidos del EPS | 56 |
| 8.7 Análisis del lipopolisacárido (LPS) del EPS | 57 |
| 9. Determinación de actividad emulsionante | 57 |
| 10. Determinación de tensión superficial | 58 |
| IV. RESULTADOS | 61 |
| 1. Estudio estructural de las bacterias de la Antártida adaptadas al frío y de sus EPS | 61 |
| 2. Caracterización de VME de bacterias de la Antártida adaptadas al frío | 66 |
| 2.1 Obtención, tinciones negativas y perfil proteico de las VME | 66 |
| 2.2 Influencia de la temperatura en las VME de <i>S. livingstonensis</i> NF22 ^T | 70 |
| 2.2.1 Estudio estructural a diferentes temperaturas | 70 |
| 2.2.2 Cuantificación de las VME a distintas temperaturas | 72 |
| 2.2.3 Análisis del contenido proteico de las VME | 73 |
| 2.2.4 Composición de ácidos grasos de VME | 74 |
| 2.2.5 Estudio proteómico de las VME de <i>S. livingstonensis</i> NF22 ^T a diferentes temperaturas | 76 |
| 2.2.6 Estudio proteómico de las VME de <i>S. vesiculosa</i> M7 ^T | 79 |
| 3. Cribado para detectar actividad emulsionante en cultivos de bacterias de la Antártida adaptadas al frío | 85 |
| 4. Estudio de la capacidad emulsionante de distintas fracciones del cultivo de bacterias de la Antártida adaptadas al frío | 88 |
| 5. Estudio del crecimiento y actividad emulsionante de <i>S.vesiculosa</i> M7^T | 90 |
| 6. Caracterización química del EPS de <i>S.vesiculosa</i> M7^T | 91 |
| 6.1 Obtención del EPS de <i>S. vesiculosa</i> M7 ^T | 91 |
| 6.2 Composición química general del EPS de <i>S. vesiculosa</i> M7 ^T | 92 |
| 6.2.1 Composición química de azúcares del EPS | 93 |
| 6.2.2 Composición de aminoácidos del EPS | 95 |
| 6.2.3 Lípidos polares del EPS | 96 |
| 6.3 Análisis del LPS | 97 |
| 7. Estudio de la capacidad emulsionante del EPS de <i>S.vesiculosa</i> M7^T | 98 |

| | |
|---|-----|
| V. DISCUSIÓN | 103 |
| 1. Estudio estructural de las bacterias de la Antártida adaptadas al frío y de sus EPS | 103 |
| 2. Caracterización de vesículas de membrana de bacterias antárticas adaptadas al frío | 107 |
| 3. Estudio de la actividad emulsionante en cultivos de bacterias de la Antártida adaptadas al frío | 117 |
| 4. Estudio de la capacidad emulsionante de distintas fracciones del cultivo de bacterias de la Antártida adaptadas al frío | 119 |
| 5. Estudio del crecimiento y actividad emulsionante de <i>Shewanella vesiculosa</i> M7^T | 120 |
| 6. Caracterización química del material extracelular de <i>Shewanella vesiculosa</i> M7^T | 121 |
| VI. CONCLUSIONES | 131 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 135 |
| VIII. PUBLICACIONES | 159 |

I.INTRODUCCIÓN

I.INTRODUCCIÓN

1. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

1.1 Aspectos generales

A pesar de que las primeras bacterias observadas por Van Leewenhoek en el año 1676 procedían de un biofilm de su placa dental, no fue hasta el año 1978 cuando se aceptó la idea de que el 99% de las células bacterianas en los distintos ecosistemas del planeta viven asociadas, ya sean formando biofilms o agregados microbianos (forma sésil) y sólo el 1% lo hace en forma unicelular o libre (forma planctónica) (Chesterton y col., 1978). En esta forma de vida comunitaria, el crecimiento bacteriano va acompañado siempre de la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), también llamadas matrices extracelulares (Sanclement y col., 2005; Ramadan, 2006).

Inicialmente se pensó que la mayoría de polímeros extracelulares producidos por bacterias eran de naturaleza polisacáridica y Sutherland, (1972), empleó la abreviatura de EPS para referirse a los polímeros de carbohidratos producidos por bacterias marinas con alto peso molecular. Sin embargo, esta definición fue ampliada por Wingender y colaboradores, (1999), para incluir en el término de EPS no sólo los polisacáridos sino otras clases de macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que también forman parte de las matrices extracelulares de los biofilms o agregados microbianos. Otros autores como Nielsen y Jahn, (1999), propusieron que todos los polímeros fuera de la pared celular que no estuvieran directamente unidos a la membrana externa o la capa de mureína, fueran incluidos en el término EPS y más reciente, Sheng y colaboradores, (2010), señalaron que los EPS abarcan no sólo aquellas secreciones microbianas de alto peso molecular sino también los productos de lisis celular e hidrólisis de macromoléculas. Así el término EPS puede en algunas ocasiones ser confuso, pero en este trabajo cuando hablemos de EPS nos referiremos al término más amplio que engloba a un conjunto de sustancias poliméricas extracelulares.

La presencia de bacterias productoras de EPS pertenecientes a distintos grupos taxonómicos, es abundante en la mayoría de ecosistemas. Este hecho conjuntamente con la constatación de que

la producción de estas sustancias exopoliméricas requiere de un elevado gasto de energía de alrededor del 70%, lo que representa una inversión significativa de carbono para la célula, llevan a pensar que la producción de EPS debe ser beneficiosa para las bacterias (Harder y Dijkhuizen, 1983; Wolfaardt y col., 1999). Diversos estudios demuestran que la producción de EPS aumenta el crecimiento y supervivencia de los microorganismos y beneficia a la comunidad en la que se encuentran (Wolfaardt y col., 1999), siendo por tanto descritos como una estrategia para el crecimiento (Costerton, 1999; Wingender y col., 1999).

La estructura del EPS se describe generalmente por un modelo de dos capas (Figura 1) (Nielsen y Jahn, 1999). La capa interior de EPS tiene cierta forma (EPS-MA) y está fuertemente unida de manera estable a la superficie de la célula. Mientras, la capa externa está conformada por EPS débilmente unido (EPS-PA) y es una capa suelta y dispersa (Figura 1).

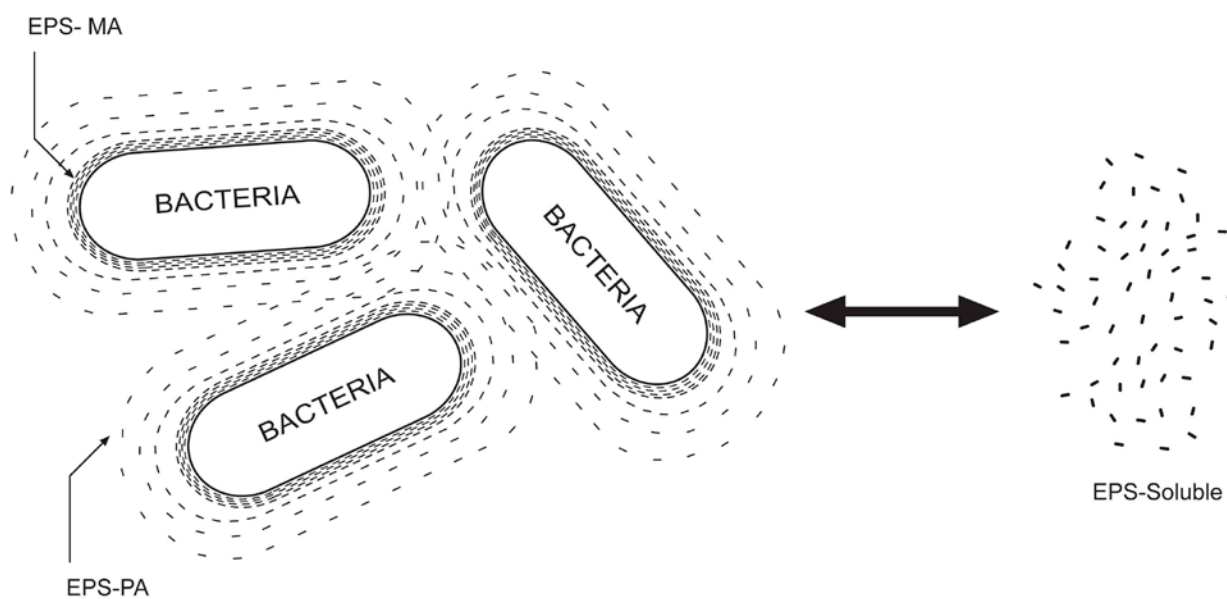


Figura 1. Esquema modificado a partir de Nielsen y Jahn, (1999), de la estructura del EPS. MA (muy adherido), PA (poco adherido).

Con frecuencia los EPS unidos estrechamente alrededor de las células se han denominado también EPS capsulares, mientras que los adheridos débilmente a las células o disueltos en el medio se han denominado EPS de tipo limo (Decho y López, 1993; Nielsen y Jahn, 1999; Lapidou y Rittmann, 2002). Generalmente, ambos tipos de EPS pueden separarse de las células mediante centrifugación y los que quedan remanentes en el sobrenadante son los EPS

solubles, mientras aquellos que forman pellets son los EPS unidos a las células (Sheng y col., 2010).

1.2 Funciones biológicas

Hemos mencionado que los EPS son una parte esencial de las comunidades microbianas integradas en biofilms o agregados y les confiere muchas de las características en cuanto a porosidad, densidad de carga, contenido de agua, hidrofobicidad, entre otras. Con toda probabilidad los EPS no cumplen una única función biológica y por tanto pasamos a mencionar algunas de las que están claramente aceptadas.

En primer lugar, los EPS son importantes mediadores en la adhesión de bacterias a superficies. Es conocido que la formación de biofilms es un proceso dinámico, que involucra la adhesión de las células a superficies inertes o biológicas con la posterior colonización de las mismas y uno de los requisitos imprescindibles para que se lleve a cabo este proceso es la producción de EPS por parte de las bacterias colonizadoras (Wolfaardt y col., 1999). Por otra parte, los exopolímeros tanto capsulares como de tipo limo, conforman una matriz alrededor de las células, que acelera la unión entre células cercanas y por tanto la formación de agregados (Liu y col., 2004). Así pues, los EPS no sólo están involucrados en los procesos de adhesión, sino también en el mantenimiento de la integridad estructural del biofilm y por lo tanto, en la estabilidad total de la comunidad microbiana que los conforma (Wolfaardt y col., 1995).

En este proceso de adhesión no sólo interviene la naturaleza del EPS sino otros factores como la propia superficie. Se ha descrito que las células se adhieren mejor a superficies hidrofóbicas, no polarizadas, lo que sugiere que las propiedades fisicoquímicas de la superficie ejercen una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión. Otros factores que también pueden influir son las variaciones en la velocidad de flujo en medio líquido, la temperatura y la concentración de nutrientes así como de diversos cationes.

Por otra parte, los EPS facilitan la interacción entre las bacterias y el medio que las rodea (Logan y Hunt, 1987; Decho, 1990). El EPS interactúa con otras macromoléculas y células, así como con iones y solutos de bajo peso molecular que pueden penetrar en la matriz y

proporcionar una variedad de microambientes dentro del agregado microbiano o del biofilm (Sutherland, 2001).

También se atribuye a los EPS la función de concentrar nutrientes, tanto material orgánico como inorgánico disuelto. En ambientes naturales acuáticos, los nutrientes requeridos para el crecimiento óptimo de microorganismos raramente están presentes en concentraciones suficientes, por lo que los microorganismos se fijan a superficies u otras células y forman agregados que permiten atrapar nutrientes (Logan y Hunt, 1987). La alta hidratación de la matriz exopolimérica actúa como una esponja que atrapa y concentra los nutrientes del medio líquido (Decho, 1990). Además, diversos estudios plantean que los EPS podrían ser utilizados como reservorios y servir como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez nutricional (Sutherland, 2001; Zhang y Bishop, 2003). Otros autores revelan el potencial rol que tienen los EPS en la adsorción de metales pesados en células bacterianas (Toner y col., 2005; Guine y col., 2006; Hu y col., 2007), ya que pueden actuar como ligandos para diversos cationes entre los que destaca el Fe^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} . De esta manera se garantiza la concentración de estos iones metálicos en el medio que rodea a la célula, proporcionándole una ventaja evolutiva.

Otra función importante de los EPS es la de protección frente a diversos factores. A través de complejas interacciones, el EPS y las células forman una vasta estructura parecida a una red que actúa como una barrera alrededor de las células que la protege contra la desecación (Wingender y col., 1999). Concretamente los EPS tienen la capacidad de retener agua creando un reservorio de esta sustancia en el microambiente que rodea a la bacteria (Roberson y Firestone, 1992). También esta capa altamente hidratada actúa como una barrera física protectora contra repentinos cambios osmóticos en el medio adyacente (Dudman, 1977). Además, los EPS también ejercen protección contra daños procedentes de sustancias tóxicas, principalmente frente a la acción de antibióticos, enzimas hidrolíticas o depredadores como protozoos (Caron, 1987; Decho y López, 1993; Sutherland, 2001). Específicamente, la producción de EPS en forma capsular está presente en bacterias patógenas y permite a las células evadir la fagocitosis (Kumar y col., 2007).

De esta forma, la producción de EPS por parte de microorganismos permite aumentar la habilidad de competir y sobrevivir a cambios en las condiciones ambientales por alteraciones tanto físicas como biogeoquímicas en el microambiente que rodea a las células (Costerton, 1974).

1.3 Composición química y producción de los EPS

Los EPS sintetizados por las células microbianas presentan gran diversidad en cuanto a su composición y por lo tanto en sus propiedades físicas, químicas y potenciales aplicaciones, asimismo, el rendimiento de su producción es altamente variable.

Generalmente la composición de los EPS es heterogénea (Wingender y col., 1999). Esta variación en la composición puede atribuirse a diferentes factores, entre los que se encuentran el tipo de cultivo, la fase de crecimiento, el método de extracción y las herramientas analíticas empleadas (Nielsen y Jahn, 1999).

Dentro de las sustancias poliméricas extracelulares, las de naturaleza polisacáridica han sido las más estudiadas, debido a que son uno de los componentes de los EPS más abundantes, representando entre el 40-95% del material polimérico extracelular (Flemming y Wingender, 2001). La mayoría de los EPS son heteropolisacáridos que contienen de 3 a 4 monosacáridos diferentes, asociados en grupos de 10 o menos, para formar unidades repetidas (Decho, 1990). Muchos polímeros son mayoritariamente lineales y de longitud variable con un promedio de peso molecular entre $1-3 \times 10^5$ Da (Sutherland, 1977). Entre los compuestos más frecuentes podemos encontrar pentosas (D-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa), aminoazúcares (D-glucosamina, D-galactosamina) y ácidos urónicos (D-galacturónico y D-glucurónico). Algunos de los azúcares pueden presentar componentes no glucídicos como radicales acetilo, amonio, sulfato y fosfato, entre otros (Mancuso Nichols y col., 2005). Además, en algunas matrices pueden estar presentes lípidos y ácidos nucleicos, así como algunos compuestos inorgánicos (Frolund y col., 1996; Dignac y col., 1998; D'Abzac y col., 2010 a,b).

Otra característica en la composición de los EPS es que pueden ser altamente polianiónicos (Kennedy y Sutherland, 1987) y esta propiedad se atribuye al alto contenido de ácidos urónicos que presentan muchos de ellos (Corpe, 1970; Kaplan y col., 1987). La presencia de estos compuestos puede representar entre el 20 y el 50% de la composición del EPS. También abundan los grupos con cargas tales como carboxilos, fosfóricos, sulfidrilos, fenólicos e hidroxilos, los cuales confieren una carga neta negativa y propiedades ácidas a los EPS. Estos grupos funcionales representan potenciales sitios de unión para secuestrar iones metálicos (Liu y Fang, 2002).

Además hay presencia de grupos apolares como grupos aromáticos y alifáticos en proteínas y regiones hidrofóbicas en carbohidratos, que posibilitan la adsorción de contaminantes orgánicos (Spath y col., 1998; Flemming y Leis, 2002). La presencia de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en los EPS indica que pueden tener naturaleza anfipática y esta propiedad les permite interactuar con sustratos oleosos y en algunos casos aumentar su disolución por los procesos de emulsificación o bajando la tensión superficial.

Para llevar a cabo la caracterización química primaria de los EPS, se pueden emplear los análisis convencionales químicos colorimétricos, los cuales permiten cuantificar los componentes mayoritarios de los EPS como azúcares, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Raunkjaer y col., 1994). Generalmente el contenido de carbohidratos se realiza mediante el método de antrona (Morris, 1948) o de fenol sulfúrico (Dubois y col., 1956). Una comparación entre ambos métodos brinda similares resultados, aunque el coeficiente de variación para el método de antrona es menor que para fenol sulfúrico.

El contenido de proteína puede determinarse por los métodos de Lowry (Lowry y col., 1951), Bradford (Bradford, 1976) o por el contenido de nitrógeno total (Bremner, 1965). Este procedimiento es más exacto pero complejo, por lo que el método de Lowry es empleado con mayor frecuencia y tiene una mayor recuperación que el Bradford para el análisis de proteínas en la caracterización de EPS.

En cuanto a la extracción de lípidos, han sido aplicados diferentes tratamientos tanto químicos como físicos (Smedes y Askland, 1999). El método más empleado fue publicado por Folch y

colaboradores, (1957) y está basado en una mezcla de cloroformo y metanol. Desde que este método fue descrito se han realizado numerosas modificaciones con el fin de aumentar la eficiencia del procedimiento, disminuyendo el tiempo de extracción y los volúmenes de solventes (Pérez-Palacios y col., 2008).

Para determinar el contenido de ácidos nucleicos, el método más usado es el de difenilamina (Liu y Fang, 2002), aunque se han planteado algunos más complejos como el método fluorescente DAPI (Frolund y col., 1996) y el método de absorbancia UV, descrito por Sheng y colaboradores, (2005), teniendo este como desventaja la interferencia que pueden realizar las proteínas.

Por otra parte, la elucidación detallada de los componentes de los EPS y de su conformación estructural resulta muy compleja y requiere la combinación de técnicas analíticas más avanzadas como técnicas cromatográficas (HPLC, cromatografía gaseosa, cromatografía de exclusión por tamaños) y técnicas de espectrometría como espectrometría de masas o espectrometría infrarroja (Dignac y col., 1998). También las técnicas de proteómica permiten elucidar la naturaleza de proteínas incorporadas a las matrices de EPS. Dada la alta sensibilidad y selectividad de las mismas, estas técnicas generan una gran cantidad de información no sólo estructural y funcional de los EPS sino que también ayudan a definir el papel de los EPS en los ecosistemas (Manca y col., 1996; Omoike y Chorover, 2004; Sheng y Yu, 2006).

Como ya hemos comentado, el origen de los EPS es complejo y también el rendimiento de su producción, lo cual puede dificultar en muchos casos su potencial aplicación industrial. La identificación de algunos de los factores que influyen en la producción, pudiera ser muy útil para manipular la composición de los mismos y mejorar su rendimiento de producción. Se han estudiado parámetros abióticos tales como el pH, la temperatura, la agitación de los cultivos, la salinidad del medio y diferentes condiciones nutricionales, que pueden influir en la producción y características fisicoquímicas de los EPS (Arias y col., 2003).

Algunos autores como Christensen y colaboradores, (1985), plantean que la composición de los EPS también puede variar de acuerdo a la fase de crecimiento de la bacteria. Aunque las condiciones de cultivo generalmente no afectan el tipo de monosacáridos en un EPS, sí que

pueden modificar las propiedades funcionales de los polisacáridos así como el peso molecular, la conformación y las proporciones de los monosacáridos (Arias y col., 2003). Muchas bacterias liberan amplias cantidades de EPS durante la fase estacionaria de crecimiento (Decho, 1990; Manca y col., 1996). Sin embargo, en otros casos se ha descrito la máxima producción durante la fase exponencial de crecimiento, como en el estudio realizado con el EPS de la cepa antártica *Pseudoalteromonas antártica* NF₃^T (Bozal y col., 1994).

Otro de los factores importantes para el estudio de los EPS es su recuperación a partir de los biofilms, agregados o medios de cultivo. No existe un método universal de extracción, por lo que el método seleccionado debe ser optimizado para cada caso, teniendo en consideración las características de las muestras. Muchas extracciones realizadas se basan en la combinación de métodos, así como en la repetición de operaciones para obtener una alta eficiencia en la extracción.

Se considera una extracción efectiva de EPS aquella que el método cause mínimos eventos de lisis celular y no interfiera en la estructura del mismo (Frolund y col., 1996). Sin embargo, es difícil evaluar la amplitud de la lisis celular durante la extracción. Algunos estudios se han basado en el contenido de proteínas y ácido nucleico, como un indicador de la lisis celular (Brown y Lester, 1980), ya que es conocido que en la matriz del EPS usualmente contiene una gran cantidad de proteínas y una pequeña de ácidos nucleicos, por lo que un alto nivel de este compuesto después de la extracción de la muestra sugiere ruptura de las células (Frolund y col., 1996).

Dentro de las operaciones que se realizan para llevar a cabo la extracción destacan los métodos de centrifugación, los cuales dependen del tipo de EPS a obtener. Para el caso de los EPS tipo limo, la velocidad y el tiempo de centrifugación dependen de la naturaleza y viscosidad del polisacárido. A escala de laboratorio, la ultracentrifugación puede ser empleada para separar tanto células como restos del medio de cultivo. Mientras que para los EPS capsulares, se emplean métodos más drásticos, al estar asociados fuertemente a las células. Entre los tratamientos destacan el empleo de compuestos alcalinos como NaOH antes de la centrifugación, así como también precipitación con alcohol (Morin, 1998).

Se han descrito otros métodos que incluyen calentar el cultivo de células a 60 °C en solución salina o en una mezcla de fenol-agua a 65 °C o someter a ultrasonido la suspensión celular. También de uso frecuente es el empleo de la autoclave para liberar la cápsula polisacáridica de la célula, pero este método puede causar ruptura celular.

Por otra parte, los EPS son generalmente recuperados del medio de cultivo mediante precipitación con solventes polares miscibles en agua, como el alcohol o la acetona. Las proporciones de estos compuestos son variables, pueden emplearse de 2 a 3 volúmenes del medio de cultivo, aunque con frecuencia se usa el doble del volumen del cultivo. Durante esta operación con solventes, pueden también precipitar otros compuestos tales como proteínas y sales del medio conjuntamente con el EPS, por lo que es necesario realizar a la muestra tratamientos de desproteínización y diálisis. Estos tratamientos reducen el contenido de proteínas hasta un 40% (Morin, 1998). Finalmente, el sobrenadante concentrado puede ser ultrafiltrado (8-10 kDa) y secado mediante liofilización, al vacío o algún gas inerte.

1.4 Visualización de los EPS

La presencia de EPS, tanto en cultivos puros, sedimentos activos, granulados como en biofilms, ha sido confirmada mediante el empleo de varias técnicas de microscopía, tales como microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (MET), microscopía confocal, así como microscopía de fuerzas atómicas (AFM) (van der Aa y Dufrene, 2002; Jericho y col., 2004; Li y Logan, 2004).

Los EPS son redes altamente hidratadas constituidas por polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos y complejos proteicos. Estos materiales tan hidratados son susceptibles de quedar colapsados durante los procesos de deshidratación asociados a las técnicas convencionales de microscopía electrónica (Nevot y col., 2006a). La fijación química con glutaraldehído y la sustitución del agua presente en la muestra por etanol, junto con el secado y observación a temperatura ambiente generan artefactos, de modo que al observar las muestras tanto en MET como en SEM, los EPS en gran parte se pierden o se observan como un material colapsado.

La técnica de criofijación por alta presión (High Pressure Freezing, HPF), seguida de criosustitución (Freeze-substitution, FS), ha mejorado notablemente la observación de los EPS en un estado más próximo a su estado natural, aportando mayores detalles sobre la ultraestructura de estos materiales altamente hidratados situados alrededor de las células. Para ello la muestra se fija mediante un proceso de congelación a alta presión (2000 atm), con una disminución de la temperatura de 8000 °C/segundo, lo que provoca una inmovilización (fijación) de todos los componentes y a su vez el agua presente no cristaliza sino que pasa a un estado amorfo o vítreo, por lo que la estructura no se altera. Posteriormente se procede a la criosustitución, en la que el hielo amorfo se sustituye por un disolvente orgánico a temperatura baja (-90 °C) para evitar la recristalización del agua (Dubochet y col., 1988; Harris, 1997; Korenevsky y col., 2002).

Más recientemente, la criomicroscopía electrónica (Crio-ME) ha permitido observar tanto bacterias como los EPS que producen en su estado nativo. Para ello la muestra se criofija sobre rejillas sumergiéndola rápidamente en etano o propano líquido (-172 °C o -188 °C) mediante la técnica de “plunge-freezing”. Seguidamente se traslada al criomicroscopio y se observa en condiciones criogénicas (-170 a -180 °C) y a dosis muy bajas de electrones sin ningún agente de contraste (Beveridge, 2006).

Todas estas técnicas han aportado una nueva visión de las matrices extracelulares bacterianas, que han pasado de ser prácticamente inexistentes o con aspecto filamentosos o grumosos, a visualizarse como materiales mucosos altamente hidratados y como redes complejas en las que se pueden observar la mezcla de polisacáridos con estructuras particuladas como pilis, flagelos, fagos y vesículas de membrana externa (VME), siendo estas últimas consideradas como un componente definitivo de la matriz extracelular de muchas bacterias (Schooling y Beveridge, 2006). Asimismo, la matriz que forman los EPS interactúa con una gran variedad de macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Wingender y col., 1999; Branda y col., 2005).

1.5 Aplicaciones biotecnológicas

Las propiedades que exhiben los EPS y su variada composición química han hecho que desde el inicio de sus estudios se haya planteado y valorado su posible aplicación en distintos campos industriales (Weiner, 1997). Para ello, no sólo es importante la gran diversidad estructural y funcional que presentan (Banat y col., 2000), sino también el hecho de que los EPS derivados de fuentes naturales tienen bajos niveles de toxicidad, una alta biodegradabilidad y actividad funcional a bajas concentraciones, lo que es conocido como un alto valor de “rendimiento” (Sanderson, 1990).

Uno de los primeros campos de aplicación de los EPS microbianos fue basado en las propiedades gelificantes y estabilizadoras que poseen, las cuales permiten aplicaciones en distintas industrias como la alimentaria y farmacéutica, para conferir mayor viscosidad y/o producir mejoras en la textura de ciertos productos (Navon-Venezia y col., 1995; Shepherd y col., 1995; Desai y Banat, 1997; Rosenberg y Ron, 1999; Gutiérrez y col., 2007a, 2007b, 2009).

Existen numerosos EPS microbianos con amplias aplicaciones en la industria, entre los que destacan el xantano o goma xantana, la cual fue descubierta a finales de los años cincuenta, siendo el primer biopolímero producido industrialmente. Obtenido a partir de la bacteria *Xanthomonas campestris*, presenta propiedades reológicas que le permite ser utilizado mayoritariamente como agente de control en sistemas acuosos y estabilizador para emulsiones y suspensiones. Entre las aplicaciones industriales resaltan como agente espesante, emulsionante y estabilizante en la industria alimentaria y como aditivo en la industria farmacéutica. También en la industria petrolífera, para la recuperación secundaria y terciaria del petróleo; en la agricultura en la mejora de la capacidad de fluidez en las formulaciones de fungicidas, herbicidas e insecticidas, así como en la industria cosmética y en materiales de la construcción, cerámicas y tintas.

Por otra parte, el gelano es un exopolisacárido complejo, sintetizado por la bacteria *Sphingomonas paucimobilis* y se comercializa de dos formas: la nativa, la cual origina geles suaves, elásticos y sin brillo y la forma desacetilada, que genera geles firmes, duros, no elásticos y con alto brillo. La utilización conjunta de las dos formas, proporciona una amplia

variedad de texturas. Todas estas propiedades posibilitan su acción como espesante, estabilizante, emulsionante y gelificante en la industria alimentaria para la preparación de gelatinas, jaleas, dulces, yogures, así como potencial aplicación en geles de higiene personal y en la industria farmacéutica.

El agar se extrae de varios tipos de algas rojas, entre ellas las del género *Gellidium*. Es capaz de formar geles firmes y rígidos, reversibles al calentarlos, empleando concentraciones del 1-2%, por lo que es ampliamente usado no sólo en repostería sino también en la fabricación de conservas vegetales, en derivados cárnicos, helados, así como para formar la cobertura de conservas y semiconservas de pescado y aditivo en sopas, salsas y mazapanes, además de su uso en biotecnología para solidificar medios de cultivos.

Otros ejemplos abarcan un nuevo bioemulsionante obtenido a partir de *Candida utilis* con uso potencial en la industria como aditivo alimentario, particularmente se emplea como aliño para ensaladas (Shepherd y col., 1995), o el caso del EPS de la cepa *Hahella chejuensis* gen. nov., sp., nov., el cual ha sido estudiado por su gran potencial como agente emulsionante (Lee y col., 2001) y el emulsan, producido a partir de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Rosenberg y col., 1979). También el EPS de *Alteromonas* sp. cepa 1545, presenta interesantes propiedades reológicas y puede ser usado como agente espesante (Talmont y col., 1991), así como el gelrite, obtenido a partir de *Pseudomonas* spp., el cual tiene buena estabilidad térmica e incluso superior al agar (Lin y Casida, 1984). Además el EPS producido por *Cyanothece* sp. ATCC 51142, con capacidad de formar geles es empleado en la industria alimenticia (Shah y col., 2000) y el EPS secretado por *A. macleodii* subsp. *fijiensis*, se ha aplicado en la industria cosmética (Dubreucq y col., 1996).

Destacan también las propiedades surfactantes de los EPS, que pueden ayudar a formar y estabilizar emulsiones (Rosenberg y Ron, 1997). En este aspecto son especialmente interesantes los EPS con propiedades anfipáticas, porque pueden realizar interfases entre superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, como en la mezcla de aceite y agua. (Rosenberg, 1993; Shepherd y col., 1995). En este campo son numerosos los estudios para conseguir una recuperación mejorada del petróleo aplicando microorganismos que produzcan compuestos bioactivos (Sen, 2008).

También se han empleado en trabajos de biorremediación o biodegradación de compuestos tóxicos que incluyen hidrocarburos, hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), compuestos heterocíclicos (como quinolina), sustancias farmacéuticas y metales (Lovley, 2003; Koukkou, 2011).

Los EPS son una pieza clave en los agregados microbianos que se forman en los reactores para el tratamiento de aguas residuales, permitiendo disminuir la contaminación ambiental y el riesgo que esto supone tanto para la salud humana, como animal (Sheng y col., 2010).

Finalmente, se han estudiado aplicaciones médicas para los EPS (Laurienzo, 2010), algunos de ellos pueden presentar actividad antitumoral, antiviral e inmunoestimulante. Por ejemplo: el marinactan, un EPS producido a partir de *Flavobacterium uliginosum*, logró inhibir entre el 70-90% el crecimiento del sarcoma 180 en ratones (Umezawa y col., 1983). Asimismo, Collic-Jouault y colaboradores, (2001), observaron propiedades anticoagulantes similares a la heparina para el EPS obtenido a partir de *Alteromonas infernus*, procedente de conductos hidrotermales de mares profundos. También, el EPS HE800 producido por *Vibrio diabolicus*, es conocido por su acción en los tratamientos óseos, sin llegar a inducir reacciones inflamatorias (Zanchetta y col., 2003).

Para la aplicación de los EPS en la industria y lograr la funcionalidad óptima, se requieren en muchas ocasiones concentraciones relativamente altas de estos polímeros llegando incluso hasta un 20% (p/v) (Dickinson y col., 1988; Randall y col., 1988). Este hecho, junto con el coste elevado de su producción hace que en muchas ocasiones, a pesar de sus interesantes propiedades, no sean competitivos en el mercado, de modo que hay numerosos estudios dirigidos a mejorar los rendimientos y costes de producción de los EPS.

1.6 EPS en ecosistemas marinos de la Antártida

Cerca del 80% de la biosfera terrestre se encuentra permanentemente a bajas temperaturas (Gounot, 1999) y estos ecosistemas están frecuentemente ocupados por una diversidad de microorganismos adaptados a crecer en condiciones extremas, todo lo cual los hace especialmente atractivos para estudios biotecnológicos. Entre las adaptaciones más frecuentes a

estos ambientes extremos, se encuentra la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales proporcionan ventajas para la supervivencia de las células (Costerton, 1999) y su rol fisiológico depende del hábitat natural de cada microorganismo (Nevot y col., 2006a).

La mayoría de los EPS encontrados en hielo marino polar son producidos por algas, mientras que existen pocos estudios dirigidos hacia el potencial rol de los EPS producidos por bacterias antárticas. El estudio de los EPS en microorganismos de origen antártico es bastante reciente y diversos estudios ecológicos plantean que la producción de estos EPS no sólo es abundante en los hábitats marinos antárticos (Krembs y col., 2002; Meiners y col., 2003; Mancuso Nichols y col., 2004; Riedel y col., 2006; Pavlova y col., 2009), sino que pueden llegar a alcanzar entre 5 y 50 veces más su peso molecular con respecto al promedio de otros EPS marinos aislados, los cuales oscilan entre $1-3 \times 10^5$ Da (Decho, 1990). La estructura y propiedades fisicoquímicas de los EPS, están condicionadas por la longitud de la cadena polimérica, a medida que esta aumenta, se incrementa la oportunidad de formar cadenas complejas e incrementar las asociaciones intramoleculares y esto contribuye a la estructura terciaria y a las propiedades físicas del polímero (Sutherland, 1994).

En los últimos años se han descrito diversos EPS producidos a partir de bacterias marinas de la Antártida, algunas de los cuales se relacionan en la Tabla 1.

Tabla 1: Caracterización de EPS obtenidos a partir de bacterias marinas de la Antártida y de conductos hidrotermales en mares profundos (Mancuso Nichols y col., 2005)

| Microorganismos | Fuente ambiental | Descripción del EPS | Característica distintiva | Rol ecológico sugerido | Aplicaciones biotecnológicas | Referencia |
|--|--|---|--|---|---|---|
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. cepa CAM025 | Partículas filtradas de hielo marino, Antártida | Heteropolisacárido sulfatado, con alto contenido en ácidos urónicos con grupos acetilos | *Alto peso molecular ($5,7 \times 10^6$ Da) | Crioprotección en canales de salmuera en hielo marino | - | Mancuso Nichols y col., (2004) |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. cepa CAM036 | Partículas del Océano meridional | Heteropolisacárido sulfatado, con alto contenido en ácidos urónicos con grupos acetilos y succinilos | *Alto peso molecular (1,7 MDa) | Captar metales trazas como el hierro en sitios donde esté limitante | - | Mancuso Nichols y col., (2004) |
| <i>Alteromonas macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> | Agua de mar, conductos hidrotermales | Heteropolisacárido sulfatado, con alto contenido en ácidos urónicos con piruvato | Alta absorción de plomo, cadmio y zinc | - | Agente espesante en la industria alimenticia. Biodetoxificación y tratamiento de aguas residuales y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. | Rougeaux y col., (1996); Loaec y col., (1997); Collice-Jouault y col., (2001) |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. cepa GY 768, similar a <i>P. carrageenovora</i> | Tejidos invertebrados, conductos hidrotermales | Heteropolisacárido sulfatado (13%), con alto contenido en ácidos urónicos, con piruvato y acetato | Poliectrolito | - | Biodetoxificación y tratamiento de aguas residuales | Rougeaux y col., (1996); Zanchetta y Guezzenec, (2001) |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. cepa GY 786, similar a <i>P. undina</i> | Tejidos invertebrados, conducto hidrotermales | Heteropolisacárido sulfatado (6,5%), con alto contenido en ácidos urónicos, con piruvato y acetato | Poliectrolito | - | Biodetoxificación y tratamiento de aguas residuales | Rougeaux y col., (1996) |
| <i>Vibrio</i> sp. | Tejidos invertebrados, conducto hidrotermales | Heteropolisacárido con alto contenido de ácidos urónicos y aminoazúcares, trazas de azúcares neutro (EPS 800) | Similar a la heparina | - | Actividad anticoagulante y anti HIV | Rougeaux y col., (1996) |
| <i>Alteromonas infernus</i> cepa GY 685 | Agua de mar de <i>Riffia pachyptila</i> , conducto hidrotermales | EPS-1 asociado con células, rico en ácidos urónicos y proteínas. EPS-2 heteropolisacárido con ácidos urónicos | - | - | Biodetoxificación y tratamiento de aguas residuales | Raguénès y col., (1997) |

* peso molecular promedio de EPS de bacterias marinas: 0,1-0,3 x 10⁶ Da (Decho y col., 1990)

Diversos autores consideran la producción de EPS como una adaptación a las bajas temperaturas y alta salinidad (Hargens y Shabica, 1973; Murase, 1992; Knight y DeVries, 1994; Kirst y Wiencke, 1995; Kawahara y col., 1996), características que están presentes en ambientes polares donde se produce continuamente formación de hielo.

Una función importante de estos EPS sería la osmoprotección. Durante el proceso de formación de hielo, los solutos quedan excluidos y el agua que permanece alrededor de las células puede aumentar la osmolaridad. Este fenómeno está bien descrito en la formación de hielo marino, que origina canales de salmuera en los cuales los niveles de salinidad son muy superiores a los del agua de mar. Bajo estas condiciones, por debajo de la temperatura óptima de crecimiento, los microorganismos están estimulados a producir EPS (Mancuso Nichols y col., 2004; Nevot y col., 2008), con el fin no sólo de proteger a las células de las elevadas concentraciones salinas, sino también frente a la formación de cristales de hielo. Algunos componentes de los EPS incluyen proteínas y también ciertos azúcares que impiden la recristalización del hielo evitando así su propagación alrededor de la célula (Muryoi y col., 2004), lo cual puede alterar la integridad de la membrana celular.

Con el fin de contrarrestar estas condiciones extremas, se han descrito una variedad de compuestos capaces de disminuir la temperatura de nucleación del agua sin causar efectos coligativos, lo que puede producir alteraciones significativas del hábitat que rodea a los microorganismos (Krembs y col., 2000). En este contexto, se han realizados estudios que sugieren que una disposición mayor de EPS alrededor de las células puede tener efectos similares a los polímeros alimenticios (Krembs y col., 2002). Estas matrices, como es el caso de la goma xantana, exhiben un estado amorfo durante la formación del hielo (Roos, 1995) y logran reducir la temperatura de congelación del agua dulce (Yoshida y col., 1990; Murase, 1992), evitando así la formación de cristales de hielo y por tanto el consiguiente daño a la célula.

Igualmente se han observado cambios en la morfología del cristal de hielo debido a la interacción entre moléculas afines al hielo, específicamente proteínas (Raymond y Fritsen, 2000). Diversos autores plantean que algunas bacterias pueden producir proteínas que interactúan a nivel molecular con el cristal de hielo (Wilson y col., 2006; Raymond y col.,

2008) y recientemente se aisló una proteína de unión al hielo (IBP) a partir de la bacteria de origen antártico del género *Colwellia* (Raymond y col., 2007). Los autores sugieren que el EPS producido por esta bacteria marina adaptada al frío, incluye una fracción proteica interactiva con el cristal de hielo que podría contribuir a la retención de células en el hielo marino. Todo lo cual reafirma el papel crioprotector de los EPS, los cuales ayudan a la supervivencia de los organismos en condiciones extremas (Wingender y col., 1999; Krembs y Deming, 2008).

Estudios recientes sugieren la influencia de los EPS sobre la microestructura del poro formado dentro del hielo marino (Krembs y col., 2011). Hasta el momento, se relacionaban los EPS con las propiedades hidráulicas y mecánicas del poro (Battin y Sengschmitt, 1999) y se le atribuía un papel en la cohesión de sedimentos acuáticos (de Brouwer, 2005). Sin embargo, no era conocido el potencial de los EPS de alterar las propiedades del hielo marino cambiando la permeabilidad del mismo. La reducción de la permeabilidad del hielo marino por los EPS puede influir también en el rol que tiene el hielo marino como “proveedor” de carbono inorgánico de la atmósfera al océano (Rysgaard y col., 2007). Asimismo, la presencia de geles de EPS en el hielo proporciona una barrera semipermeable entre los microorganismos y los microambientes hipersalinos que se forman evitando la difusión de sales. La acumulación de estos exopolímeros restringe el flujo a través del hielo de gases, de fluidos y puede alterar la difusión de contaminantes orgánicos (Krembs y Deming, 2008).

En ambientes marinos, los EPS son esenciales en la producción de agregados microbianos o biofilms (Harris y Mitchell, 1973; Biddanda, 1985; Alldredge y Silver, 1988; Sutherland, 1999, 2001). Estos se forman mediante la adhesión a superficies y a otros microorganismos (Fletcher y Floodgate, 1973; Paerl, 1975; Marshall, 1985; Vincent y col., 1994; Holmstrom y Kjelleberg, 1999), los cuales están embebidos dentro de la matriz exopolimérica producida principalmente por bacterias y microalgas. Los estudios de Krembs y colaboradores, (2002), realizados con muestras de hielo del Ártico correlacionan la producción de grandes cantidades de EPS con la abundante población microbiana, principalmente diatomeas y bacterias, durante los períodos de condiciones ambientales más duros del ecosistema antártico como es el invierno. La formación de estos agregados proporciona una de las mayores fuentes de alimentos para invertebrados (Madsen, 1974; Rounik y Winterbourn, 1983), además de permitir atrapar nutrientes (Decho y Herndl, 1995) y compuestos orgánicos, que al ser hidrolizados en unidades monoméricas,

pueden ser utilizados por las diferentes especies que forman la comunidad en el biofilm (Decho y López, 1993).

Por otra parte, los EPS juegan un rol en los ciclos biogeoquímicos de los elementos (Decho 1990; Bhaskar y Bhosle, 2005). Diferentes estudios de las comunidades microbianas tanto en mar Ártico (Krembs y Engel, 2001) como Antártico (Sullivan y Palmisano, 1984), sugieren que la producción de EPS por fitoplancton y bacterias son suficientemente altas para contribuir significativamente en los niveles de carbono orgánico tanto en el hielo marino como en la interfase agua-hielo. Lo que sugiere que los EPS pueden significar un importante sustrato como fuente de carbono en los ecosistemas marinos fríos, ya que contribuyen entre el 14-32% del valor integrado de partículas de carbono (Meiners y col., 2003, 2004).

Además, los EPS producidos por algunas bacterias aisladas de la Antártida pueden actuar como ligandos frente a iones metálicos. Esto se debe al contenido de ácidos urónicos y grupos sulfatos que conforman su composición química, los cuales le confieren carga negativa y representan sitios de unión para la captación de cationes presentes como elementos trazas, lo que permite aumentar la producción primaria de comunidades microbianas usualmente limitadas por baja disponibilidad de estos metales como el ión hierro (Fe^{+3}) (Mancuso Nichols y col., 2005).

Un aspecto muy interesante ha sido el estudio ultraestructural del EPS producido por la bacteria antártica *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T (Nevot y col., 2006a, 2006b). La matriz extracelular de esta cepa presenta una estructura compleja, integrada por material capsular adherido a la superficie bacteriana y por material extracelular liberado al medio y formado esencialmente por vesículas de membrana externa (VME) rodeadas de material polimérico dando lugar a una extensa red intercelular. Este hecho tan significativo ha llevado a evaluar el rol de las VME en otras bacterias antárticas y por este motivo se explican a continuación las principales características de estas estructuras.

2. Vesículas de membrana externa (VME)

Las bacterias gramnegativas, al igual que otros tipos de células, interactúan con el medio ambiente y esta relación con su entorno se realiza en muchas ocasiones secretando distintas moléculas. El material secretado se considera normalmente soluble, sin embargo, también existen mecanismos específicos para exportar componentes insolubles. Uno de estos mecanismos es la producción de vesículas de membrana como vía de secreción. De hecho, la secreción de vesículas de membrana es un proceso celular universal, como parte del ciclo natural de crecimiento de las células y ocurre tanto en organismos complejos multicelulares, incluyendo humanos, como en microorganismos simples como las bacterias gramnegativas (Rothfield y Pearlman-Kothencz, 1969; Wensink y Witholt, 1981; Nowotny y col., 1982; Grenier y Mayrand, 1987; Deslauriers y col., 1990; Beveridge, 1999; Mashburn-Warren y Whiteley, 2006).

En el caso de las bacterias gramnegativas, las vesículas que se excretan al medio se han denominado vesículas de membrana externa (VME), ya que se forman a partir de estas estructuras. Estas VME fueron descritas y visualizadas por primera vez hace más de cuatro décadas (Knox y col., 1966), en cultivos de *Escherichia coli*. Inicialmente los autores consideraron que en medios de cultivo con un aporte de lisina limitado, se producía la inhibición de la síntesis de peptidoglicano, mientras la membrana externa continuaba sintetizándose y ello daba lugar a un exceso en el crecimiento de dicha membrana que no podía permanecer unida a la célula y se liberaba. Sin embargo, numerosos estudios posteriores han demostrado que una gran cantidad de bacterias gramnegativas producen VME en condiciones normales de crecimiento, tanto *in vitro* como cuando infectan tejidos *in vivo*, así como en ecosistemas naturales.

Inicialmente, el proceso de liberación de VME se asoció a diversas cepas patógenas entre las que destacan: *Escherichia coli*; *Neisseria* spp.; *Pseudomonas aeruginosa*; *Shigella* spp.; *Helicobacter pylori* (Devoe y Gilchrist, 1973; Hoekstra y col., 1976; Kadurugamuwa y Beveridge, 1995, 1999; Fiocca y col., 1999; Dutta y col., 2004). El número de bacterias productoras de VME ha ido creciendo tanto dentro de las bacterias patógenas como en bacterias procedentes de entornos naturales (Nevot y col., 2006b; Frías y col., 2010) y

actualmente se acepta como un mecanismo de secreción común en bacterias gramnegativas (Kuehn y Kesty, 2005).

Cabe destacar la observación de que las VME forman parte de los biofilms y las matrices extracelulares bacterianas (Schooling y Beveridge, 2006) y como nuestro trabajo está dedicado a la caracterización del material extracelular de bacterias antárticas pasamos a comentar algunos de los aspectos más relevantes de estas estructuras.

2.1 Características generales de las VME

Las VME son estructuras esféricas rodeadas por una bicapa lipídica, cuyo diámetro oscila entre 20-250 nm. Son excretadas al medio a partir de regiones de la membrana externa de las bacterias, por lo que su composición es muy similar a esta membrana y están formadas, por tanto, por una bicapa lipídica que contiene lipopolisacáridos (LPS), fosfolípidos y proteínas de membrana externa, así como también arrastran proteínas del periplasma (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996; Zhou y col., 1998).

Existen numerosos estudios sobre la composición del LPS de fracciones de VME purificadas que confirman su formación a partir de la membrana externa. Además se han realizado estudios bioquímicos mediante geles de SDS-PAGE comparando los perfiles proteicos de las VME y los de la membrana externa de la misma bacteria y se ha podido apreciar repetidamente que las proteínas presentes en las VME se corresponden principalmente con proteínas de la membrana externa (Hoekstra y col., 1976; Loeb y Kilner, 1979; Kato y col., 2002). Además, en los perfiles proteicos de las VME se detectan bandas extras que confirman la presencia de proteínas solubles periplasmáticas (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995; 1996; Li y col., 1996).

Es interesante destacar que los perfiles de proteínas de las VME comparados con los de membrana externa son similares pero no idénticos. Algunas fracciones proteicas están enriquecidas en las VME, mientras que otras proteínas presentes en el perfil proteico de membrana externa quedan excluidas en las VME, lo que sugiere que la formación y liberación de VME no es un evento que ocurre al azar en cualquier región de la membrana externa, sino

que es producto de un mecanismo biológico específico (Loeb y Kilner, 1979; Wensink y Witholt, 1981; Horstman y Kuehn, 2000; Kato y col., 2002; Kulp y Kuehn, 2010).

Por otra parte, se han encontrado otros componentes celulares en las VME, entre los que destacan la presencia de material genético como ADN, ARN, así como diferentes factores asociados a la virulencia, incluyendo proteínas citoplasmáticas (Hortman y Kuehn, 2000; Wai y col., 2003; Kuehn y Kesty, 2005; Bauman y Kuehn, 2006; Nevot y col., 2006b; Lee y col., 2008). De este modo, las moléculas son incorporadas al lumen de las VME y logran ser liberadas al medio de manera protegida. Es conocido que tanto moléculas periplasmáticas dentro del lumen de VME, así como proteínas solubles asociadas con la superficie externa de las VME, son altamente resistentes a proteasas (Kesty y Kuehn, 2004), por lo que el transporte mediante VME posibilita que moléculas poco estables o insolubles alcancen destinos más alejados y la secreción de VME sea un medio de transporte seguro.

2.2 Obtención y análisis del contenido de VME

Para analizar la composición de las VME, se hace necesario hacer énfasis en los métodos de obtención y purificación de las mismas, ya que pueden influir en su composición. Nos referimos aquí al análisis de las VME producidas de modo natural por distintas bacterias gramnegativas y no a las VME obtenidas de modo artificial mediante la extracción con detergentes y que han sido estudiadas para la producción de vacunas. Para una misma bacteria, la composición de las VME naturales y las obtenidas mediante extracción con detergentes, cambia y se detectan distintas proteínas (Lee y col., 2008).

Las VME se pueden separar del sobrenadante del cultivo mediante centrifugación a alta velocidad (≥ 40.000 g). Sin embargo, este proceso puede favorecer la presencia de fimbrias y flagelos en la fracción de VME (Bauman y Kuehn, 2006), por lo que es mejor emplear métodos de ultracentrifugación con gradientes de densidad, para obtener fracciones de VME purificadas y eliminar de este modo la contaminación tanto de proteínas agregadas así como de pilis y flagelos (Bauman y Kuehn, 2006; Lee y col., 2007). Es importante también separar las VME a partir de cultivos que estén en fase logarítmica de crecimiento para evitar que haya lisis celular y se formen falsas vesículas a partir de fragmentos de la membrana externa de células rotas.

Como se ha mencionado anteriormente, en las VME encontramos LPS, lípidos, ADN, ARN y distintas proteínas, siendo el estudio de las mismas uno de los que puede arrojar más luz sobre las funciones y la formación de las VME. Para tener una visión completa de las proteínas que están presentes en las VME, actualmente se realizan estudios proteómicos, los cuales posibilitan la identificación, cuantificación y caracterización estructural, bioquímica y funcional de las proteínas presentes en las VME (Abel y col., 2007).

En los estudios proteómicos en primer lugar se deben separar las proteínas en geles de poliacrilamida y para ello se han empleado los geles en dos dimensiones (2D) y en una dimensión (1D), existiendo una cierta controversia respecto a cuáles de ellos resultan de mayor utilidad. Los geles 2D son una herramienta útil con mayor capacidad para la separación de algunas proteínas, pero no pueden resolver correctamente las proteínas de membrana hidrofóbicas, muy básicas o de alto peso molecular que con frecuencia se encuentran presentes en las VME (Wu y Yates, 2003; Post y col., 2005). De este modo, la mayor complejidad de esta técnica respecto a los geles de 1D no siempre está justificada. Una vez separadas las bandas en el correspondiente gel, se procede a la digestión de las mismas con tripsina obteniendo mezclas de péptidos tripticos, que se separan mediante un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas (análisis nano-LC-MS/MS). Seguidamente los datos generados permiten realizar búsquedas con ayuda de distintos softwares como el buscador MASCOT, para identificar las proteínas de las VME.

Cada vez son más numerosos los estudios que describen el análisis proteómico de las VME de especies bacterianas (Post y col., 2005; Bauman y Kuehn, 2006; Nevot y col., 2006b; Lee y col., 2007; Berlanda Scorza y col., 2008; Kwon y col., 2009; Choi y col., 2011; Pierson y col., 2011, Lee y col., 2012). A pesar del gran número de proteínas identificadas en dichos estudios y aunque tengan distintos nombres para cada especie, podemos agrupar las proteínas o clasificarlas en diferentes familias de acuerdo a la homología en sus secuencias y a su función. De este modo, en la mayoría de VME de bacterias gramnegativas se han detectado familias proteicas comunes. De acuerdo al estudio de Lee y colaboradores, (2008), todas las VME analizadas presentan porinas de membrana externa (OmpA, PorA, PorB y OprF), hidrolasas de mureína responsables de la hidrólisis del peptidoglicano (MltA y SLT) y proteínas que forman bombas de flujo para eliminar componentes tóxicos para la célula (Mtr, Mex y TolC). También

se han detectado en la mayoría de VME analizadas transportadores ABC (LamB y FadL), proteínas de tipo chaperona/proteasa (DegQ/SurA) y proteínas relacionadas con la motilidad (FliC, PilQ). Además, en cepas patógenas se han detectado factores de virulencia como hemolisinas, proteasas que degradan IgA, factores que potencian la infección de macrófagos, entre otros.

En principio y si nos atenemos al hecho de que las VME derivan de la membrana externa celular en la que van apareciendo protuberancias hasta formar vesículas que finalmente son liberadas al medio, cabría esperar que sólo encontráramos proteínas de membrana externa y de periplasma y en ningún caso de citoplasma. Este hecho no está claro y diversos estudios identifican proteínas citoplasmáticas en las VME de distintas especies. Algunas de las proteínas citoplasmáticas detectadas corresponden a un factor de elongación (EF-Tu), una chaperonina (GroEL), proteínas ribosómicas como S1 y L7/12 (RpsA, RplL) o proteínas de shock térmico (DnaK) (Molloy y col., 2000; Ferrari y col., 2006; Lee y col., 2007).

Otro hecho controvertido en relación a los componentes de las VME es la presencia de ADN, ARN y proteínas de transcripción o ribosomales. Diversos estudios han descrito la presencia de estos componentes (Dorward y col., 1989; Kolling y Matthews, 1999; Yaron y col., 2000), pero resulta difícil explicar cómo pueden estos componentes llegar al periplasma y ser incorporados en las VME.

2.3 Funciones de las VME

En general, la formación de VME en bacterias gramnegativas, está considerada un sistema de secreción y liberación a través del cual se pueden diseminar productos bacterianos a cierta distancia y transmitir distintas funciones biológicas al medio ambiente y/o sobre otras células.

Aunque las funciones que puedan tener las VME aún no se han resuelto completamente, es un hecho claro que las proteínas asociadas a estas estructuras presentan distintas actividades biológicas, lo cual hace pensar que las VME probablemente ejerzan más de un rol. Algunas de las funciones que se atribuyen actualmente a las VME además de ser un sistema de secreción

de distintos factores, es la de actuar como nucleadoras en la formación de biofilms bacterianos y la de contribuir a la supervivencia bacteriana y a su virulencia.

2.3.1 Las VME como sistema de secreción

Las VME pueden liberar tanto proteínas solubles como compuestos insolubles. Las proteínas solubles se liberan asociadas o rodeadas de material insoluble como es la bicapa de la membrana externa y por tanto, por un mecanismo totalmente distinto a los sistemas conocidos de secreción de las proteínas solubles en bacterias.

Una propiedad única de la secreción por VME es que permite la liberación de lípidos de la bacteria, de proteínas hidrofóbicas insertadas en la membrana externa y otros compuestos insolubles. Un ejemplo de ello es la liberación en VME de proteínas de membrana externa denominadas adhesinas por parte de algunas bacterias patógenas como *Porphyromonas gingivalis*, causando agregación celular y contribuyendo al desarrollo de la placa dental (Inagaki y col., 2006). Otro ejemplo es la liberación de la molécula de *quórum sensing*, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (*Pseudomonas quinolone signal* o PQS), la cual es altamente hidrofóbica y secretada por *Pseudomonas aeruginosa* asociada a VME lo que permite su dispersión en un entorno acuático (Mashburn-Warren y Whiteley, 2005).

Otra propiedad singular de este sistema de secreción es que permite liberar moléculas solubles asociadas a estos complejos vesiculares, de modo que dichas moléculas quedan protegidas. De este modo, moléculas poco estables o sensibles a proteasas como sucede con algunas toxinas, permanecen más tiempo en el entorno ejerciendo una acción más sostenida (Kesty y Kuehn, 2004).

Una tercera característica de este sistema de secreción es que permite liberar proteínas concentradas en el interior de las vesículas, de este modo si estas proteínas sólo son efectivas a altas concentraciones, no es necesario liberar grandes cantidades como sucedería si se diluyeran en el medio, sino que pueden llegar a puntos distantes de la bacteria de un modo concentrado y ejercer su acción. Además, en el caso de enzimas que deban realizar una acción conjunta, las

VME también permiten liberar varias enzimas simultáneamente, de modo que podrán alcanzar lugares distantes todas al mismo tiempo.

Finalmente las VME también podrían realizar un transporte de moléculas específico o dirigido a dianas concretas. Para ello, se ha visto que las VME pueden presentar determinadas adhesinas específicas de unión a determinados ligandos o receptores presentes en entornos concretos. La combinación de todas estas características hace que las VME constituyan un sistema de secreción altamente efectivo y singular y por tanto justifique el elevado coste energético que supone su liberación para la célula bacteriana.

2.3.2 Las VME como factores de supervivencia

Un aspecto relacionado con la supervivencia de las bacterias, es la capacidad de eliminar compuestos tóxicos para las células por medio de las VME. Así por ejemplo, en determinadas situaciones de estrés que afectan a las envueltas bacterianas, las VME permiten eliminar con rapidez agregados de proteínas con una conformación incorrecta o compuestos tóxicos. La formación de VME como respuesta a situaciones de estrés fue propuesta por McBroom y Kuehn, (2007) y se trataría de un proceso totalmente independiente de los sistemas de respuesta al estrés conocidos.

También se ha descrito que algunas bacterias producen VME con gran rapidez frente al ataque de algunos bacteriófagos. De este modo, al liberar las VME, las células también se liberarían del fago antes de que este pudiera inyectar su ADN y al mismo tiempo se generarían fragmentos de membrana externa al margen de las células que engañarían al fago (Loeb y Kilner, 1979). Así mismo, se ha podido observar una elevada producción de VME cuando una población bacteriana se pone en contacto con un agente antimicrobiano dirigido a la membrana externa. En este caso, el antibiótico no sólo queda unido a las VME, sino que en algunos casos al asociarse a éstas, puede quedar inactivado, por ejemplo por β -lactamasas transportadas en las vesículas (Ciofu y col., 2000). La unión del antimicrobiano a las vesículas sería pues una primera línea de defensa, costosa energéticamente, pero que le permitiría a la bacteria sobrevivir hasta poder establecer un mecanismo de defensa estable.

Estudios realizados por Kadurugamuwa y Beveridge, (1995), demostraron también que la presencia de gentamicina en cultivos de *P. aeruginosa*, produce una alteración de la membrana externa y da lugar a la producción de gran cantidad de VME de mayor tamaño y que pueden arrastrar componentes citoplasmáticos. De este modo la adición del antibiótico potencia la actividad “depredadora” de las VME producidas por *P. aeruginosa* debido a la presencia de autolisinas y del propio antibiótico.

Así pues, las VME serían un mecanismo eficiente de eliminar compuestos tóxicos generados por la propia célula liberándolos al exterior y también su formación evitaría que agentes tóxicos externos, tanto químicos como biológicos, pudieran penetrar en la células. Por todo ello, las VME pueden ser vistas como un factor que contribuye a la supervivencia celular.

2.3.3 Las VME en la adquisición de nutrientes

Se ha demostrado en diversos estudios que las VME contienen enzimas y receptores que pueden contribuir a la adquisición de nutrientes y por tanto a la supervivencia de la bacteria (Thompson y col., 1985; Bauman y Kuehn, 2006; Vasilyeva y col., 2008). De este modo, enzimas como una aminopeptidasa de *P. aeruginosa* al excretarse asociada a VME puede ser externalizada y al mismo tiempo ser activa. Esto permite obtener una mayor concentración de aminoácidos alrededor de la bacteria. Otro ejemplo de esta función, es la presencia en las VME de *P. aeruginosa* de la señal hidrofóbica PQS que se une a hierro, un elemento esencial para la viabilidad pero que se encuentra en concentraciones limitantes en muchos entornos naturales. Gracias a los complejos VME-PQS-Fe, este elemento es captado del medio y puede ser absorbido por la membrana externa de la bacteria bien por una fusión con este complejo o bien ya que las VME pueden liberar el complejo PQS-Fe en un punto próximo a la célula para que pueda ser captado el Fe (Mashburn-Warren y Whiteley, 2005; Ellis y Kuehn, 2010).

2.3.4 Las VME como factores de patogenicidad

Algunas investigaciones demuestran claramente que las VME están implicadas en la patogenicidad de numerosas bacterias. Así por ejemplo, las VME obtenidas a partir de *P. aeruginosa* PAO1, pueden producir un efecto lítico frente a otras cepas de *Pseudomonas* sp.,

Staphylococcus aureus y *E. coli*. Esto sucedería a través de la secreción de potentes enzimas hidrolíticas encontradas en el lumen de las VME. Bajo determinadas condiciones las VME de *P. aeruginosa*, secretan una peptidoglicano hidrolasa que degrada la capa de peptidoglicano y que una vez liberadas las VME al medio, pueden provocar la lisis celular de diferentes bacterias que se encuentran en el entorno. El mecanismo de acción se basa en la fusión de la membrana de las VME con la membrana externa de la bacteria receptora, de modo que el contenido enzimático de la VME es liberado al periplasma de la bacteria y una vez allí la enzima puede difundir libremente y digerir el peptidoglicano provocando la lisis celular (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996; Li y col., 1996). También en bacterias grampositivas, las VME son capaces de adherirse a la capa S, donde la peptidoglicano hidrolasa migra a través de la capa S y ataca la pared subyacente de la célula (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996).

Otros estudios han demostrado claramente que la patogenicidad de una variedad de bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, depende en parte de la habilidad de secretar diversos factores de virulencia asociados a VME como hemolisinas, aerolisinas, fosfolipasas, proelastasas y toxinas. Estos factores, al ser transportados en el lumen de las VME, quedan protegidos frente a la acción de enzimas o compuestos constitutivos del huésped que podrían inactivarlos, por lo que las VME proporcionan un vía alternativa para la liberación de dichos factores (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995; Kolling y Matthews, 1999; Horstman y Kuehn, 2000).

En este mismo sentido, destacan los trabajos de Kuehn y Kesty, (2005), sobre las VME como vectores de toxinas bacterianas dirigidas a células eucariotas. Los autores han descrito la asociación de toxinas a VME producidas por bacterias patógenas como *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Helicobacter pylori* y *Shigella dysenteriae*. Particularmente interesantes son los estudios que demuestran la presencia de citolisina A (Cly A) en VME de *E. coli*. Esta toxina se encuentra en forma de monómero inactivo en el periplasma y en el interior de las VME forma oligómeros activos, que la convierten en una toxina más potente frente a células eucariotas (Wai y col., 2003).

Es interesante resaltar el hecho de que las VME no sólo facilitan la difusión de factores de patogenicidad, sino que permiten la liberación de los mismos de un modo concentrado y

masivo alrededor de las bacterias, lo que puede provocar la lisis de otras bacterias y con ello no sólo lograr reducir la competencia dentro del entorno microbiano, sino también proporcionar nutrientes liberados de la lisis de las bacterias competidoras.

Un aspecto muy importante es la capacidad de las VME para transferir factores de resistencia a antibióticos. En este sentido Ciofu y colaboradores, (2000), demostraron que las VME de *P. aeruginosa* pueden empaquetar β -lactamasas cromosómicas y transferir este factor de resistencia de una célula bacteriana a otra. A menudo se utilizan antibióticos para tratar infecciones como la fibrosis quística provocada por *P. aeruginosa* y la transferencia de la enzima β -lactamasa, permite a las bacterias dentro de una misma población "compartir" esta enzima que confiere resistencia a los antibióticos. Este hecho aumenta la patogenicidad bacteriana y también podría ser visto como una estrategia para incrementar la supervivencia de las bacterias, ya que una gran parte de la población bacteriana estaría protegida de la acción antimicrobiana. Recientemente se ha demostrado también que cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* liberan VME que permiten una transferencia horizontal de un gen que codifica para una carbapenemasa, extendiendo de este modo la resistencia a antibióticos de esta familia de compuestos (Rumbo y col., 2011).

2.3.5 Las VME en la transferencia de material genético

Se han publicado varios estudios que han detectado contenido de ADN y ARN en VME, lo que sugiere que pueden desempeñar un papel importante en la transferencia horizontal de material genético entre especies bacterianas. Así por ejemplo, se demostró que las VME secretadas por *N. gonorrhoeae* y *H. influenzae* pueden exportar ADN desde una cepa donadora y transferirlo a una cepa receptora (Kahn y col., 1982; Dorward y col., 1989). Otros estudios realizados por Kolling y Matthews, (1999), demostraron que VME obtenidas a partir de *E. coli* O157:H7 contienen las toxinas Shiga 1 y 2, y los genes de virulencia *eae*, *stx1*, *stx2* y *uidA*, que codifican para una β -glucuronidasa. Estos resultados sugirieron que las VME pueden transferir no sólo material tóxico, sino que pueden transferir material genético. En este sentido, los estudios realizados por Yaron y colaboradores, (2000), resultaron definitivos ya que demostraron que las VME aisladas de la bacteria patógena *E. coli* O157:H7, facilitaban la transferencia de genes relacionados con la virulencia a bacterias receptoras como *Salmonella enterica* serovar

Enteritidis o *E. coli* JM109, provocando en las mismas un aumento en su patogenicidad. El análisis del ADN contenido en las VME demostró que se exportaban genes específicos de la bacteria donadora, plásmidos recombinantes (*hly*, L7095, *mobA* y *gfp*), ADN crómico (*uidA* y *eaeA*) y ADN fágico (*stx1* y *stx2*). Este método de transferencia de genes mediante VME es claramente distinto de métodos bien conocidos como la transformación, conjugación y transducción y permite no sólo protección del material genético sino también la entrega directa del mismo a las células. La influencia y prevalencia de este mecanismo en entornos naturales y en cepas de interés clínico está todavía en fase de evaluación.

2.3.6 Las VME en la comunicación celular y formación de biofilms

Otro rol que se atribuye a las VME es el de actuar como señales para la comunicación celular (Mashburn-Warren y Whiteley, 2005). Es conocido que tanto en ambientes naturales, como durante las infecciones, muchas bacterias utilizan señales químicas para comunicarse y modular la expresión de genes específicos en respuesta a estas señales. Estos sistemas se conocen colectivamente como percepción de quórum (“*quórum sensing*” QS) y permiten a las bacterias supervisar y coordinar sus actividades de grupo en respuesta a la densidad celular (Parsek y Greenberg, 2000). Uno de los modelos empleados para estos estudios ha sido tomado de la bacteria *P. aeruginosa*, la cual utiliza el sistema QS para controlar la transcripción de aproximadamente el 5% de todos sus genes (Schuster y col., 2003; Wagner y col., 2003). Se han descrito tres moléculas de señalización primaria célula-célula que comprende butiril-homoserina lactona (C4-HSL), 3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3OC12-HSL) y 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), que en su conjunto constituyen una red integrada de señalización (Passador y col., 1993; Pearson y col., 1995; Pesci y col., 1999).

Un aspecto fundamental del QS es el movimiento de las señales en el medio extracelular (Kaplan y Greenberg, 1985; Pearson y col., 1999), ya que muchas moléculas de señalización tienen carácter hidrofóbico como PQS y 3OC12-HSL, lo cual obstaculiza su difusión entre las células bacterianas. Se ha descrito por diferentes autores la presencia de la molécula PQS en VME producidas por *P. aeruginosa* (Mashburn-Warren y Whiteley, 2005; Dubern y Diggle, 2008), lo que sugiere su papel en la transmisión de esta señal química hacia la población de dicha cepa. Estudios recientes han demostrado que la molécula PQS cosedimenta con las VME

y es necesaria en la formación de vesículas (Mashburn-Warren y Whiteley, 2005; Mashburn-Warren y col., 2008).

Por otra parte, se considera que la mayoría de las bacterias en la naturaleza viven formando biopelículas también denominadas biofilms, los cuales se definen como comunidades de células adheridas a una superficie y rodeadas por una matriz polimérica extracelular propia (Hall-Stoodley y col., 2004). Esta matriz contiene entre otros compuestos ADN, polisacáridos, fragmentos de células como flagelos y pilis, proteínas y sirve como una “capa” protectora para las bacterias.

Estudios realizados por Schooling y Beveridge (2006), permitieron detectar mediante microscopía electrónica la presencia de VME en la matriz extracelular de biofilms tanto obtenidos *in vitro*, como en biofilms extraídos de entornos naturales. La presencia e importancia de las VME en la formación de biofilms se ha estudiado detalladamente en *P. aeruginosa*. Así por ejemplo, se ha determinado que el 52% del LPS presente en los biofilms de *P. aeruginosa* deriva de las VME que se encuentran totalmente asociadas a la matriz del biofilm, a pesar de que las VME son de tamaño mucho menor que las bacterias. Se ha visto también que las VME presentes en estos biofilms se pueden separar en dos grupos diferentes: las VME de alta densidad de mayor tamaño y asociadas a flagelos y fragmentos de fimbrias y las VME de baja densidad que tienen el mismo tamaño que las VME de los cultivos planctónicos.

Caben destacar también los estudios realizados por Yonezawa y colaboradores, (2009), que demuestran que la adición de VME a cultivos de *H. pylori* estimula la producción de biofilms, lo que sugiere que las VME ayudan a formar agregados celulares y que su presencia no es exclusivamente el resultado de que queden atrapadas en dicha matriz.

Dentro del biofilm, las VME también podrían mediar en interacciones tanto externas como internas, así como la citada anteriormente de comunicación entre células a través de la señal PQS asociada a VME (Mashburn-Warren y Whiteley, 2005). Asimismo y como hemos comentado anteriormente, las VME presentes en un biofilm pueden contribuir a adquirir nutrientes y de este modo ayudar a la supervivencia de la bacteria (Thompson y col., 1985;

Bauman y Kuehn, 2006; Vasilyeva y col., 2008). Así pues, podríamos decir que las VME también pueden ejercer diversas funciones cuando se generan dentro de un biofilm, actuando como sustancias nucleadoras, como facilitadoras de la comunicación intercelular, contribuyendo a la adquisición de nutrientes y actuando como un mecanismo de defensa.

El conjunto de las funciones fisiológicas y patológicas atribuidas a las VME de bacterias gramnegativas está bien ilustrado en el esquema publicado en el artículo de Lee y colaboradores, (2008) y que reproducimos en la Figura 2.

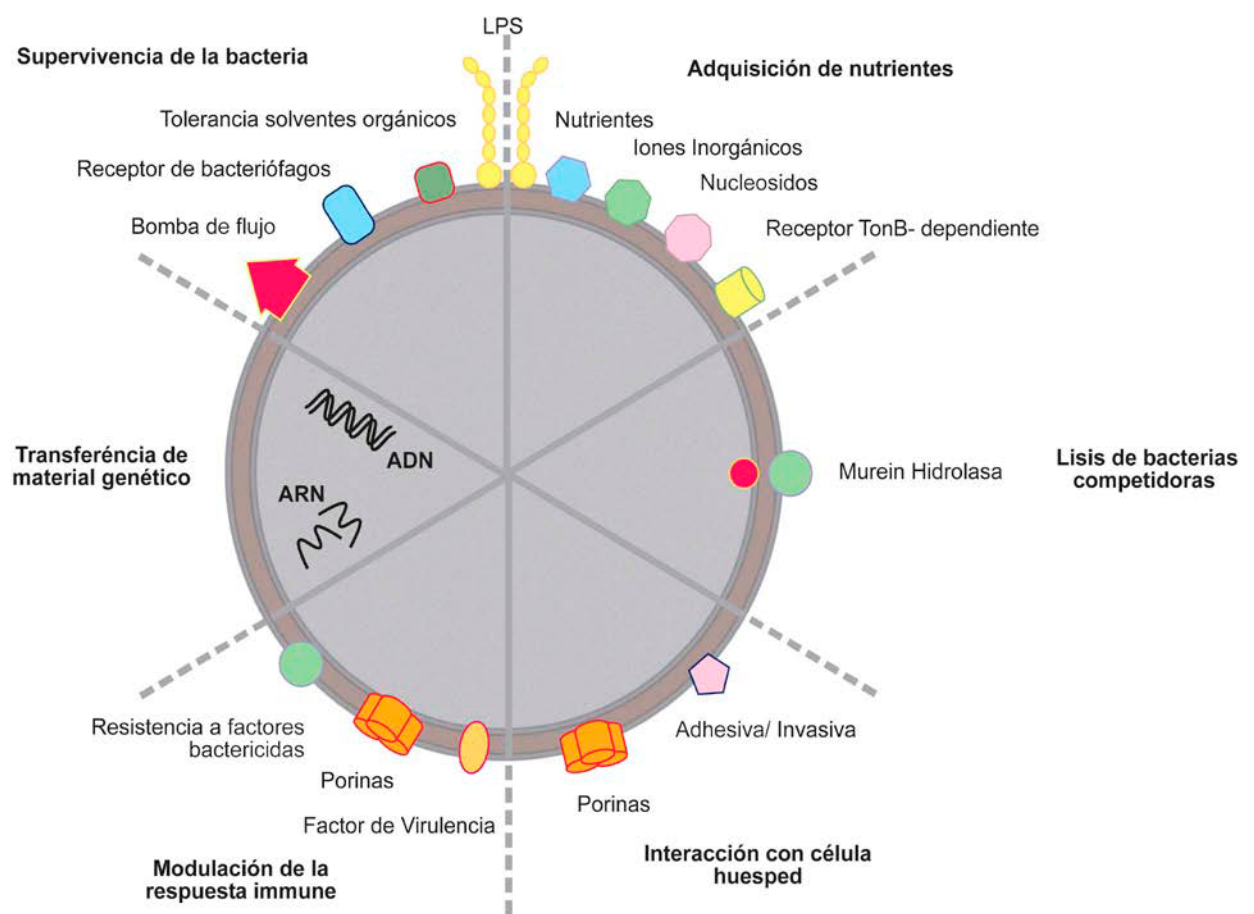


Figura 2: Esquema modificado a partir de Lee y col., (2008), de las funciones fisiológicas y patológicas conferidas a las VME de bacterias gramnegativas.

2.4 Biogénesis de las VME

Como hemos comentado, existen numerosos factores que pueden provocar la liberación de VME en distintas bacterias, aunque el mecanismo por el cual son producidas estas vesículas es aún desconocido y objeto de numerosos estudios (Kuehn y Kesty, 2005; Mashburn-Warren y Whiteley, 2006; McBroom y Kuehn, 2007).

La formación de vesículas implica la aparición de una protuberancia en la membrana externa bacteriana (ME) sin incluir la capa de peptidoglicano. Así pues, las VME se forman en sitios donde no están presentes las lipoproteínas de unión entre la membrana externa y el peptidoglicano. Este proceso se ha observado en circunstancias que implican una alteración o rotura de la integridad de las envueltas, como sucede en presencia de antibióticos o autolisinas (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996). En este caso las VME liberadas contienen fragmentos de peptidoglicano, incluso proteínas de unión entre la ME y el peptidoglicano. Aunque se ha descrito que esto sucede, no se trata del único mecanismo de vesiculación probado. Autores como McBroom y colaboradores, (2006), demostraron en *E. coli*, que la liberación de VME puede verse incrementada sin que hayan factores que aumenten la inestabilidad de la membrana externa.

Actualmente se han planteado 3 modelos para explicar la biogénesis de las VME (Figura 3). El primero sugiere que la formación es debida a una pérdida en la integridad de la envuelta bacteriana, debido a que la membrana externa se expande a una velocidad mayor que la capa subyacente de peptidoglicano (Figura 3, Modelo 1). El segundo modelo propone que las VME son producidas debido a un aumento de la turgencia en puntos de la membrana externa, por acumulación de proteínas o de moléculas de peptidoglicano que producen una curvatura en la membrana que induciría la formación de la VME (Figura 3, Modelo 2). Por otra parte, un tercer modelo involucraría a la molécula PQS (*Pseudomonas quinolone signal*), una quinolona autoinductora del sistema *quórum sensing* en *P. aeruginosa*, la cual desestabilizaría los puentes iónicos que se establecen entre los iones de Ca^{+2} y Mg^{+2} con el LPS, aumentando la repulsión aniónica y por consiguiente, estimulando la liberación de VME (Figura 3, Modelo 3) (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995; Horstman y Kuehn, 2000; Mashburn-Warren y Whiteley, 2005; Kulp y Kuehn, 2010).

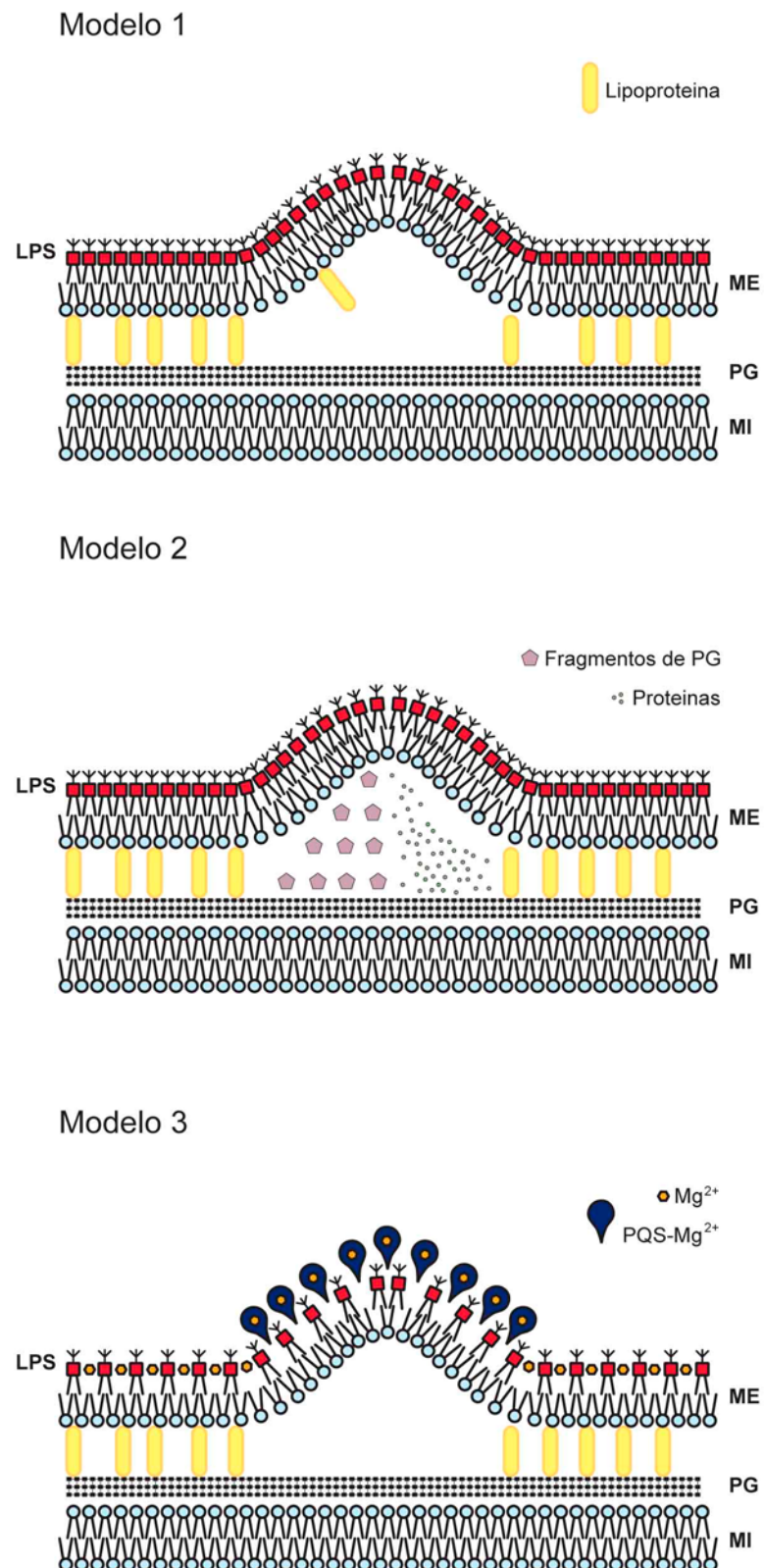


Figura 3: Modelos modificados a partir de Lee y col., (2008), propuestos para la biogénesis de las VME. (ME) membrana externa; (PG) peptidoglicano; (MI) membrana interna; (PQS) *Pseudomonas quinolone signal*; (LPS) lipopolisacárido.

Existen factores adicionales específicos del microorganismo que pueden modular la liberación de VME tales como el tamaño y la forma de las células, así como modificaciones en la capa de LPS. Las propiedades biofísicas de las formas redondas de los cocos contra las alargadas de los bacilos, pueden ser consideradas como un factor de potencial importancia en la formación de las VME de diferentes bacterias gramnegativas (Mashburn-Warren y col., 2008). Por ejemplo, *N. meningitidis*, es una bacteria que produce abundantes VME tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no codifica para proteínas homólogas involucradas en la biogénesis de la pared celular y la membrana como Lpp y OmpA, o lipoproteínas asociadas al peptidoglicano (Pal). Se ha sugerido que la falta de interacciones entre membrana externa y peptidoglicano, así como entre membrana externa-peptidoglicano-membrana interna, combinado con la forma definida de coco de las células, pudiera influir en la abundancia de VME producidas por esta cepa (Deatherage y col., 2009).

El mecanismo por el cual las VME se separan definitivamente de la célula tampoco está definido aún. Se ha sugerido que la liberación de una VME ocurre cuando la misma crece hasta el punto en que las fuerzas de curvatura inducen la separación de la membrana. Sin embargo, no está claro que esto suceda, puesto que la coexistencia de VME de diferentes tamaños (20-200 nm), indica que no hay un umbral crítico de curvatura que precipite la liberación definitiva de vesícula. Otro hecho poco claro es que los procesos de fisión de membranas dependen de un aporte energético, sin embargo en bacterias gramnegativas la membrana externa no presenta una fuente de energía directa como ATP o NADPH, por lo que no queda resuelto qué mecanismo dirige el proceso de vesiculación.

Para finalizar queríamos señalar que la membrana externa bacteriana no es una simple barrera mecánica sino una región muy dinámica de la célula y aunque determinados aspectos relacionados con la membrana externa de bacterias gramnegativas han sido ampliamente estudiados, la formación o biogénesis de las VME es un campo de investigación reciente y muy prometedor. El interés de estos estudios no radica exclusivamente en un interés científico, sino que las VME presentan potenciales aplicaciones biotecnológicas. Así por ejemplo se han identificando biomarcadores específicos en las VME que plantean la posibilidad de que puedan ser empleadas en el desarrollo de herramientas de diagnóstico, en la obtención de nuevas

vacunas y en la preparación de nuevos antibióticos contra organismos patógenos de importancia clínica (Kulp y Kuehn, 2010).

II.OBJETIVOS

II.OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación pertenece al Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Barcelona y entre sus focos de interés está la caracterización taxonómica de microorganismos procedentes de muestras antárticas. Estos estudios taxonómicos han permitido describir nuevas especies bacterianas y fúngicas con la característica común de ser todas ellas cepas adaptadas al frío, también denominadas psicotolerantes. De hecho, el inicio de este trabajo partió de la clasificación de la nueva bacteria *Shewanella vesiculosa* M7^T. Una de las principales adaptaciones al frío en estos microorganismos es la producción de materiales exopoliméricos (EPS) mucosos que pueden tener propiedades interesantes y potenciales aplicaciones biotecnológicas. En trabajos anteriores del grupo, se había demostrado la complejidad del EPS de la cepa antártica *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T que presentaba polisacáridos y abundantes vesículas de membrana externa (VME).

Por otra parte nuestro grupo está desarrollando un proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CICYT, CTQ2010-21183-C02-01), el cual tiene entre sus objetivos la búsqueda de nuevas cepas con capacidad para producir emulsionantes naturales poliméricos. Existe un interés real en el aislamiento y caracterización estructural y funcional de nuevos exopolímeros obtenidos a partir de microorganismos de ambientes extremos que pudieran ser utilizados como agentes emulsionantes, agregantes o espesantes con aplicaciones en diversas industrias.

Así pues, el **objetivo general** de esta tesis doctoral ha sido estudiar a nivel estructural un conjunto de bacterias antárticas adaptadas al frío y caracterizar el material extracelular que producen con el fin de detectar nuevos emulsionantes. Para dar cumplimiento al mismo, se trazaron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Realizar el estudio estructural de bacterias antárticas así como de los materiales extracelulares que producen, mediante el empleo de microscopía electrónica de transmisión (MET), aplicando técnicas de criofijación a alta presión y criosustitución (HPS-FS).

2. En el caso de detectar por MET cepas que presenten abundantes VME en su material extracelular, se procederá a realizar el aislamiento, caracterización y estudios proteómicos de dichas vesículas de membrana.
3. Realizar un cribado para detectar actividad emulsionante en microorganismos procedentes de la Antártida, incluyendo la nueva especie *Shewanella vesiculosa* M7^T.
4. Obtener el EPS de la(s) cepa(s) que presente mayor actividad emulsionante para caracterización química y estudiar las propiedades emulsionantes del mismo.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos, medios, condiciones de cultivo y conservación

1.1 Microorganismos

Los microorganismos empleados pertenecen a la colección de bacterias adaptadas al frío, aisladas por el grupo de trabajo de la Dra. E. Mercadé a partir de muestras antárticas, en el Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.

Tabla 2: Cepas empleadas en este estudio

| Microorganismos | Sitio de aislamiento | Referencia |
|---|---|------------------------|
| <i>Shewanella vesiculosa</i> M7 ^T ^a LMG 24424 ^T ^b CECT 7339 ^T | Sedimento marino, Isla Decepción, Antártida | Bozal y col., (2009) |
| <i>Shewanella livingstonensis</i> NF22 ^T LMG 19866 ^T CECT 5933 ^T | Agua, Isla Livingston, Antártida | Bozal y col., (2002) |
| <i>Pseudomonas deceptionensis</i> M1 ^T LMG 25555 ^T CECT 7677 ^T | Sedimento marino, Isla Decepción, Antártida | Carrión y col., (2011) |
| <i>Pseudomonas guineae</i> M8 ^T LMG 24016 ^T CECT 7231 ^T | Suelo, Isla Decepción, Antártida | Bozal y col., (2007) |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. M4-2 | Sedimento marino, Isla Decepción, Antártida | (sin publicar) |
| <i>Pseudoalteromonas antarctica</i> NF ₃ ^T LMG 18002 ^T CECT 4664 ^T | Lodo, Isla Rey Jorge, Antártida | Bozal y col., (1997) |
| <i>Psychrobacter luti</i> NF11 ^T LMG 21276 ^T CECT 5885 ^T | Lodo, Isla Rey Jorge, Antártida | Bozal y col., (2003) |
| <i>Psychrobacter fozii</i> NF23 ^T LMG 21280 ^T CECT 5889 ^T | Lodo, Isla Rey Jorge, Antártida | Bozal y col., (2003) |
| <i>Marinobacter guineae</i> M3B ^T LMG 24048 ^T CECT 7243 ^T | Sedimento marino, Isla Decepción, Antártida | Montes y col., (2008) |

^aLMG: Colección belga de cultivos y ^bCECT: Colección española de cultivos tipo

1.2 Medios de cultivos

Los medios de cultivos sólidos utilizados en este trabajo se describen a continuación.

-TSA (Tryptona Soja Agar) (Pronadisa): Su composición por litro es:

| | |
|--------------------|------|
| Peptona de caseína | 15 g |
| Peptona de soja | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 15 g |
| pH | 7,3 |

-Agar Marino (Difco): Su composición por litro es:

| | |
|----------------------|---------|
| Peptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 1,0 g |
| Cloruro de sodio | 19,45 g |
| Citrato de hierro | 0,1 g |
| Sulfato de sodio | 3,24 g |
| Cloruro de magnesio | 8,8 g |
| Cloruro de calcio | 1,8 g |
| Cloruro de potasio | 0,55 g |
| Bicarbonato de sodio | 0,16 g |
| Bromuro de potasio | 0,08 g |
| Cloruro de estroncio | 34,0 mg |
| Ácido bórico | 22,0 mg |
| Silicato de sodio | 4,0 mg |
| Fluoruro de sodio | 2,4 mg |
| Fosfato disódico | 8,0 mg |
| Nitrato de amonio | 1,6 mg |
| Agar | 15,0 mg |
| pH | 7,6 |

Los medios de cultivo fueron esterilizados mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Los medios de cultivos líquidos utilizados en este trabajo fueron:

-TSB (Caldo de Tryptona y Soja) (Oxoid): Su composición por litro es:

| | |
|--------------------|------|
| Peptona de caseína | 15 g |
|--------------------|------|

| | |
|-----------------|-----|
| Peptona de soja | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| pH 7,3 | |

-Caldo Marino (Difco): Su composición por litro es:

| | |
|----------------------|---------|
| Peptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 1,0 g |
| Cloruro de sodio | 19,45 g |
| Citrato de hierro | 0,1 g |
| Sulfato de sodio | 3,24 g |
| Cloruro de magnesio | 8,8 g |
| Cloruro de calcio | 1,8 g |
| Cloruro de potasio | 0,55 g |
| Bicarbonato de sodio | 0,16 g |
| Bromuro de potasio | 0,08 g |
| Cloruro de estroncio | 34,0 mg |
| Ácido bórico | 22,0 mg |
| Silicato de sodio | 4,0 mg |
| Fluoruro de sodio | 2,4 mg |
| Fosfato disódico | 8,0 mg |
| Nitrato de amonio | 1,6 mg |
| pH 7,6 | |

-MM5: Medio mineral descrito por Bozal y colaboradores, (1994). Su composición por litro es:

| | |
|--|---------|
| Na ₂ HPO ₄ (Fluka) | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ (Fluka) | 2 g |
| NaCl (Fluka) | 1 g |
| NH ₄ Cl (Panreac) | 7 g |
| FeSO ₄ (Merck) | 0,018 g |
| CaCl ₂ (Fluka) | 0,05 g |
| MgSO ₄ (Sigma) | 0,5 g |

Glucosa (Fluka) 20 g

pH 7,0

Para la elaboración de este medio mineral se prepararon soluciones concentradas de los siguientes componentes:

1. MgSO₄.7H₂O (10 g/10 ml H₂O)
2. FeSO₄.7H₂O (0,18 g/10 ml H₂O)
3. CaCl₂ (1 g/10 ml H₂O)
4. Glucosa (20 g/100 ml H₂O)

Las soluciones concentradas 1, 2 y 3 fueron esterilizadas por filtración con filtros de 0,45 µm. (Whatman[®]), mientras que la solución 4 se esterilizó en autoclave a 1/2 atm durante 30 minutos. El resto de los componentes del medio mineral se disolvieron en ($V_{\text{deseado}} - 10\%V_{\text{deseado}}$) ml de agua destilada, se distribuyeron en matraces muescados y se esterizaron a 1/2 atm durante 30 minutos. Una vez esterilizada la solución se reconstituyó el medio añadiendo $0,1\%V_{\text{deseado}}$ ml de las soluciones concentradas de MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O y CaCl₂ y $10\%V_{\text{deseado}}$ ml de la solución concentrada de glucosa.

1.3 Condiciones de cultivo

1.3.1 Cultivos sólidos

Todas las cepas se cultivaron en placas de TSA a 15 °C durante 48-72 horas (h), excepto *Marinobacter guineae* M3B^T, el cual se cultivó en Agar Marino en las mismas condiciones. Las modificaciones en los tiempos y temperaturas de incubación se especifican en cada apartado.

1.3.2 Cultivos líquidos

Se partió de placas de TSA o Agar Marino para la preparación de preinóculos. Se resuspendieron tres o cuatro colonias en 10 ml de Ringer 1/4 hasta turbidez 1 en la escala de McFarland y la suspensión se transfirió a matraces de 500 ml de capacidad con 150 ml de medio TSB, Caldo Marino o MM5 según fuera el caso, se dejó incubando 18 h a 150 rpm y finalmente se inoculó el volumen correspondiente al 4% del volumen a cultivar. Las condiciones de los cultivos líquidos se especifican en el apartado de cada experimento.

1.4 Conservación y mantenimiento de las cepas

Las cepas se incubaron en TSA y se resembraron cada siete días; excepto *Marinobacter guineae* M3B^T que se cultivó sobre medio Agar Marino. Se utilizó el sistema de mantenimiento CRYO-BILLES (AES, AEB400100, Combours, Francia) para mantener las cepas congeladas a -80 °C.

2. Técnicas de microscopía

2.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

2.1.1 Tinción negativa de VME

Se tomó un volumen de 30 µL de la muestra correspondiente a las VME obtenidas a partir de las diferentes cepas, según procedimiento descrito en el apartado 3.1. Se colocó sobre parafilm y a continuación se depositó sobre la gota una rejilla de microscopía electrónica de cobre 200 MESH recubierta con Formvar-carbono y se dejó adsorber la muestra durante 2 min. Luego se lavó la rejilla colocándola sobre una gota de agua bidestilada durante 10 s. Finalmente, la rejilla se colocó sobre una gota (≈ 20 µL) del agente de tinción (acetato de uranilo) al 2% (m/v) durante 1 min. Inmediatamente se retiró el exceso de acetato de uranilo con papel de filtro desde un lateral de la rejilla y se dejó secar con la muestra hacia arriba sobre papel de filtro. Una vez preparadas las rejillas con las muestras, se colocaron en un desecador hasta su observación final en microscopio electrónico de transmisión Tecnai Spirit (FEI Company, Holanda) a 120 kv. Las imágenes fueron captadas con la cámara CCD (FEI, Eindhoven, Holanda) y procesadas a través del programa AnalySIS (Soft Imagine Systema, Suiza).

2.1.2 Criofijación por alta presión-Criosustitución-Inclusión (High Pressure Freezing and Freeze- Substitution, HPF-FS)

Las colonias de bacterias fueron seleccionadas bajo estereomicroscopio y se transfirieron a *planchettes* de diámetro 1,5 mm y profundidad 200 µm e inmediatamente se procedió a la criofijación por alta presión utilizando el equipo Leica EM Pact (Leica, Viena, Austria) a una presión de 2100 bar y con una velocidad de disminución de temperatura de 8000 °C/s. Las *planchettes* fueron entonces mantenidas en nitrógeno líquido hasta su uso.

Las muestras crioinmovilizadas se criosustituyeron en acetona pura conteniendo tetróxido de osmio al 2% (m/v) y acetato de uranilo 0,1% (m/v), durante 72 h a -90 °C en un equipo Leica AFS (Automatic Freeze Substitution). Se incrementó la temperatura de forma gradual a 5 °C/h, hasta llegar a los 4 °C. Las muestras se mantuvieron 2 h a 4 °C y luego la temperatura se elevó hasta 25 °C donde se mantuvo durante 2 h. Se realizaron tres lavados sucesivos con acetona durante 15 min a temperatura ambiente y las muestras se incluyeron en resina Epon-acetona: 1:3 durante 2 h; 2:2 durante 2 h, 3:1 durante 16 h y finalmente en Epon pura durante 30 h. Finalmente se procedió a la polimerización de la resina durante 48 h a 60 °C.

2.1.3 Cortes ultrafinos

Los cortes semifinos de 1 µm fueron realizados para poder localizar la zona deseada en un microscopio óptico. Posteriormente mediante ultramicrotomo (Leica, UCT), se realizaron cortes ultrafinos, de 50-60 nm, que se recogieron en rejillas recubiertas con Formvar y carbono. Las secciones obtenidas se contrastaron con acetato de uranilo al 2% (p/v) en agua durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se procedió a lavar la muestra con abundante agua y se contrastó con citrato de plomo aproximadamente durante 5-6 min en presencia de lentes de NaOH y en una atmósfera cerrada en ausencia de CO₂.

3. Producción, aislamiento, cuantificación y purificación de VME y aislamiento de membrana externa celular

3.1 Producción y aislamiento de VME

La obtención de las VME se realizó de acuerdo al procedimiento de Kadurugamuwa y Beveridge, (1995). Las cepas fueron cultivadas en matraces muescados de 1000 ml de capacidad que contenían 500 ml de caldo triptona soja (TSB), excepto para *Marinobacter* que se empleó Caldo Marino, los cuales se incubaron en agitador orbital a 200 rpm durante 4 días a 15 °C, sino se especifica lo contrario. Posteriormente, se separaron las células mediante centrifugación a 10.000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,45 µm (Whatman®) y las vesículas de membrana se obtuvieron por centrifugación a 47,000 g durante 1 h a 4 °C en una centrífuga Avanti® J 20 XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU). Los sedimentos que contenían vesículas se resuspendieron en tampón 10 mM HEPES pH 6,8 y la suspensión se filtró a través de filtros de 0,45 µm (Amicon-Ultra,

Millipore, Billerica, MA, EE.UU), para eliminar cualquier bacteria que pudiera estar aún presente.

Para el estudio de la influencia de la temperatura se emplearon las siguientes condiciones: en los estudios proteómicos las VME se obtuvieron a partir de cultivos en TSB de *S. vesiculosa* M7^T y *S. livingstonensis* NF22^T incubadas a 4 °C y 16 °C y para determinar la influencia de la temperatura en la estructura de la cepa y de las VME, se cultivó en TSA *S. livingstonensis* NF22^T a 4, 10 y 18 °C.

3.2 Cuantificación de VME

La cuantificación de VME se llevó a cabo según el método descrito por McBroom y colaboradores, (2006). La fracción de vesículas fue incubada durante 20 min a 37 °C, con el reactivo FM4-64 (Molecular Probes; 5 µg/ml en tampón fosfato-salino). Como controles negativos se emplearon tanto las VME sin añadir reactivo, así como el reactivo FM4-64 sin vesículas. Luego se midió la fluorescencia con espectrofluorímetro SLM-Aminco 8100 (Urbana, IL, USA), después de excitación a 515 nm y emisión a 635 nm. Las unidades formadoras de colonia (UFC) fueron determinadas por el método de dilución en placa y la producción de VME fue calculada dividiendo las unidades de fluorescencia (UF) lipídicas por unidades formadoras de colonia (UFC).

3.3 Purificación de VME

Las vesículas fueron purificadas por el método adaptado de Horstman y Kuehn, (2000), con gradientes de 45% de Optiprep® (Sigma) en tampón 10 mM HEPES/0,85% NaCl (p/v), pH 7,4. Las concentraciones de la solución de Optiprep/HEPES-NaCl, se añadieron sobre 4 ml de muestras de VME, en el siguiente orden: 4 ml de la solución al 40%, 4 ml de la solución al 35%, 6 ml al 30%, 4 ml al 25% y finalmente 2 ml al 20%. A continuación se centrifugaron los gradientes mediante ultracentrifugación a 100.000 g durante 20 h, (Ultracentrífuga OPTIMA™ L-90K (Beckman Coulter). Se recolectaron cuidadosamente fracciones de 1 ml, que fueron visualizadas por electroforesis SDS-PAGE al 12% y posterior tinción con azul de Coomassie.

Las fracciones conteniendo VME fueron unificadas, resuspendidas en 10 mM HEPES, dializadas y concentradas a través de filtros Amicon® Ultra (Millipore). Finalmente las vesículas purificadas fueron usadas para estudios proteómicos y tinción negativa.

3.4 Contenido de proteínas en VME

La concentración de proteínas en VME fue determinada por el método Bradford (ver apartado 8.2), usando el reactivo estándar Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, Alemania).

3.5 Determinación de ácidos grasos de VME

Para determinar la composición de ácidos grasos se utilizó un sistema automatizado de identificación microbiana (MIS) y fueron analizados mediante cromatografía de gases (Hewlett Packard modelo HP5890A) de los ácidos grasos celulares. El análisis se realizó con las siguientes muestras: *S. vesiculosa* M7^T crecida en TSA durante 5 días y la fracción de VME de dicha cepa. Para ello se pesaron 40 mg de cada muestra y se transfirieron a tubos de 10 cm x 13 mm, donde se procedió a realizar diferentes reacciones.

A cada tubo se le añadió 1 ml del reactivo de saponificación: NaOH (45 g), metanol (150 ml) y agua (150 ml), luego se sellaron herméticamente y se mantuvieron 5 min a 100 °C. Transcurrido ese tiempo, se agitó vigorosamente durante 5-10 s y se volvieron a incubar a 100 °C durante 30 min. A continuación los tubos se enfriaron en hielo y luego se añadieron 2 ml del reactivo de metilación HCl 6N (325 ml) y metanol (275 ml), lo que provocó un descenso de pH hasta aproximadamente 1,5 causando la metilación de los ácidos grasos. Los tubos se calentaron a 80 °C durante 10 min, para facilitar la solubilización de los ésteres metílicos. Seguidamente, se realizó la extracción de los ácidos grasos añadiendo 1,25 ml del reactivo de extracción: hexadecano (200 ml) y metil-terbutil éter (200 ml). Se agitó suavemente durante 10 min para facilitar la extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en la fase orgánica y con la ayuda de una pipeta se eliminó la fase acuosa.

Se procedió a lavar las muestras extraídas añadiendo 3 ml del reactivo de lavado: NaOH (10,8 g) y agua (900 ml) y se agitó suavemente durante 5 min. Finalmente se tomaron $\frac{2}{3}$ partes de la fase orgánica y se analizaron en sistema de cromatografía con una columna capilar de sílice

fundida y fenil metil silicona de 25 m x 0,2 mm, la cual estaba previamente calibrada con una mezcla de ácidos grasos saturados de 9 a 20 átomos de carbono y de 5 hidroxiacidos.

Los ácidos grasos fueron identificados y cuantificados comparados con otros microorganismos, utilizando el software MIDI System, versión 3.2. Las cantidades relativas de cada ácido graso en las muestras se expresaron como un porcentaje del total de ácidos grasos.

3.6 Obtención de membrana externa bacteriana (ME)

Se procedió según el método descrito por Puig y colaboradores, (1993). Los cultivos de TSB de 5 días de incubación se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 5 °C. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con 50% del volumen inicial de tampón 10 mM HEPES pH 7,4 y luego se resuspendieron con $\frac{1}{5}$ del volumen inicial de la misma solución tampón. Las células se sometieron a sonicación, durante 3 pulsos de 1 min cada uno, con intervalos de 30 s a 140 W. A continuación se centrifugó la suspensión a 10.000 g durante 10 min a 4 °C, con el fin de sedimentar las células que no se hubieran roto en el proceso de sonicación. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 38.400 g durante 1 h a 4 °C, en una centrífuga Avanti J-20 XP (Beckman Coulter, Inc), para sedimentar las membranas totales. El sedimento se lavó con solución 10 mM HEPES + 2% (p/m) Sarcosil (*N*-lauroylsarcosine, Sigma) pH 7,4 y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 40.000 g durante 90 min a 20 °C. Finalmente el sedimento correspondiente a la fracción enriquecida con membrana externa, se resuspendió en el mismo tampón, se fraccionó en alícuotas en tubos Eppendorf y estos se congelaron a -20 °C hasta su uso.

3.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Las proteínas procedentes tanto de VME como de ME se analizaron mediante el sistema de electroforesis Mini-Protean III de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU) con una fuente de alimentación PowerPac 300 (Bio-Rad), de acuerdo con el procedimiento descrito por Laemmli, (1970). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (G-250) (Fluka) (Fairbanks y col., 1971), tinción de plata (Tsai y Frash, 1982) y tinción de glicoproteínas (GelCode®

Glycoprotein Staining Kit, PIERCE, catálogo 24562), según se indique y se utilizó un marcador de masa molecular de amplio rango (Bio-Rad), número de catálogo 161-0317.

4. Estudio proteómico para la identificación de proteínas de VME

4.1 Electroforesis SDS-PAGE y tripsinización de las bandas

El estudio proteómico de las VME se realizó a partir de geles de una dimensión (1D-SDS-PAGE), mediante digestión de las bandas de proteínas con tripsina (Promega) para obtener péptidos. Las VME purificadas fueron precipitadas toda la noche usando acetona a -20 °C y el pellet fue secado mediante centrifugación al vacío. La electroforesis unidimensional fue realizada bajo condiciones desnaturalizantes al 12,5% SDS-PAGE y la corrida fue en sistema Ettan Dalt II (GE). Para el análisis, se cargó en cada pocillo 100 µg de proteínas totales de VME y el gel fue teñido con azul de Coomassie.

Posteriormente, las bandas de proteínas fueron cortadas con ayuda de un bisturí y se lavaron secuencialmente con tampón bicarbonato amónico y acetonitrilo. Se empleó una solución de 10 mM DTT en bicarbonato amónico durante 30 min y una solución 100 mM iodoacetamida en bicarbonato amónico, con el fin de reducir y alquilar las proteínas, respectivamente. A continuación se realizaron lavados secuenciales con tampón bicarbonato amónico y acetonitrilo y las proteínas fueron digeridas durante toda la noche a 37 °C con 0,27 nmol de tripsina. Los péptidos fueron extraídos de la matriz del gel con una solución al 10% (v/v) de ácido fórmico y acetonitrilo, luego fueron colectados y secados mediante un concentrador de vacío.

4.2 Espectrometría de masas y análisis de datos

Los péptidos obtenidos al realizar la digestión con tripsina se analizaron por espectrometría de masas en tándem conectado *on-line* con un equipo de cromatografía líquida, Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF Global (Micromass-Waters).

Las muestras se resuspendieron en 10 μ l de una solución de ácido fórmico al 10% (v/v) y se inyectaron 4 μ l de la misma en una columna capilar C₁₈ de separación cromatográfica en fase reversa PepMap Column (LC Packings), 75 μ m de diámetro interno y 15 cm de longitud. Los péptidos eluidos se ionizaron mediante agujas recubiertas nano-ES, PicoTip™ (New Objective). El voltaje capilar aplicado fue de 1800-2200 V junto a un voltaje cónico de 80 V. La fragmentación en la cámara de colisión (CID, *collision-induced dissociation*) se realizó a 20-35 eV con argón como gas de colisión. Los datos se generaron en formato PKL y se enviaron al servidor MASCOT. Para la búsqueda contra las diferentes bases de datos, NCBI/all y NCBI/Bacterias, se emplearon los espectros de masas en tándem (MS/MS) con carga iónica ⁺² y ⁺³.

La tolerancia a péptidos fue de 100 ppm y 0,25 Da respectivamente tanto para espectros MS como para MS/MS. Las proteínas fueron identificadas empleando el valor probabilístico Mowse y sólo fueron considerados como significativos aquellos valores por encima del 95% de probabilidad ($\alpha < 0,05$).

5. Cribado inicial de la actividad emulsionante en cepas procedentes de la Antártida

Las cepas crecieron en medio MM5, excepto *Marinobacter guinea* M3B^T que creció en Caldo Marino, durante 7 días a 150 rpm a 10 °C. Se recolectaron fracciones de los cultivos de cada cepa y el medio restante se centrifugó a 6000 g durante 15 min a 4 °C en centrífuga Avanti® J-20 XP (Beckman Coulter, Inc). Las células sedimentadas fueron lavadas con Ringer ¼ dos veces para finalmente centrifugarlas en iguales condiciones. Tanto con el sobrenadante de los cultivos como los lavados de las células de cada una de las cepas estudiadas, se realizaron determinaciones de pH (micropH2001, CRISON), ensayos de actividad emulsionante frente al *n*-hexadecano según Cooper y Goldenberg, (1987) y tensión superficial (Digital Tensiometer K9, KRÜSS) (ver apartados 9 y 10 respectivamente).

6. Cinética de crecimiento y actividad emulsionante de *S. vesiculosa* M7^T en medio MM5

La cepa *S. vesiculosa* M7^T se hizo crecer en 3 matraces de 2 L con 1 L de medio MM5 a 10° C y 150 rpm. Durante el cultivo, se extrajeron a intervalos determinados (0, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 h), muestras del cultivo para determinar el crecimiento mediante

recuento de células en placa, pH (micropH2001, CRISON), ensayo de actividad emulsionante y tensión superficial (ver apartados 9 y 10 respectivamente).

7. Obtención del material extracelular (EPS) de *Shewanella vesiculosa* M7^T

La cepa *S. vesiculosa* M7^T se hizo crecer en 12 matraces muescados de 2 L de capacidad con 1 L de medio MM5, durante 6 días a 10 °C y 150 rpm. El cultivo se centrifugó a 6000 rpm, se guardó el sobrenadante y las células se resuspendieron en Ringer ¼ y se agitaron durante 30 min, para luego centrifugarlas 1 h a 40.000 g. El sobrenadante inicial, así como el obtenido después del lavado de las células, fueron procesados para obtener el EPS. Para ello, todo el líquido fue filtrado mediante filtros tangenciales de 0,45µm (Sistema Pellicon, Millipore) y posteriormente concentrado y dializado a través del Sistema Pellicon Millipore con membranas de 10 kDa. Finalmente el concentrado se liofilizó (Telstar, Cryodos) durante 3 días para su posterior caracterización química.

8. Caracterización química del EPS liofilizado de *S. vesiculosa* M7^T

8.1 Determinación de la concentración de carbohidratos totales

La determinación de la concentración de carbohidratos totales se realizó por el método modificado del fenol sulfúrico descrito por Dubois y colaboradores, (1956).

Se realizó curva patrón partiendo de una solución de glucosa (Panreac), de 400 µg/ml (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/ml). Se tomó 1 ml de solución de analito, el blanco y solución estándar en tubos de ensayos lisos de vidrio y luego se añadió 0,5 ml de solución de fenol al 5% (p/v).

Seguidamente se adicionó en forma rápida 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado 95% (Panreac) y luego se agitó en vortex durante varios segundos hasta que se observó el desarrollo de coloración amarilla-anaranjada. Pasados 10-15 min, se colocaron los tubos en un baño de agua a 30 °C por 15 min. Finalmente se transfirió a las cubetas de cuarzo y se leyó en espectrofotómetro (PharmaSpec W-1700, Shimadzu) a 492 nm.

8.2 Determinación de proteínas totales del EPS

La determinación de proteínas totales del EPS se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

8.3 Determinación de lípidos totales del EPS

La determinación de lípidos se realizó mediante extracción con solvente orgánico según el método modificado de Folch y colaboradores, (1957). Para ello, se pesaron 100 mg del liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T y se realizaron sucesivas extracciones con cloroformo-metanol (2:1). La mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min y luego se agregaron 2,4 ml de la solución cloroformo-metanol-agua (3:48:47) y sales (CaCl₂-0,02%; MgCl₂-0,017%; NaCl-0,29%; KCl-0,37%). Las fases fueron filtradas a través de sulfato sódico, luego se centrifugaron y finalmente la fase orgánica se rotoevaporó a 45 °C y se pesó el balón que estaba previamente tarado.

8.4 Extracción de lípidos polares del EPS y desarrollo de la TLC bidimensional

La extracción de lípidos polares del liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T se realizó según el protocolo descrito por Minnikin y colaboradores, (1979) y Tindall, (1990). Para ello se pesaron 50 mg de la muestra a la que se agregó una mezcla de cloroformo, metanol y una solución acuosa de NaCl al 0,3% en proporción (1:2:0,8) (v/v/v). Se dejó el tubo en agitación orbital a temperatura ambiente hasta el día siguiente y luego se centrifugó a 350 g durante 5 min, para acelerar la formación de las dos fases. La fase superior se trasvasó en un tubo limpio al que se le añadió una mezcla de cloroformo y NaCl a 0,3% (1:1) (v/v). Se volvió a centrifugar a 350 g durante 5 min, la fase superior se descartó y la inferior se secó con gas nitrógeno. La muestra con lípidos se redisolvió en cloroformo-metanol (2:1) (v/v) y con este extracto resuspendido se realizó la cromatografía en capa fina (TLC).

Para la TLC se empleó una placa de silicagel de 10 x 10 cm (Merck) y una mezcla de cloroformo-metanol-agua (65:25:4) (v/v/v) como fase móvil para la primera dimensión y luego para la segunda, otra mezcla de cloroformo-metanol-ácido acético-agua (80:12:15:4) (v/v/v) (Tindall, 1990). En el punto de aplicación de la placa se cargaron 15 µl del extracto

lipídico y finalmente fue revelada con una solución de ácido fosfomolibdico (Sigma) al 5% (p/v) en etanol para detectar lípidos totales. Una vez revelada la placa fue escaneada para obtener la imagen final.

8.5 Determinación de azúcares por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrómetro de masas (*High performance liquid chromatography/mass spectrometry*) (HPLC/MS)

Para determinar la composición de monosacáridos del liofilizado obtenido a partir del material extracelular de *S. vesiculosa* M7^T, se realizaron hidrólisis ácidas con ácido trifluoroacético (TFA) (Fluka). Para ello se pesaron 5 mg de la muestra que luego fueron disueltos en 5 ml de TFA 2 M, durante 24 h a 100 °C en termoblock (Stuart Modelo SBH200D). Las muestras fueron preparadas para análisis por HPLC-MS, usando columnas Aminex HPX-87P Carbohydrate 300 x 7,8 mm + Aminex HPX- 87 C Carbohydrate 300 x 7,8 mm (Bio Rad). Como eluyente se empleó Agua Milli-Q y acetato de sodio (Panreac) y el flujo fue de 0,6 ml/min. Se utilizó el detector Index Refracción Waters 2414, 37 °C sensibilidad 156 mRIU, con inyector de 100 µl. La temperatura del horno (Kontron) fue de 85 °C y el tiempo de elución fue de 45 min. Para la cuantificación se emplearon patrones externos. El contenido de carbohidratos totales fue calculado a partir de las cantidades individuales de monosacáridos.

8.6 Determinación de aminoácidos del EPS

La composición de aminoácidos presente en la muestra liofilizada de *S. vesiculosa* M7^T, se determinó mediante hidrólisis ácida con ácido clorhídrico (HCl) (Panreac). Se pesaron en tubos de ensayos 10 mg de muestra, que fue disuelta en 10 ml de HCl 6 M y luego colocada en termoblock (Stuart Modelo SBH200D), durante 24 h a 105 °C. Se añadieron a la muestra 150 µl de Norleucina (Sigma) como patrón interno y se mantuvieron en desecador al vacío durante 48 h. Pasado este tiempo, las muestras secas fueron resuspendidas en 1 ml de tampón citrato de litio, pH 2,2 (Biochrom) y colocadas en tubos Eppendorf con filtros donde fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 min. Finalmente fueron recolectados los sobrenadantes filtrados y colocados en tubos para inyectar en analizador de aminoácidos Biochrom 30, (Biochrom) y se realizó la separación cromatográfica de intercambio iónico según el método

Spackman y colaboradores, (1958). Se empleó una columna de resina para intercambio catiónico (poliestireno divinil- benceno sulfonato) de 5 μm , 200 x 4 mm.

La elución por gradiente utilizó tampones de citrato de litio de pH 2,2 y fuerza iónica creciente a lo largo del programa, mientras que la temperatura fue convenientemente controlada a lo largo del programa en las condiciones óptimas de trabajo, indicadas por la casa comercial. La cuantificación se realizó usando patrón estándar interno y el contenido total de proteínas fue calculado a partir de cantidades individuales de aminoácidos.

8.7 Análisis del lipopolisacárido (LPS) del EPS

La obtención del lipopolisacárido se llevó a cabo mediante el método descrito por Hithcock y Brown, (1983). Para ello, se pesaron 10 mg del liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T, el cual fue resuspendido en 150 ml de PBS pH 7,2. Seguidamente se tomaron 50 μl de la muestra y se les añadió 50 μl de tampón de lisis (2% de SDS, 4% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 1M de Tris-HCl pH 6,8 y 0,002% de azul de bromofenol). Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se añadieron 50 μl de proteinasa K hasta una concentración de 0,5 mg/ml y se mantuvieron a 58 °C durante 2 h. Finalmente, se realizó un gel SDS-PAGE (12%), el cual fue teñido con sales de plata (Tsai y Frash, 1982).

9. Determinación de actividad emulsionante

La actividad emulsionante se determinó usando una versión modificada del método descrito por Cooper y Goldenberg, (1987).

Se tomaron 2 ml de las diferentes fracciones de cultivo y fueron mezcladas con idéntico volumen de *n*-hexadecano (Sigma-Aldrich) en tubos de 100 x 13 mm. Seguidamente se agitó la mezcla con vortex durante 60 s para homogenizar ambas fases y luego se dejó en reposo a 21 °C durante 24 h. Finalmente se midió a 1 h y a las 24 h, la altura de la emulsión de la fase emulsionante respecto a la altura total en milímetros (mm) y se calculó el %.

Por otra parte, se midió la habilidad de formar emulsiones aceite en agua, basado en la versión modificada del método descrito por Cirigliano y Carman, (1984). Se realizaron ensayos de

emulsión del liofilizado obtenido de *S. vesiculosa* M7^T, frente a los siguientes aceites comerciales: oliva (Borges, España), girasol (Borges, España) y maíz (Asua, España), así como *n*-hexadecano (Sigma-Aldrich).

Para ello se resuspendieron 8 mg del liofilizado en 40 ml en PBS y luego se tomaron 5 ml de muestra y se mezclaron con 0,8 ml del aceite a ensayar. Para la emulsión se utilizó el equipo Ultra Turrax (T10 basic Ultra Turrax, Ika) a velocidad 5 durante 50 s. Pasada 1 h se midió la absorbancia a 540 nm de la capa inferior resultante de la emulsión en el espectrofotómetro (PharmaSpec W-1700, Shimadzu). Como controles positivos fueron empleados la goma xantana (Sigma-Aldrich) y goma arábica (Sigma-Aldrich). Los experimentos se realizaron por triplicado para cada condición.

10. Determinación de tensión superficial

La tensión superficial se midió por el método del anillo, el cual está basado en el empleo del tensiómetro de Du Noüy (Lecomte du Noüy, 1919) que es el instrumento más usado para medir la tensión superficial e interfacial. Con este método se determinó la fuerza necesaria para separar un anillo de la superficie de un líquido, ya sea por estar el anillo suspendido del brazo de una balanza o utilizando un sistema de hilo torsión, para tener un ángulo de contacto cero y por lo tanto constante. Se utilizaron anillos de platino-iridio cuidadosamente limpios con alcohol y la medición se realizó tomando 25 ml del sobrenadante del cultivo que fueron previamente colocados en un cristalizador a temperatura ambiente 3 h antes de la medición, la cual se realizó en el tensiómetro (Digital Tensiometer K9, KRÜSS). El anillo se colocó levemente sumergido dentro de la solución y se toma la lectura dada en mNm^{-1} .

IV.RESULTADOS

IV.RESULTADOS

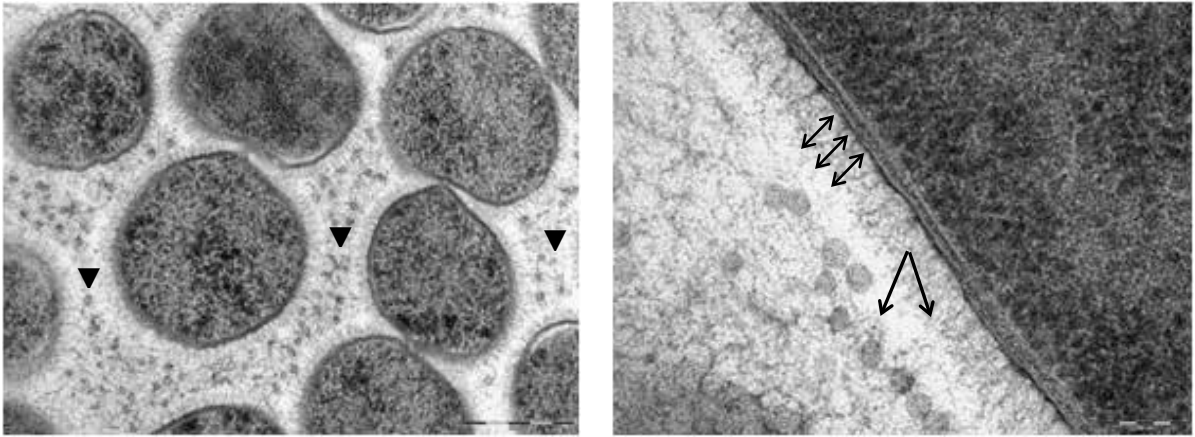
1. Estudio estructural de las bacterias de la Antártida adaptadas al frío y de sus EPS

Entre las características morfológicas macroscópicas de muchas de las cepas estudiadas por nuestro grupo y procedentes de la Antártida, destacó el aspecto mucoso de sus colonias al ser cultivadas en medio sólido. Este aspecto mucoso, está probablemente relacionado con la producción de gran cantidad de material extracelular (EPS) y por este motivo se creyó interesante realizar un estudio estructural de las bacterias y del EPS excretado. Para ello, se procedió al estudio mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) después de criofijación a alta presión y criosustitución (HPF-FS). Estas técnicas permiten una preservación de materiales altamente hidratados como son los exopolímeros, que raramente pueden ser observados después de un proceso de fijación química convencional.

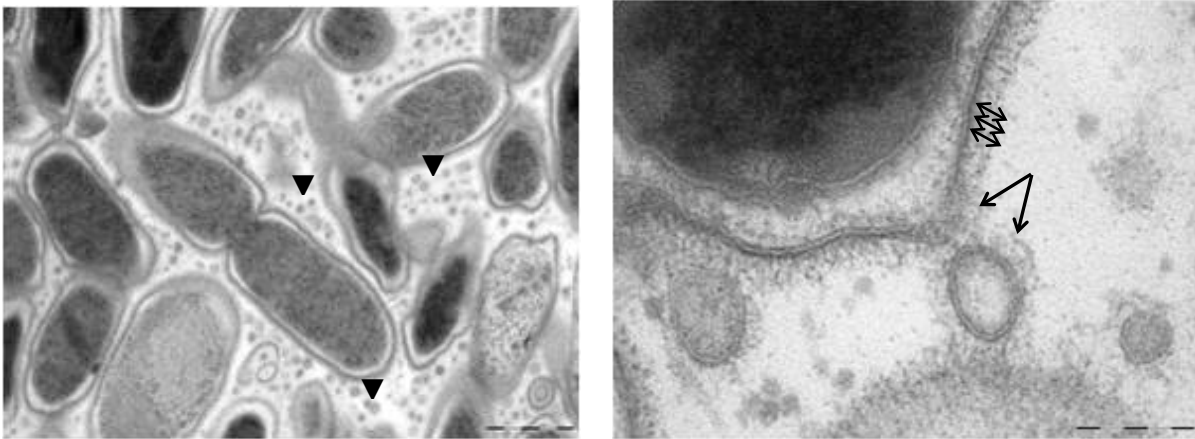
Las Figuras 4-I, 4-II y 4-III muestran las micrografías electrónicas de *S. livingstonensis* NF22^T, *S. vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4-2, *Marinobacter guineae* M3B^T, *Psychrobacter fozii* NF23^T y *Psychrobacter luti* NF11^T. Todas estas cepas, a excepción de la última, mostraron una gran cantidad de material extracelular secretado al medio externo. La superficie celular se mostró rodeada de un halo definido y bien organizado, que consistía en finas fibras dispuestas perpendicularmente a la pared de la célula (ver flechas de doble punta en Figura 4-I, 4-II y 4-III, imágenes de la derecha). El grosor de esta capa era variable, así como la longitud, disposición y distribución de estas fibras poliméricas según la cepa analizada.

De igual manera, destacaba la abundante presencia de estructuras esféricas distribuidas tanto alrededor de las células, como unidas a la membrana bacteriana, inmersas entre una red de fibras poliméricas que se extendían entre las células (ver puntas de flechas, Figura 4-I, 4-II y 4-III en imágenes de la izquierda y estructuras esféricas en imágenes de la derecha). Estas estructuras globulares presentaban diferentes tamaños que oscilaron entre 20 y 200 nm y estaban formadas por una bicapa lipídica con las mismas características que las observadas en la membrana externa, lo cual sugiere que provendrían de dicha membrana.

I



Shewanella livingstonensis NF22^T



Shewanella vesiculosa M7^T

Figura 4-I: Imágenes de MET de cortes ultrafinos de *Shewanella livingstonensis* NF22^T y *Shewanella vesiculosa* M7^T preparadas por HPF-FS. Las imágenes de la izquierda muestran una vista general de las células así como vesículas de membrana (ver puntas de flechas). Las imágenes de la derecha muestran una vista ampliada de las células rodeadas por un halo de fibras (flechas doble punta) y vesículas de membrana dispersas alrededor de las células. Las fibras también se observan alrededor de las vesículas y la membrana externa bacteriana (flechas). (Imágenes izquierda, Barras 200 nm) (Imágenes derecha, Barras 100 nm).

II

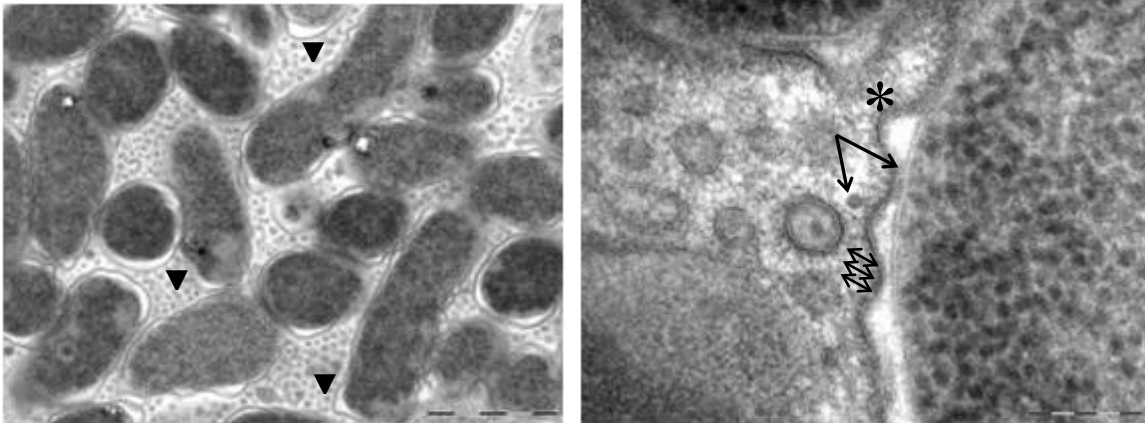
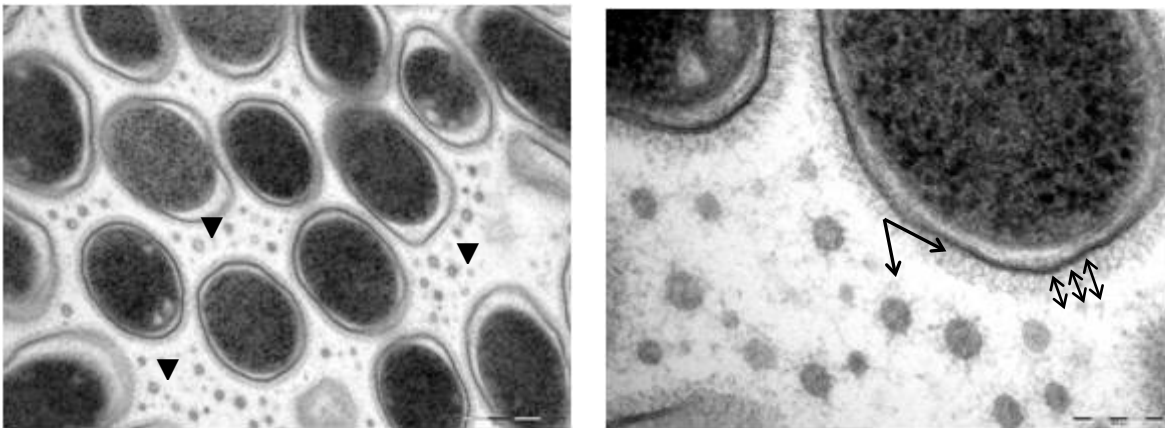
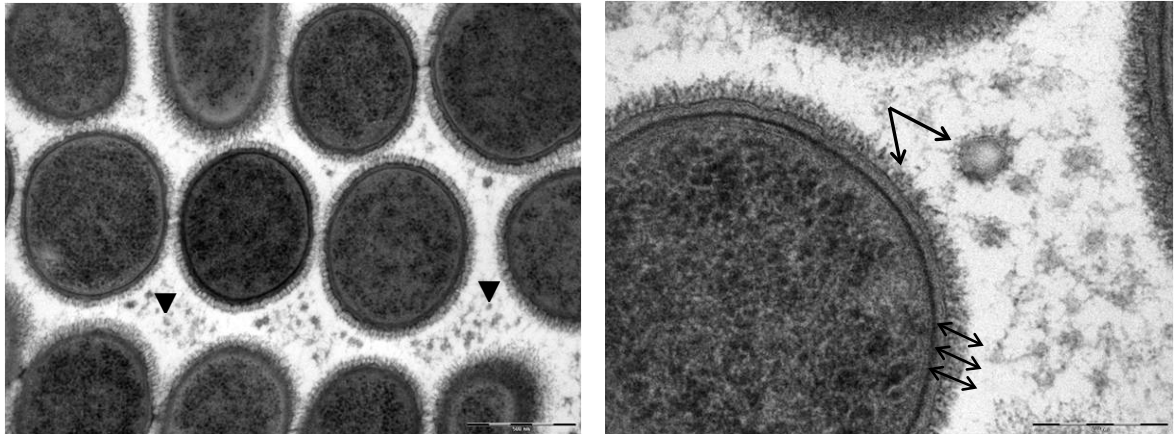
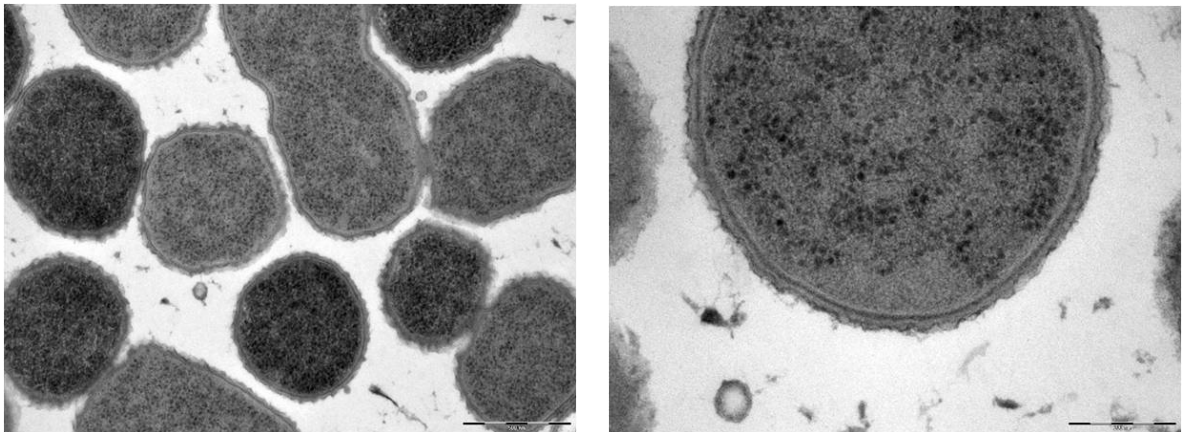
*Pseudoalteromonas* sp. M4-2*Marinobacter guineae* M3B^T

Figura 4-II: Imágenes de MET de cortes ultrafinos de *Pseudoalteromonas* sp. M4-2 y *Marinobacter guineae* M3B^T preparadas por HPF-FS. Las imágenes de la izquierda muestran una vista general de las células así como vesículas de membrana (ver puntas de flechas). Las imágenes de la derecha muestran una vista ampliada de las células rodeadas por un halo de fibras (flechas doble punta) y vesículas de membrana dispersas alrededor de las células. Las fibras también se observan alrededor de las vesículas y la membrana externa bacteriana (flechas). El asterisco marca una protuberancia en la membrana externa. (Imágenes izquierda, Barras 200 nm) (Imágenes derecha, Barras 100 nm).

III



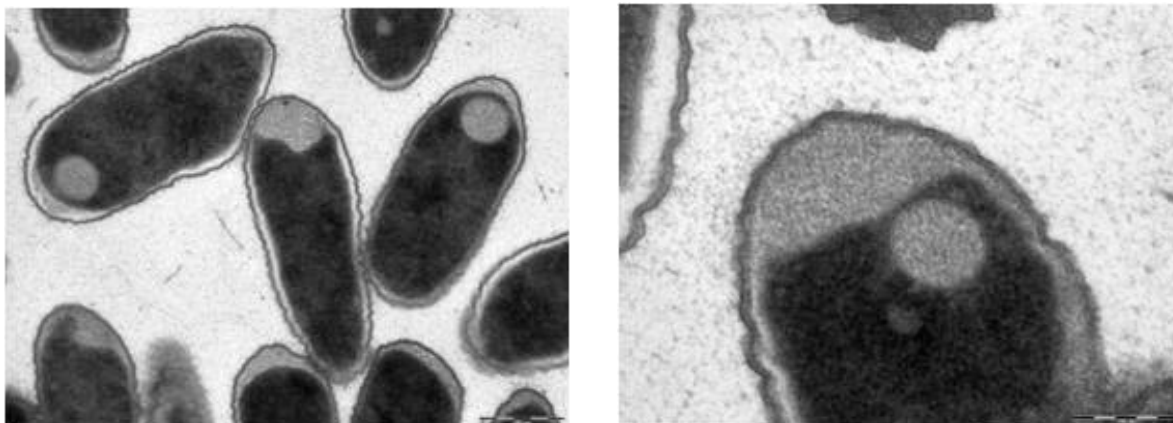
Psychrobacter fozii NF23^T



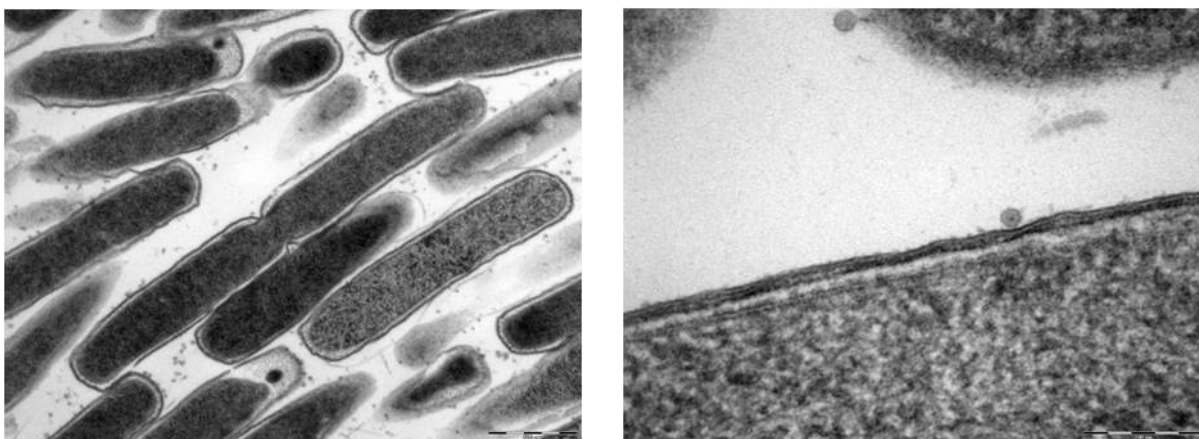
Psychrobacter luti NF11^T

Figura 4-III: Imágenes de MET de cortes ultrafinos de *Psychrobacter fozii* NF23^T y *Psychrobacter luti* NF11^T preparadas por HPF-FS. Las imágenes de la izquierda muestran una vista general de las células así como vesículas de membrana (ver puntas de flechas). Las imágenes de la derecha muestran una vista ampliada de las células. Para *Psychrobacter fozii* NF23^T las células están rodeadas por un halo de fibras (flechas doble punta) y vesículas de membrana dispersas alrededor de las células. Las fibras también se observan alrededor de las vesículas y la membrana externa bacteriana (flechas). (Imágenes izquierda, Barras 200 nm) (Imágenes derecha, Barras 100 nm).

IV



Pseudomonas deceptionensis M1^T



Pseudomonas guineae M8^T

Figura 4-IV: Imágenes de MET de cortes ultrafinos de bacterias adaptadas al frío preparadas por HPF-FS. Imágenes izquierda (Barra 200 nm), vista general de las células donde no se aprecian VME ni material exopolimérico. Imágenes derecha (Barra 100 nm) ampliación de las células.

En *Pseudoalteromonas* M4-2 (Figura 4-II, ver asterisco, imagen de la derecha) se pueden apreciar protuberancias de la membrana externa que podrían representar un primer paso en la formación de las VME. Es de destacar que las VME aparecen recubiertas por unas fibras similares a las observadas alrededor de las células bacterianas (ver flechas doble punta en Figuras 4-I, 4-II y 4-III) y que podrían ser arrastradas durante su proceso de formación.

En electroforesis SDS-PAGE realizadas a las VME de *S. vesiculosa* M7^T, seguidas de tinción de carbohidratos, se observó en la región superior de los geles, una banda que podría corresponder a material polisacárido capsular presente alrededor de las VME (Figura 5). Esto nos sugiere que estas fibras poliméricas adjuntas a la membrana externa también fueron incorporadas a las VME durante su formación.

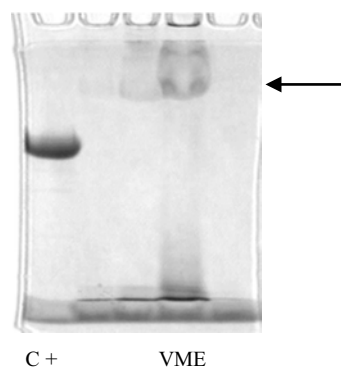


Figura 5: Tinción de glicoproteínas en gel de poliacrilamida con SDS, mostrando el perfil de las vesículas de membrana aisladas de *Shewanella vesiculosa* M7^T (VME). La flecha indica la banda teñida ligeramente que corresponde a azúcares. (C+) control positivo del Kit de glicoproteína GelCode®.

En el caso de la cepa *Pseudomonas deceptionensis* M1^T (Figura 4-IV), la naturaleza del material extracelular excretado parece distinto. Se observan grandes acúmulos intracelulares de un material con baja densidad al haz de electrones, que se va acumulando en inclusiones internas rodeadas de membrana, luego pasan al espacio periplasmático y posteriormente se libera al exterior. Cabe destacar que no se apreciaron vesículas de membrana en esta cepa, como tampoco se observó material exopolimérico en *P. guineae* M8^T (Figura 4-IV).

2. Caracterización de VME de bacterias de la Antártida adaptadas al frío

Para estudiar el origen y la naturaleza de las VME, se procedió a su aislamiento a partir de sobrenadantes de cultivos en medio TSB o Caldo Marino. Los cultivos se recogieron al final de la fase exponencial para evitar la presencia de vesículas o formaciones membranosas por lisis celular.

2.1 Obtención, tinciones negativas y perfil proteico de las VME

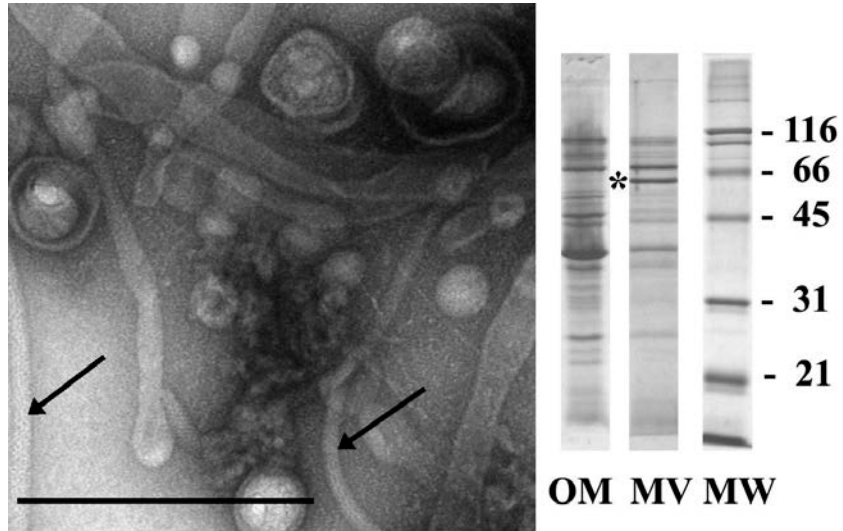
Una vez obtenidas las VME de cada cepa, se analizaron por microscopía electrónica mediante tinciones negativas. Asimismo, se determinó su contenido en proteínas y se comparó con el

contenido proteico de la membrana externa de las células, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS para poder determinar su origen. Para ello se escogieron cinco cepas de distintos géneros: *Shewanella vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4-2, *Marinobacter guineae* M3B^T, *Psychrobacter fozii* NF23^T y *Shewanella livingstonensis* NF 22^T.

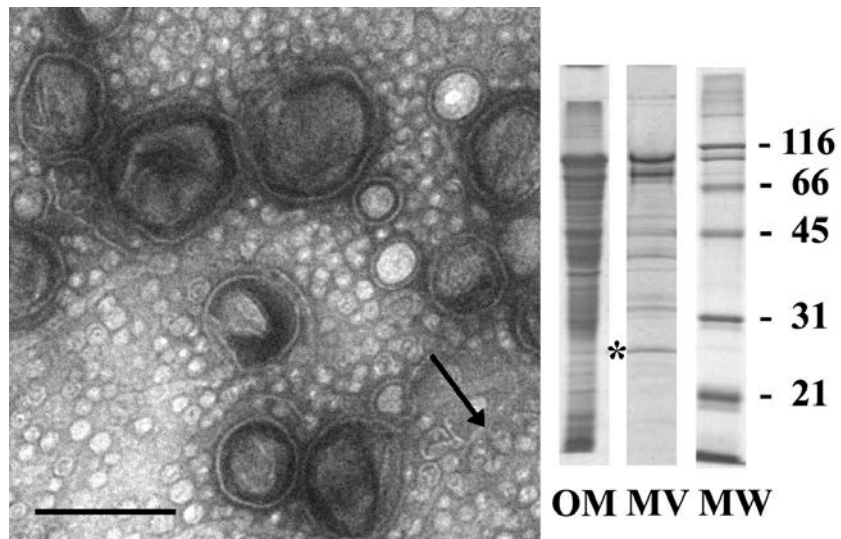
En la Figura 6 se muestran imágenes de MET de las VME aisladas de cada una de las 5 cepas estudiadas después de realizar tinciones negativas. En algunas de las preparaciones las VME se mostraron acompañadas por flagelos bacterianos (ver flechas) que sedimentan conjuntamente con las VME. El tamaño de las VME oscilaba entre 20 y 200 nm. También se muestran los perfiles electroforéticos de las VME (MV) y de la membrana externa (OM) de las diferentes cepas con el objetivo de comparar las proteínas presentes en ambas estructuras y determinar si las VME derivan como cabe esperar de la membrana externa bacteriana.

En estos geles fue relevante la presencia de bandas de proteínas en la fracción de VME, que migraron junto con proteínas que estaban presentes en la fracción de membrana externa, además en el perfil proteico de la membrana externa se detectaron proteínas adicionales que no estaban presentes en VME.

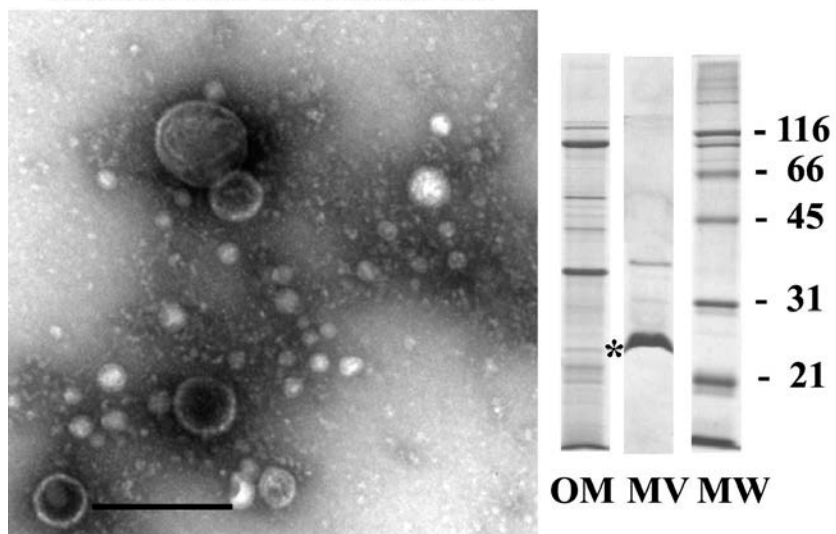
Para el caso de las cepas, *S. livingstonensis* NF22^T, *S. vesiculosa* M7^T y *Pseudoalteromonas* sp M4-2, se observaron bandas de proteínas sobreexpresadas sólo en la fracción de VME (ver asteriscos).



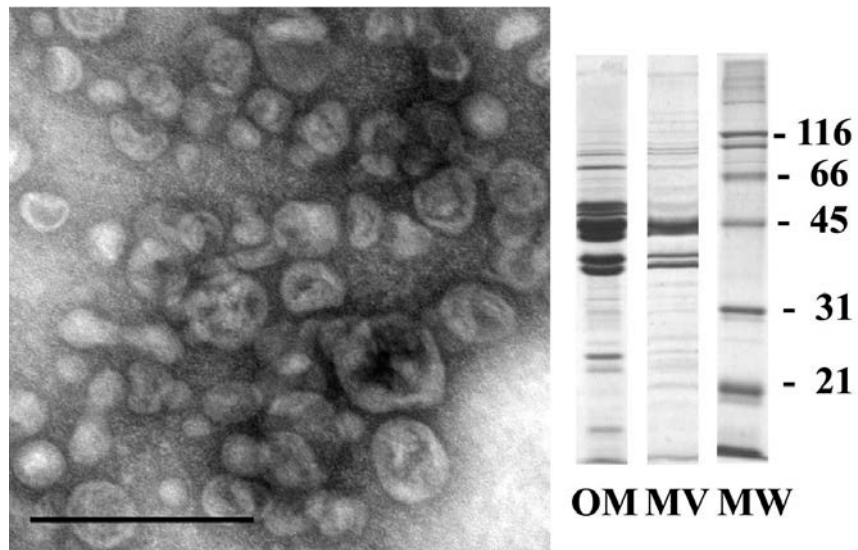
S. livingstonensis NF22



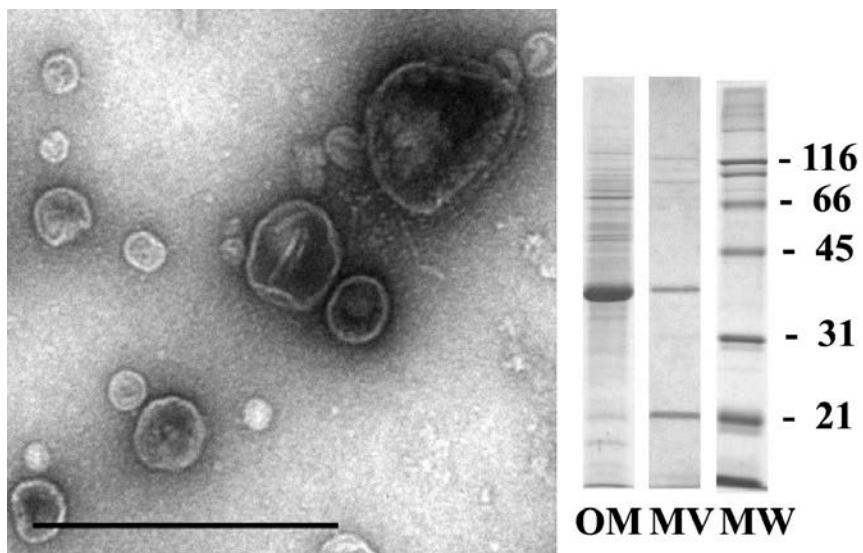
Shewanella vesiculosa M7



Pseudoalteromonas sp. M4.2



Psychrobacter fozii NF23



Marinobacter guineae M3B

Figura 6: Imágenes de MET de tinciones negativas de las VME de 5 cepas de la Antártida y perfil electroforético de las proteínas de VME y de la membrana externa, en geles de poliacrilamida (12%), teñidos con azul de Coomassie. (OM) (outer membrane)-Fracción de membrana externa. (MV) (membrane vesicles)-Fracción de vesículas de membrana. (MW)-Marcador de peso molecular expresado en kilodaltons (kDa). Los asteriscos indican polipéptidos que fueron sobreexpresados en la fracción de vesículas de membrana y las flechas indican flagelos. Barras 200 nm.

2.2 Influencia de la temperatura en las VME de *S. livingstonensis* NF22^T

La gran cantidad de vesículas de membrana detectada en estas cepas antárticas adaptadas al frío, hizo pensar que pudieran tener alguna relación con la adaptación a la temperatura de incubación. Para estudiar el efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de VME, se realizaron varios ensayos. Se determinó la influencia de la temperatura en la estructura de las VME, en la cantidad de VME producidas y en el tipo de proteínas contenidas en las VME. Seguidamente se muestran los resultados obtenidos.

2.2.1 Estudio estructural a diferentes temperaturas

El análisis estructural de las VME de la cepa *S. livingstonensis* NF22^T se realizó por MET mediante la observación de cortes ultrafinos obtenidos a partir de colonias crecidas en placas de TSA e incubadas a las temperaturas de 4, 10 y 18°C. Las colonias se sometieron a un proceso previo de criofijación a alta presión y criosustitución (HPF-FS) para preservar al máximo la estructura de las VME.

La Figura 7 muestra una imagen representativa de las VME producidas a cada una de las temperaturas estudiadas. La cepa *S. livingstonensis* NF22^T produjo VME a las tres temperaturas ensayadas, aunque varió el tamaño y distribución de las mismas. A 4 °C, las VME presentaron un tamaño muy regular, con diámetro medio de 26,6 nm (Tabla 3) y se distribuyeron uniformemente entre células. Además, se observaron claramente las finas fibras que rodeaban a las células, cuya longitud fue de 56,2 nm y dichas fibras también rodeaban las VME y formaban un entramado o red conteniendo las numerosas VME.

Similares resultados fueron observados a 10 °C, mientras que las mayores diferencias se obtuvieron a 18 °C. A esta temperatura se notó menor presencia de VME y además presentaron cambios en su morfología siendo de mayor tamaño y más irregulares, con un diámetro promedio de 40,2 nm (Figura 7, 18 °C) (Tabla 3). Por otra parte, a 18 °C también se observaron las finas fibras que rodeaban a las células, sólo que más difusas y delgadas en comparación a las obtenidas a bajas temperaturas (4 °C), con una longitud media de 22,4 nm. También se apreciaron células más alargadas de tipo filamentoso y la presencia de unas

estructuras vesiculares de mayor tamaño que el definido para VME (aproximadamente 500 nm) y que podrían corresponder a esferoplastos. Estas estructuras se mostraron junto a las células o independientes de los filamentos celulares (Figura 7, 18 °C, ver flecha).

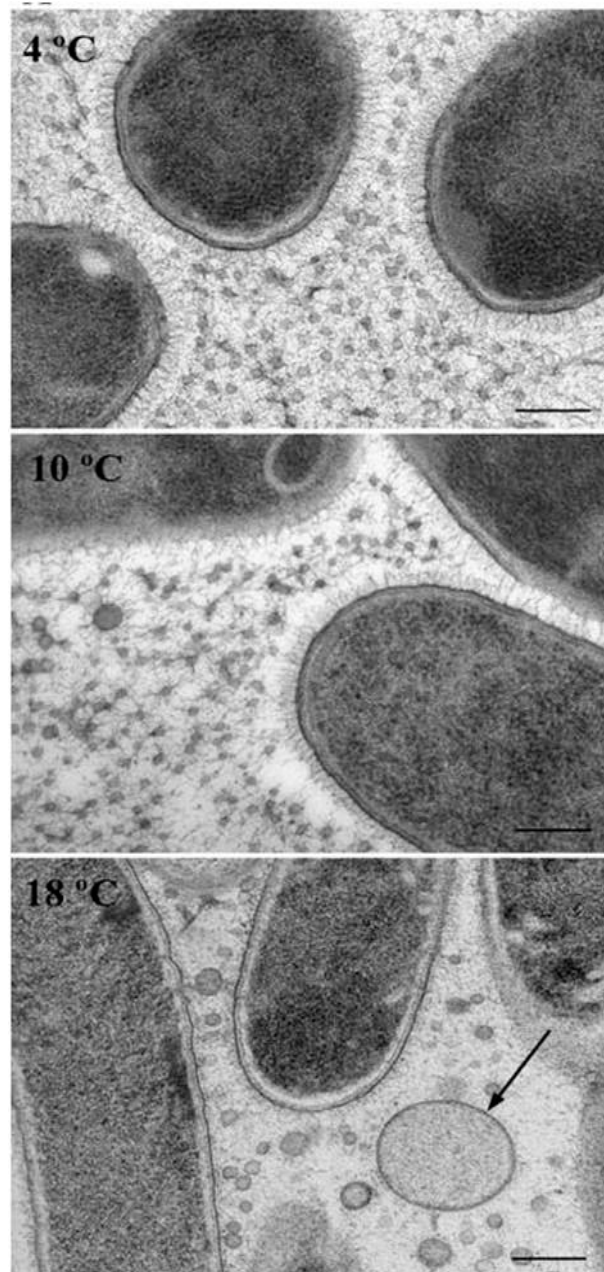


Figura 7: Imágenes de MET de cortes ultrafinos realizados a partir de colonias de *Shewanella livingstonensis* NF22^T crecida en TSA a diferentes temperatura de incubación y sometidas a un proceso de HPF-FS (Barras 200 nm). La flecha indica presencia de un esferoplasto.

Tabla 3. Dimensiones de las VME (diámetro en nm) y longitud de las fibras (nm) de *S. livingstonensis* NF22^T crecida en TSA a diferentes temperaturas de incubación.

| Temperaturas | Vesículas de Membrana | | | Fibra capsular | |
|--------------|-----------------------|---------------------|----------|----------------|---------------------|
| | Media (n=150) | Desviación estándar | Varianza | Media (n=60) | Desviación estándar |
| 4°C | 26.6 | 3.4 | 12.1 | 56.2 | 5.1 |
| 10°C | 27,6 | 3.9 | 15.4 | 53.0 | 7.2 |
| 18°C | 40.2 | 14.5 | 211.4 | 22.4 | 4.3 |

2.2.2 Cuantificación de las VME a distintas temperaturas

La cuantificación de VME de *S. livingstonensis* NF22^T, se realizó sobre las VME recogidas a partir de cultivos líquidos de TSB al final de la fase exponencial de crecimiento para evitar la lisis celular. La cuantificación se realizó de acuerdo al protocolo descrito por McBroom y colaboradores, (2006), utilizando el reactivo fluorescente FM4-64, que se une específicamente a membranas lipídicas. Los resultados se expresaron con el valor relativo de unidades de fluorescencia respecto al número total de células del cultivo del cual se obtuvieron las VME.

La Figura 8 muestra los valores alcanzados en la cuantificación de VME obtenidas a diferentes temperaturas. El mayor valor de VME se obtuvo a temperaturas bajas (4 °C) siendo aproximadamente de 100 UF/UFC. La cantidad de VME producida por *S. livingstonensis* NF22^T fue disminuyendo al aumentar la temperatura aunque las diferencias registradas no fueron significativas en los dos ensayos realizados.

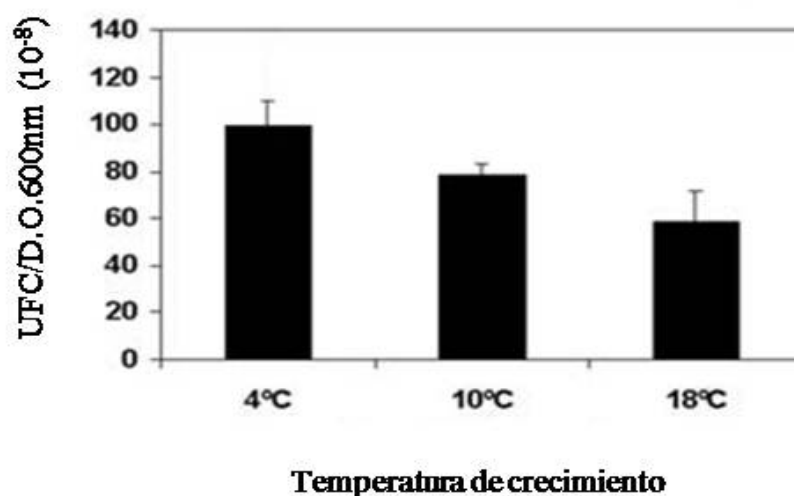


Figura 8: Diagrama de cuantificación de VME de *S. livingstonensis* NF22^T obtenidas a partir de cultivos en TSB a diferentes temperaturas. La producción de VME se ha calculado dividiendo la fluorescencia (UF) por las unidades formadoras de colonias (UFC) (n=2).

2.2.3 Análisis del contenido proteico de las VME

La Figura 9 muestra el perfil electroforético de las proteínas de VME de *S. livingstonensis* NF22^T, producidas a diferentes temperaturas.

El perfil de las VME reveló la presencia de 10 bandas proteicas principales con pesos moleculares de 109 kDa, 81 kDa, 66 kDa, 55 kDa, 48 kDa, 44 kDa, 42 kDa, 34 kDa, 32 kDa y 24 kDa.

En el análisis del gel destacó la presencia de al menos 3 bandas de proteínas correspondientes a 55 kDa, 34 kDa y 24 kDa (ver flechas en Figura 9), que se sobreexpresaron a 4 y 10 °C, en comparación con las obtenidas a 18 °C. Se pudo comprobar que las bandas con peso molecular de 34 kDa correspondían a proteína flagelar, ya que quedó eliminada de la fracción de VME después de purificar las VME mediante ultracentrifugación en experimentos posteriores.

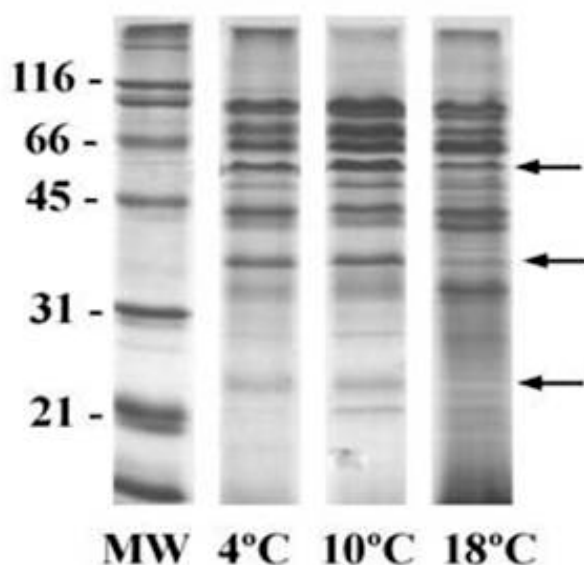


Figura 9: Comparación de los perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida con SDS de las proteínas presentes en VME de *S. livingstonensis* NF22^T producidas en medio TSB a 4, 10 y 18 °C. (MW) marcador de peso molecular en kilodaltons. Las flechas indican las proteínas sobreexpresadas a bajas temperaturas.

2.2.4 Composición de ácidos grasos de VME

La determinación de ácidos grasos en las diferentes fracciones procedentes del cultivo de *S. vesiculosa* M7^T se realizó mediante cromatografía de gases.

La Tabla 4 muestra las variaciones cuantitativas de los principales ácidos grasos encontrados en células y VME obtenidas de la cepa M7^T. En la fracción celular se observaron los descritos previamente en la caracterización taxonómica de la cepa *S. vesiculosa* M7^T, destacando la presencia de ácidos grasos mayoritarios como el Summed Feature 3 (C_{16:1 w7c} y/o iso-C_{15:0 2-OH}) con (21,10%); el C_{13:0 iso} (12,42%); el C_{15:0 iso} (10,91%); el ácido hexadecanoico (C_{16:0}) (8,59%); heptadecenoico (C_{17:1 w8c}) (7,15%) y el ácido pentadecanoico (C_{15:0}) (6,27%).

Tabla 4: Cantidades relativas de ácidos grasos (%) presentes en células y VME de *Shewanella vesiculosa* M7^T

| Ácidos grasos | Células | VME |
|---------------------------|---------|-------|
| C _{12:0} | 3.12 | 6.41 |
| C _{12:0} 3OH | 4.23 | - |
| C _{13:0} | 1.81 | - |
| C _{13:0} ISO | 12.42 | 17.15 |
| C _{13:0} ISO 3OH | 3.78 | 7.15 |
| C _{14:0} | 5.33 | 4.04 |
| C _{15:0} | 6.27 | 6.72 |
| C _{15:0} ISO | 10.91 | 12.92 |
| C _{15:1} w6c | 1.27 | - |
| C _{16:0} | 8.59 | 11.35 |
| C _{17:0} | 3.80 | 3.31 |
| C _{17:1} w8c | 7.15 | 4.80 |
| C _{18:1} w9c | 1.44 | - |
| C _{18:1} w7c | 1.02 | - |
| Summed Feature 2* | 1.18 | - |
| Summed Feature 3** | 21.10 | 23.06 |
| Desconocido 12.484 | - | - |

* Summed Feature 2 contiene C_{14:0} 3-OH y/o C_{16:1} ISO y ** Summed Feature 3 contiene C_{16:1} w7c y/o C_{15:0} ISO 2-OH, (son grupos de ácidos grasos que no pueden ser separados por cromatografía gaseosa).

Cabe señalar que los ácidos grasos mayoritarios en células también están presentes con poca variación cuantitativa en la fracción de las VME aisladas. Esta similitud en la composición de ambas fracciones es debido al origen de estas estructuras que provienen de membrana externa y en su formación arrastran compuestos propios de las células.

2.2.5 Estudio proteómico de las VME de *S. livingstonensis* NF22^T a diferentes temperaturas

Para identificar las principales proteínas que conforman las VME de *S. livingstonensis* NF22^T y poder determinar su relación con las bajas temperaturas, se realizó un estudio proteómico de las mismas. Se escogieron VME producidas a 4 y 16 °C, las cuales fueron aisladas de los sobrenadantes de los cultivos en TSB según lo comentado anteriormente en Materiales y Métodos, mediante un proceso de centrifugación a alta velocidad. Posteriormente, las VME fueron purificadas mediante ultracentrifugación en gradiente de Optiprep® para eliminar posibles contaminantes como los flagelos.

Una vez purificadas, las VME fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturalizantes de una dimensión (1D-SDS-PAGE 12,5%). Las principales bandas cortadas del gel, fueron digeridas con tripsina y los péptidos fueron separados en un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF, Micromass-Waters). Los datos se generaron en formato PKL y se realizó la búsqueda con el buscador MASCOT utilizando las base de datos NCBI/all y NCBI/Bacterias.

Tal como se observa en la Figura 10A, tanto a 4 °C como a 16 °C se pudieron visualizar al menos 10 bandas de proteínas después de tinción con azul de Coomassie. De forma general, el patrón de bandas proteicas fue similar para ambas condiciones. Sin embargo, fueron observadas variaciones en la expresión de algunas bandas en función de la temperatura. A 4 °C, se observó un ligero incremento en las bandas de proteínas marcadas con los números 3, 8 y 10 (ver círculos rojos en Figura 10A), mientras que las bandas 2, 5, 7 y 9, fueron sobreexpresadas a 16 °C (ver círculos azules en Figura 10A).

En la Figura 10B se muestran imágenes de MET de las VME después de tinción negativa. Como ya se había observado en las imágenes de MET de los cortes ultrafinos, las VME corresponden a esferas lipídicas con tamaños variables que oscilan entre los 20 y 150 nm. En este caso las VME han sido producidas en medio líquido y los tamaños de las VME obtenidas a 4 °C parecen ser mayores y más variables que los observados en cortes de colonias crecidas en TSA a la misma temperatura.

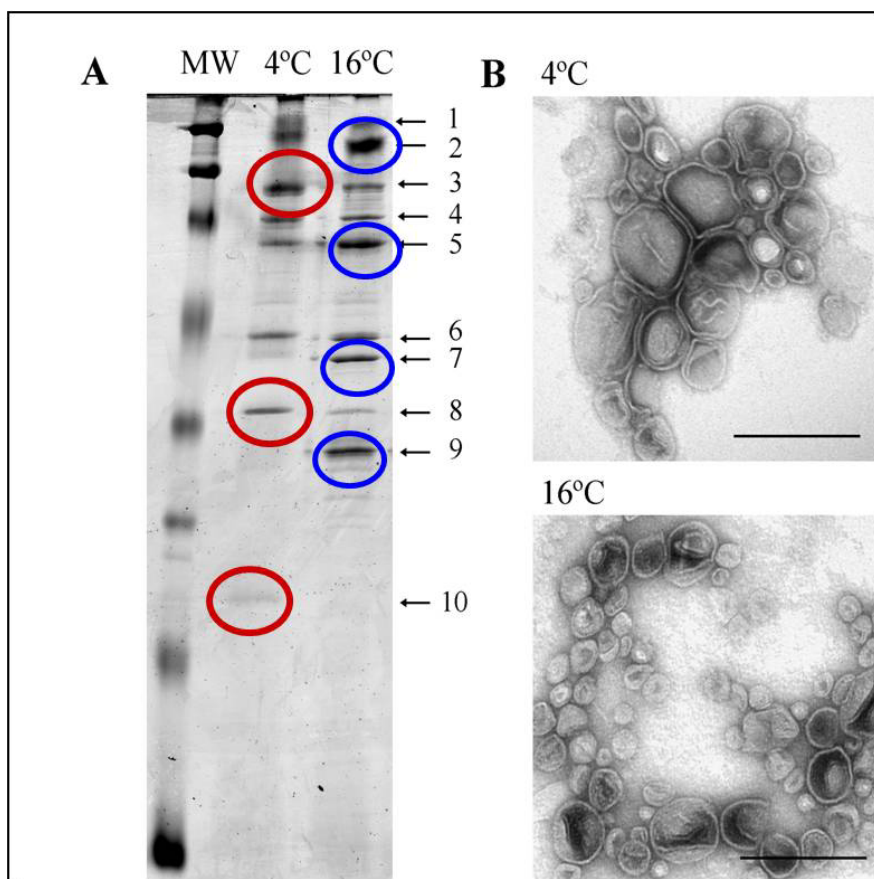


Figura 10: A) Perfil electroforético en gel 1D SDS-PAGE, de las proteínas presentes en VME aisladas de *S. livingstonensis* NF 22^T. Peso molecular (MW) en kilodaltons (kDa). Los números a la derecha indican las principales bandas proteicas cortadas del gel para realizar el análisis proteómico. B) Micrografías por tinción negativa realizadas a las VME a diferentes temperaturas. Barras 200 nm.

En la Tabla 5 se detallan las proteínas identificadas en VME de *S. livingstonensis* NF22^T. Destacan la presencia de proteínas de membrana externa involucradas en procesos celulares, como los receptores TonB dependientes, porinas, proteínas de secreción tipo I y lipoproteínas. A la temperatura más elevada fueron identificadas diferentes proteínas de membrana externa involucradas en procesos metabólicos, así como en la degradación de compuestos aromáticos y en el transporte de ácidos grasos de cadena larga. Además, se observaron abundantes proteínas periplásmicas, incluyendo precursores periplasmáticos bifuncionales con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa y el precursor de proteína periplasmática de unión a fosfato. También fue identificada una sola proteína citoplasmática que correspondió al factor de elongación-traslación GTPasa, así como la presencia de algunas proteínas todavía sin caracterizar.

Por otra parte, las bandas ligeramente sobreexpresadas a 4 °C correspondieron a proteínas homólogas de receptores TonB dependientes, porinas, precursores de proteínas periplasmática de unión fosfato, una proteína conteniendo el dominio peptidasa M16, además de una lipoproteína I de membrana externa y una proteína homóloga de una proteína presuntamente de *Shewanella frigidimarina* (Sfri_3402).

Tabla 5: Proteínas de las VME de *Shewanella livingstonensis* NF22^T identificadas a partir de un gel de electroforesis monodimensional.

| *Banda no. | Descripción | Número Acceso | Valor Mowse | Cobertura (%) | Péptidos coincidentes | Especies |
|------------|--|---------------|-------------|---------------|-----------------------|---|
| 1 | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563586 | 207>53 | 5 | 8 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 1120598453 | 185>53 | 3 | 4 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563641 | 176>53 | 3 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114561796 | 135>53 | 4 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| | Precursor periplasmáticos bifuncional con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa | gi 91793491 | 112>53 | 4 | 2 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Proteína hipotética Sfri 2571 | gi 114563737 | 101>53 | 3 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| | Precursor periplasmático bifuncional con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa | gi 15642173 | 94>53 | 3 | 2 | <i>Vibrio cholerae</i> N16961 |
| | Precursor periplasmático bifuncional con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa | gi 149192364 | 94>53 | 3 | 2 | <i>Vibrio shilonii</i> AK1 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 170726911 | 66>53 | 2 | 2 | <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 |
| | Proteína hipotética Sputw3181_1613 | gi 120598430 | 53>53 | 2 | 2 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 |
| 2 | Precursor periplasmático bifuncional con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa | gi 91793491 | 230>53 | 7 | 8 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Precursor periplasmático bifuncional con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa | gi 114563480 | 193>53 | 8 | 5 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Precursor periplasmático bifuncional con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa | gi 15642173 | 148>53 | 3 | 3 | <i>Vibrio cholerae</i> N16961 |
| | Precursor periplasmático bifuncional con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa | gi 149192364 | 148>53 | 3 | 3 | <i>Vibrio shilonii</i> AK1 |
| | Proteína de canal iónico mecanosensible MscS | gi 92115219 | 54>53 | 1 | 1 | <i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043 |
| | Hidrolasa UDP-azúcar | gi 119468684 | 54>53 | 1 | 1 | <i>Alteromonadales bacterium</i> TW-7 |
| | Transportador putativo | gi 26989506 | 53>53 | 1 | 2 | <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 |
| 3 | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563586 | 334>52 | 10 | 9 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563641 | 297>52 | 5 | 6 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 109899987 | 133>52 | 2 | 2 | <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114561796 | 132>52 | 2 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 120598453 | 120>52 | 2 | 4 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563610 | 89>52 | 1 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |

| | | | | | | |
|----|--|--------------|--------|----|----|---|
| | Peptidasa, familia M16 | gi 114562249 | 68>52 | 1 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Receptor de membrana externa | gi 229240126 | 61>52 | 1 | 1 | <i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588 |
| 4 | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 114565192 | 392>52 | 15 | 7 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 120600832 | 348>52 | 12 | 8 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 |
| | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 114564869 | 254>52 | 7 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 117922558 | 234>52 | 11 | 7 | <i>Shewanella</i> sp. ANA-3 |
| | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 114564386 | 147>52 | 3 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Factor de elongación-traslación GTPasa | gi 149773203 | 57>52 | 4 | 1 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| 6 | Porina O y P, selectiva a fosfato | gi 114565185 | 421>53 | 24 | 11 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Porina O y P, selectiva a fosfato | gi 91792000 | 198>53 | 16 | 6 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Proteína, familia TolB | gi 114562639 | 95>53 | 7 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína TolB | gi 91792752 | 69>53 | 7 | 3 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Reductasa 7-ciano-7-deazaguanina | gi 119899798 | 65>53 | 2 | 1 | <i>Azoarcus</i> sp. BH72 |
| 7 | Proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga | gi 149675710 | 185>53 | 14 | 5 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Proteína de secreción de membrana externa Tipo I, familia TolC | gi 219806612 | 159>53 | 12 | 5 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Porina O y P, selectiva a fosfato | gi 114565185 | 136>53 | 6 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína reguladora de hierro | gi 164454447 | 124>53 | 6 | 2 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Proteína de canal de membrana externa | gi 164454447 | 121>53 | 9 | 4 | <i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3 |
| | Proteína de secreción de membrana externa Tipo I, familia TolC | gi 164454447 | 121>53 | 10 | 4 | <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 |
| | Porina O y P, selectiva a fosfato | gi 91792000 | 70>53 | 2 | 1 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Proteína hipotética | gi 149773199 | 63>53 | 5 | 2 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Lipoproteína putativa | gi 91792084 | 52>53 | 2 | 1 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Proteína PilZ ensamblaje a pilus Tipo IV | gi 91792394 | 51>53 | 1 | 1 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| 8 | Porina | gi 114561689 | 690>52 | 40 | 23 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína periplasmática de unión fosfato | gi 33592211 | 124>52 | 15 | 5 | <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I |
| | Proteína periplasmática de unión fosfato | gi 163857838 | 121>52 | 14 | 5 | <i>Bordetella petrii</i> DSM 12804 |
| | Lipoproteína I de membrana externa | gi 3201826 | 52>52 | 13 | 1 | <i>Pseudomonas oleovorans</i> |
| 9 | Proteína de membrana involucrada en la degradación de hidrocarburos aromáticos | gi 114564966 | 90>62 | 5 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 10 | Proteína hipotética Sfri 3402 | gi 114564563 | 129>53 | 18 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |

Valores individuales >n indican identidad u homología ($p < 0,05$)

* Números de banda están indicados en la Figura 10A

2.2.6 Estudio proteómico de las VME de *S. vesiculosa* M7^T

Para identificar las principales proteínas presentes en las VME de *S. vesiculosa* M7^T y determinar si la temperatura influía en el contenido proteico de las mismas, se realizó un estudio proteómico. Para ello, se procedió a la purificación de las VME mediante gradientes de Optiprep® y posterior ultracentrifugación. Se recogieron fracciones de 1-2 ml del gradiente correspondiente a las muestras de VME obtenidas a 4 y 16 °C y fueron visualizadas por electroforesis SDS-PAGE, tal como se observan en la Figura 11A, 11B (4 °C) y Figura 12A y 12B (16 °C). Las fracciones de VME que presentaban el mismo perfil electroforético se unieron (fracciones 3-7 y fracciones 10-13) y fueron dializadas y concentradas para realizar el

estudio proteómico a partir de geles 1D-SDS-PAGE. Se realizó una observación al microscopio electrónico después de tinción negativa para observar el contenido de las fracciones unidas. Efectivamente las fracciones 3-7 correspondían a VME (Figura 11C y Figura 12C), mientras en las fracciones 10-13 se visualizaba un gran contenido de flagelos (Figura 11D y Figura 12D), por lo que para el estudio proteómico se tomó el conjunto de las fracciones 3-7.

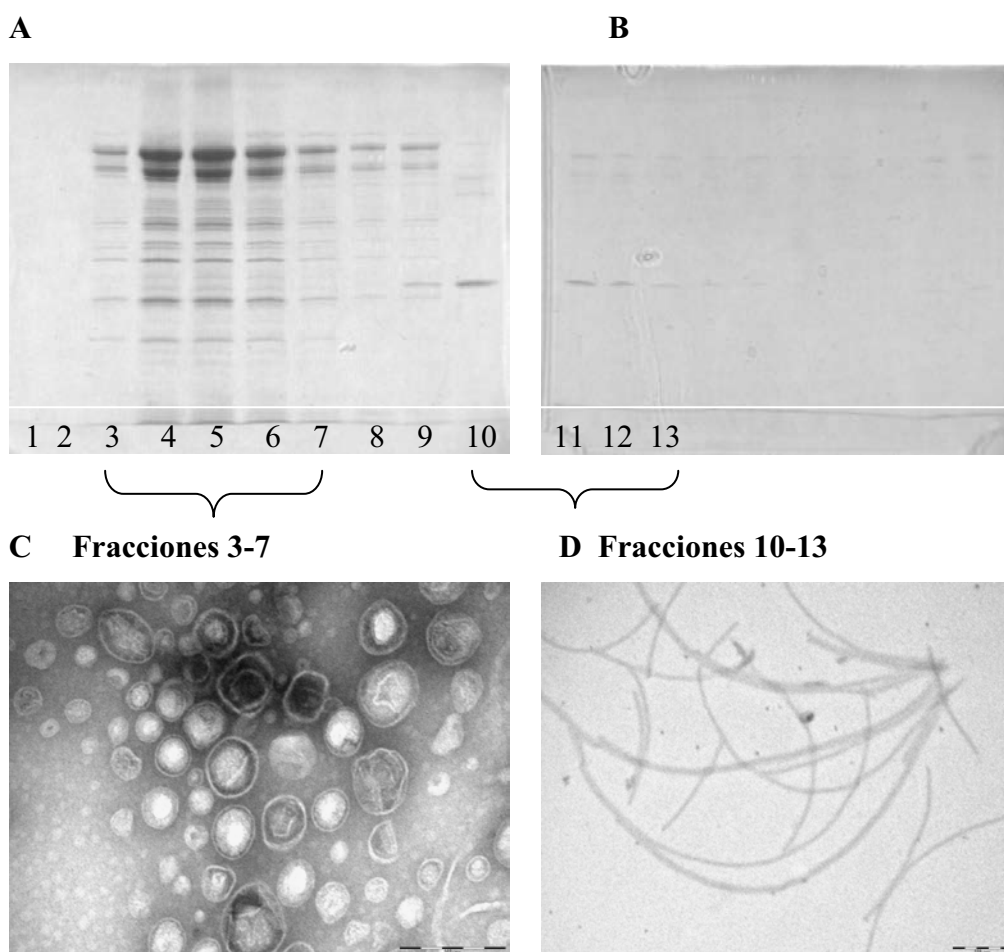


Figura 11: (A-B) Perfiles electroforéticos en geles SDS-PAGE de las fracciones de VME de *S. vesiculosa* M7^T obtenidas a 4 °C y separadas del gradiente de Optiprep®. (C-D) Imágenes de MET de tinciones negativas de las fracciones que se indican después de unir las, dializarlas y concentrarlas.

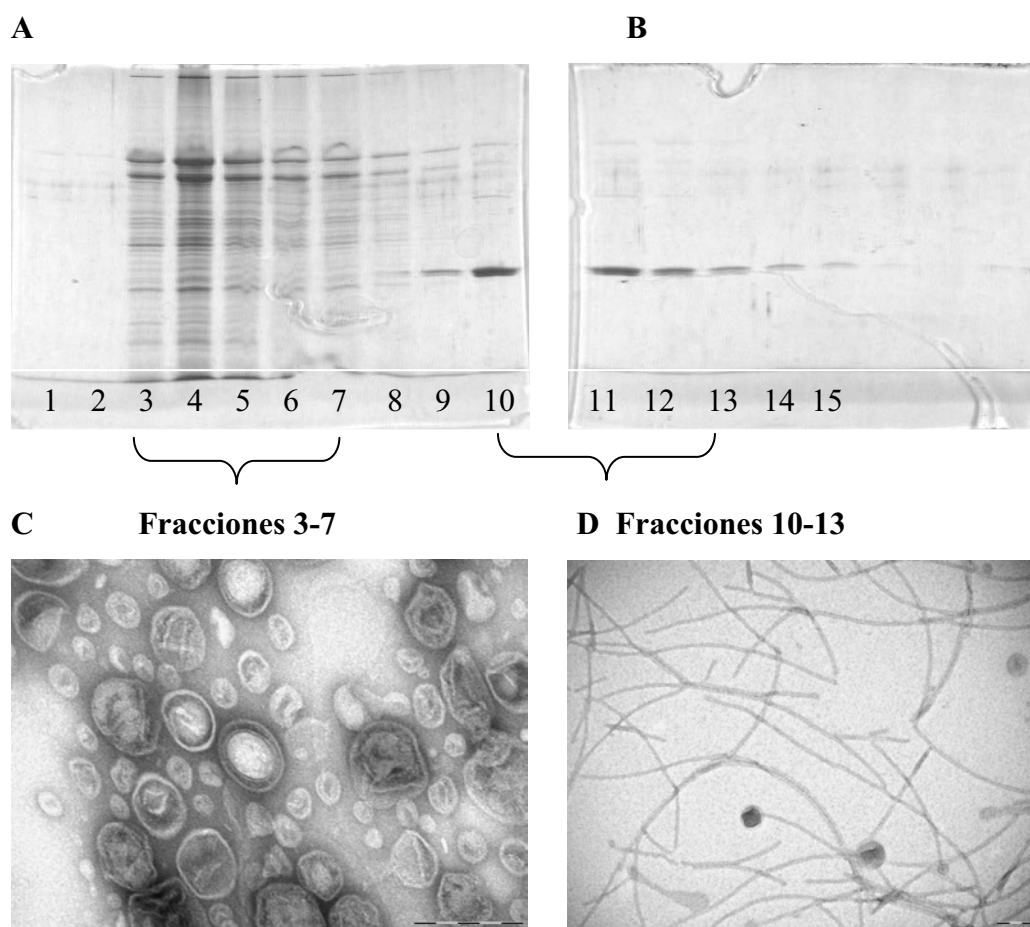


Figura 12: (A-B). Perfiles electroforéticos en geles SDS-PAGE de las fracciones de VME de *S. vesiculosa* M7^T obtenidas a 16 °C y separadas del gradiente de Optiprep®. (C-D) Imágenes de MET de tinciones negativas de las fracciones que se indican después de unir las, dializarlas y concentrarlas.

A partir de las vesículas purificadas obtenidas a ambas temperaturas se realizó un gel monodimensional SDS-PAGE cuya imagen se muestra en la Figura 13. Se cortaron diferentes fracciones (indicadas con recuadros y números), que fueron digeridas con tripsina y los péptidos obtenidos se separaron e identificaron utilizando un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF). Los datos obtenidos se generaron en formato PKL y con estos ficheros se realizó la búsqueda en MASCOT. Utilizando las bases de datos NCBI/all y NCNI/Bacteria.

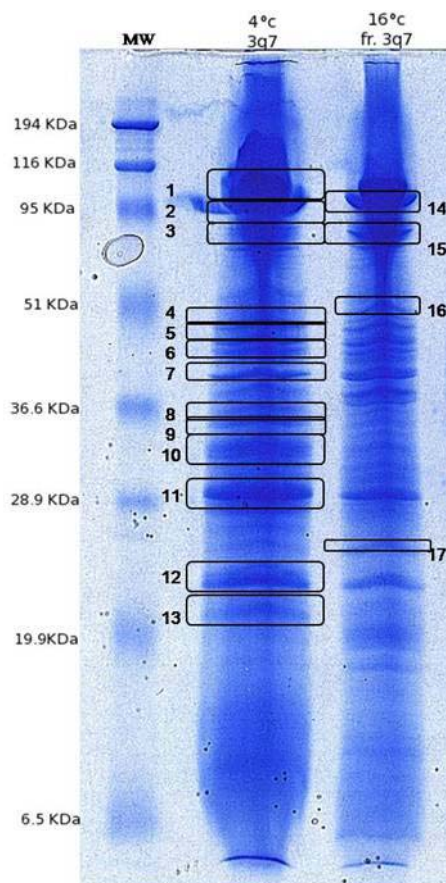


Figura 13: Gel de electroforesis monodimensional de las proteínas presentes en las fracciones purificadas de las VME de *S. vesiculosa* M7^T aisladas a diferentes temperaturas. Los números indican los cortes realizados al gel para obtener las bandas que luego se tripsinizaron y con las que se realizó el análisis proteómico. (MW) Marcador de peso molecular.

Los perfiles electroforéticos de las VME obtenidas a 4 y 16 °C fueron similares y aunque algunas fracciones (secciones 1, 10, 11, 12 y 13) parecen ligeramente sobreexpresadas a 4 °C, resulta difícil poder afirmar cuáles de las proteínas contenidas en dichas bandas pueden estar sobreexpresadas a bajas temperaturas.

En general, se obtuvieron buenos espectros de masas para la mayoría de las muestras. Algunos de ellos, no dieron resultados en la identificación, ya que no se dispone aún de la secuencia del genoma de *S. vesiculosa* M7^T. Cada fracción cortada del gel estaba formada por una mezcla de proteínas cuya descripción se muestra en la Tabla 6.

Debido a la falta de genes secuenciados en *S. vesiculosa* M7^T, se realizó una comparación de la huella peptídica entre especies para identificar las proteínas presentes en las VME. Las proteínas presuntamente identificadas fueron principalmente proteínas de membrana externa

implicadas en varios procesos celulares, como proteínas del complejo receptor dependiente de TonB, de receptores sideróforos dependientes de TonB, proteínas de secreción de membrana externa Tipo I, de la familia TolC, porinas, proteínas involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos y proteínas transportadoras de ácidos grasos de cadena larga. Además se detectaron proteínas presentes en membrana externa como la OmpA, proteínas asociadas a canales en la membrana externa y otras específicas de canales para nucleósidos así como proteínas transportadoras de los mismos. Destacan la presencia de peptidasas, citocromo c oxidasa, ATP sintasa y proteínas receptora de la familia hemo/hemoglobina dependiente de TonB. También se detectaron proteínas de periplasma principalmente proteasas. Asimismo, se detectaron proteínas poco caracterizadas y de función desconocida.

Tabla 6: Proteínas presentes en las VME de *Shewanella vesiculosa* M7^T identificadas a partir de un gel de electroforesis monodimensional.

| Banda* No. | Descripción | Número Acceso | Valor Mowse | Cobertura (%) | Péptidos coincidentes | Especies |
|------------|--|---------------|-------------|---------------|-----------------------|---|
| 1 | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563586 | 181>54 | 4 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| 2 | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 114565192 | 224 > 53 | 5 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 114565001 | 174> 53 | 6 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB, plug | gi 117921820 | 99> 53 | 1 | 1 | <i>Shewanella</i> sp. ANA-3 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114565138 | 92> 53 | 2 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563794 | 81> 53 | 2 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 120600832 | 75> 53 | 2 | 1 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 |
| | Proteína hipotética Ssed_1693 | gi 157374832 | 69> 53 | 1 | 1 | <i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3 |
| 3 | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563794 | 232> 54 | 5 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína hipotética Sfri_2225 | gi 114563396 | 169> 54 | 9 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563586 | 131> 4 | 2 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína hipotética Sfri_0573 | gi 114561759 | 74> 54 | 3 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 4 | Porina O y P, selectiva a fosfato | gi 114565185 | 313> 54 | 16 | 6 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114562015 | 111>54 | 3 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 294142208 | 88>54 | 2 | 1 | <i>Shewanella violacea</i> DSS12 |
| | Amino peptidasa putativa dependiente de Zn ²⁺ | gi 196158828 | 68>54 | 1 | 1 | <i>Alteromonas macleodii</i> "Deep ecotype" |
| | Antígeno de superficie (D15) | gi 114562456 | 64>54 | 6 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563794 | 57>54 | 1 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |

Resultados

| | | | | | | |
|----|--|--------------|--------|----|----|---|
| 5 | Proteína hipotética Sfri_1465 | gi 114562642 | 173>54 | 10 | 8 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteasa DO | gi 114564523 | 79>54 | 6 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Porina | gi 157373416 | 63>54 | 8 | 3 | <i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3 |
| 6 | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 126176544 | 131>54 | 2 | 2 | <i>Shewanella baltica</i> OS155 |
| | Proteína de membrana involucrada en la degradación de hidrocarburos aromáticos | gi 114563852 | 131>54 | 5 | 10 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína de canal de membrana externa | gi 114564493 | 99>54 | 3 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114563641 | 67>54 | 2 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Porina O y P selectiva a fosfato | gi 11456518 | 62>54 | 2 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 7 | Porina hipotética Sfri_1465 | gi 219806616 | 274>53 | 13 | 6 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Peptidasa M28 | gi 114564059 | 103>53 | 5 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 8 | Porina | gi 114561689 | 526>54 | 32 | 10 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 304412684 | 147>54 | 5 | 4 | <i>Shewanella baltica</i> OS183 |
| | OmpA/MotB | gi 114564063 | 106>54 | 2 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 9 | Receptor de sideróforos dependiente de TonB | gi 114565192 | 107>52 | 2 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 114561796 | 85>52 | 1 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Transportador de nucleósidos | gi 114562178 | 71>52 | 5 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Oligopeptidasa proil peptidasa S9 | gi 114563326 | 63>52 | 3 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Citocromo C oxidasa, tipo cbb3, subunidad III | gi 114563184 | 61>52 | 13 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 10 | Porina | gi 114561689 | 566>54 | 33 | 9 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 167623853 | 171>54 | 4 | 2 | <i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB | gi 170726911 | 124>54 | 4 | 2 | <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 |
| 11 | Proteína de membrana externa | gi 66275662 | 85>55 | 6 | 2 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
| | Proteína formadora de canal específico para nucleósidos, Tsx | gi 114562179 | 85>55 | 6 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 12 | Proteína de la familia de receptores hemo/hemoglobina dependiente de TonB | gi 170728329 | 91>54 | 3 | 2 | <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 |
| | Proteína integral de membrana | gi 21224702 | 56>54 | 2 | 2 | <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) |
| 13 | OmpA/MotB | gi 114562640 | 61>53 | 12 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 14 | Proteína de la familia de receptores hemo/hemoglobina dependiente de TonB | gi 120599996 | 161>54 | 4 | 2 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 |
| | Proteína receptora dependiente de TonB, plug | gi 114562004 | 105>54 | 2 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |

| | | | | | | |
|----|---|--------------|--------|----|---|--|
| 15 | Proteína de secreción de membrana externa Tipo I, familia TolC | gi114561620 | 184>51 | 6 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| | Proteína translocadora Na(+)-NADH-quinona reductasa subunidad A | gi 114562127 | 116>51 | 7 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| | Proteína hipotética Sfri_2224 | gi114563395 | 107>51 | 4 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |
| 16 | OmpA | gi 114564063 | 70>51 | 3 | 1 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| 17 | Proteína hipotética Sfri_2626 | gi 114563792 | 222>52 | 19 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIM400 |
| | F0F1 ATP sintasa, subunidad delta | gi 114565198 | 130>52 | 14 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 |

Valores individuales $>n$ indican identidad u homología ($p<0,05$)

* Números de las bandas de acuerdo a lo indicado en la Figura 13.

3. Cribado para detectar actividad emulsionante en cultivos de bacterias de la Antártida adaptadas al frío

Como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo de trabajo está implicado en el proyecto del Ministerio CTQ2010-21183-C02-01, concretamente en el desarrollo de nuevos emulsionantes biológicos poliméricos. En trabajos anteriores del grupo, se había demostrado que la cepa antártica *P. antarctica* NF₃^T, también de aspecto altamente mucoso, producía una gran cantidad de material extracelular con actividad emulsionante. Tomando como base estos estudios anteriores, se procedió a determinar la capacidad emulsionante de las cepas antárticas aisladas y clasificadas previamente por nuestro grupo de trabajo.

Se planteó inicialmente la detección de actividad emulsionante en los cultivos líquidos del conjunto de cepas de origen antártico. Dicha actividad, se determinó a partir del cultivo de las cepas, crecidas en medio mínimo mineral MM5 y Caldo Marino, después de 7 días de incubación a 10 °C. La actividad emulsionante se midió en el cultivo completo, en el sobrenadante una vez separadas las células y en la fracción del lavado de las células con una solución Ringer ¼. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

El muestreo se realizó con 9 cepas y 5 de ellas mostraron capacidad emulsionante frente al *n*-hexadecano, tales como: *Shewanella livingstonensis* NF22^T, *Shewanella vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4-2, *Pseudomonas deceptionensis* M1^T y *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T. Por otra parte, las bacterias *Psychrobacter luti* NF11^T, *Psychrobacter fozii* NF23^T, *Pseudomonas guineae* M8^T y *Marinobacter guineae* M3B^T, no formaron emulsión. Se consideró una actividad emulsionante positiva, cuando el *n*-hexadecano quedó emulsionado en la fase acuosa y la emulsión se mantuvo estable durante 1 h (Figura 14).

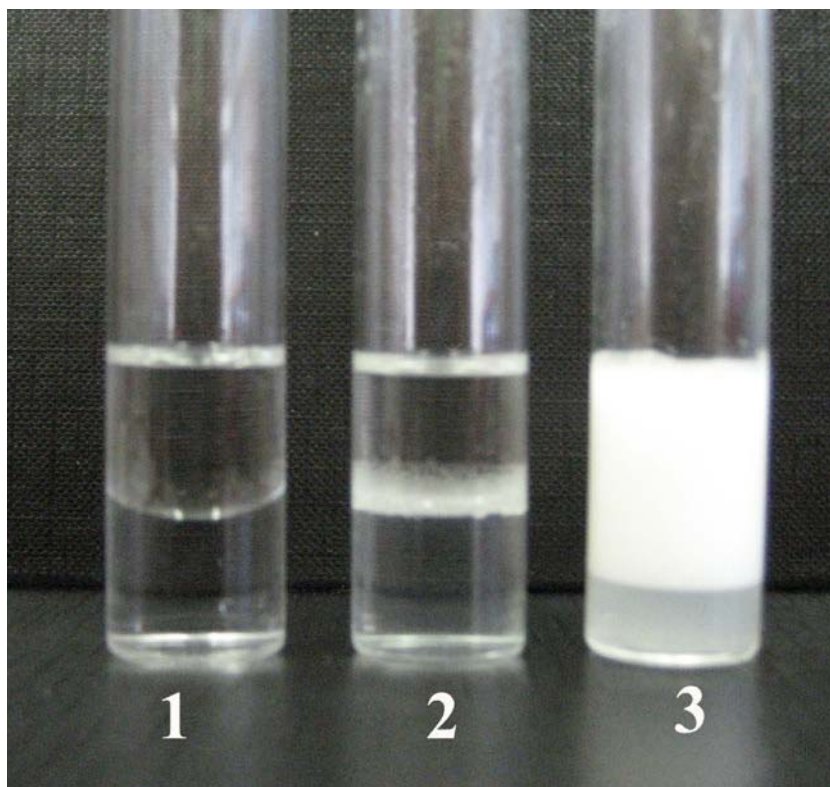


Figura 14: Ensayo de actividad emulsionante del sobrenadante de *Shewanella vesiculosa* M7^T frente al *n*-hexadecano. 1) Control negativo: Agua-hexadecano. 2) Lavado de células (*P. guineae* M8^T)-hexadecano. 3) Lavado de células (*S. vesiculosa* M7^T)-hexadecano.

La fracción correspondiente al lavado de las células fue la que mostró mayor capacidad de emulsión en todas las cepas estudiadas. La tensión superficial del sobrenadante osciló entre 41 y 62 mNm⁻¹, siendo las cepas *S. vesiculosa* M7^T y *Pseudomonas deceptionensis* M1^T las que alcanzaron menores valores (41 mNm⁻¹). Las cepas que no mostraron actividad emulsionante o muy escasa, también mostraron un crecimiento escaso en el medio de cultivo ensayado, excepto *Marinobacter guineae* M3B^T, que prácticamente no mostró actividad emulsionante pero su crecimiento fue bueno en el medio de Caldo Marino utilizado.

Tabla 7: Cribado inicial de la actividad emulsionante frente al *n*-hexadecano de las distintas fracciones del cultivo de las cepas estudiadas en medio mineral (MM5) y datos del crecimiento.

| | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Psychrobacter</i> <i>fozii</i> | <i>P. antarctica</i> | <i>Shewanella vesiculosa</i> | <i>S. livingstonensis</i> | <i>Psychrobacter</i> <i>luti</i> | <i>P. deceptionensis</i> | <i>P. guineae</i> | <i>Marinobacter</i> <i>guineae</i> |
|---|------------------------|-----------------------------------|----------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------|------------------------------------|
| | M4-2 | NF23 ^T | NF3 ^T | M7 ^T | NF22 ^T | NF11 ^T | M1 ^T | M8 ^T | M3B ^T |
| Cultivo | ++ | - | ++ | ++ | ++ | - | ++ | - | - |
| Sobrenadante | + | + | + | + | + | - | + | - | - |
| Lavado de las células | +++ | - | +++ | +++ | +++ | - | ++ | + | + |
| Tensión superficial (sobrenadante) (mNm ⁻¹) | 53 | 58 | 57 | 41 | 56 | 62 | 41 | 59 | 50 |
| Crecimiento (7 días) 10 °C | +++ | + | ++++ | ++++ | +++ | + | +++ | + | ++++ |

Leyenda: (++++) muy buena; (++++) buena; (++) moderada; (+) escasa; (-) nula

4. Estudio de la capacidad emulsionante de distintas fracciones del cultivo de bacterias de la Antártida adaptadas al frío

Al observar en el estudio estructural mediante microscopía electrónica que el material exopolimérico que producen estas cepas adaptadas al frío es complejo y está formado por VME y fibras capsulares, se procedió a realizar un segundo muestreo a partir de siete cepas, con el objetivo de detectar qué fracción del material extracelular pudiera ser la responsable de la presencia de actividad emulsionante frente al *n*-hexadecano.

La actividad emulsionante se analizó a partir de diferentes fracciones separadas de los cultivos en medio MM5 a 10 °C. Concretamente se determinó la capacidad emulsionante del sobrenadante sin células, de la fracción del lavado de las células con Ringer ¼ para arrastrar el material polimérico capsular adherido a las células y la capacidad emulsionante de las VME separadas a partir del sobrenadante mediante centrifugación a alta velocidad. La actividad emulsionante se midió a dos tiempos, 1 y 24 h para determinar la estabilidad de las emulsiones (Tabla 8). Las cepas *S. vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas antarctica* NF3^T y *Pseudoalteromonas* sp. M4-2, mostraron altos porcentajes de emulsión frente al *n*-hexadecano (>60%) en todas las fracciones del cultivo ensayadas, además estas emulsiones se mantuvieron estables por más de 24 h. Por otra parte, *S. livingstonensis* NF22^T mostró también una elevada capacidad emulsionante en las fracciones del lavado de células y VME, pero no en el sobrenadante completo en el que los valores fueron inferiores al 32% y no se mantenían estables. La cepa *Pseudomonas* M1^T mostró una buena capacidad emulsionante (>60%) y estable en el plazo de 24 h sólo en la fracción del lavado de células aunque las fracciones restantes presentaron porcentajes de emulsión menores, mientras que la cepa *Marinobacter guineae* M3B^T mostró muy buena capacidad emulsionante (>80%) exclusivamente en la fracción del lavado de las células.

Es de destacar que es particularmente atractivo el estudio de estas cepas no sólo por su adaptación a crecer a bajas temperaturas sino que además son productoras de material extracelular con presencia de cápsula y VME, en el que se ha detectado actividad emulsionante frente al *n*-hexadecano.

Tabla 8: Actividad emulsionante (%) frente al n-hexadecano de las distintas fracciones del cultivo de cepas de la Anfártida

| | % Actividad emulsionante (1h) | | | | | | |
|-----------------------|--|--|--------------------------------|---|--|---------------------------------------|---|
| | <i>P. antarctica</i> NF3 ^T | <i>S. inviglonensis</i> NF22 ^T | <i>Pseudomonas</i> sp. M4-2 | <i>Pseudomonas</i> sp. M1 ^T | <i>Psychrobacter fozi</i> NF23 ^T | <i>M. guineae</i> M3B ^T | <i>S. vestribova</i> M7 ^T |
| Sobrenadante | 70,4 | 32 | 70,2 | 56 | 61,5 | 0 | 67 |
| Lavado de las células | 80,8 | 84 | 73,1 | 67,8 | 60,6 | 80 | 63 |
| Vesículas de Membrana | 76,9 | 63 | 73,1 | 48,1 | 40 | 0 | 75 |
| | % Actividad emulsionante (24h) | | | | | | |
| | NF3 ^T | NF22 ^T | M4-2 | M1 ^T | NF23 ^T | M3B ^T | M7 ^T |
| Sobrenadante | 70,4 | 12 | 63 | 24 | 53,8 | 0 | 65 |
| Lavado de las células | 80,7 | 80 | 73,1 | 67,8 | 56 | 76 | 62 |
| Vesículas de Membrana | 76 | 62,9 | 69,2 | 29,6 | 16 | 0 | 74 |

5. Estudio del crecimiento y actividad emulsionante de *Shewanella vesiculosa* M7^T

Basándonos en la capacidad del material extracelular de producir emulsiones estables frente al *n*-hexadecano, se seleccionó la cepa *S. vesiculosa* M7^T, para continuar los estudios. En el transcurso del crecimiento en medio MM5 durante 8 días, se extrajeron muestras y se realizó un estudio cinético de crecimiento a diferentes intervalos de tiempo, así como de la actividad emulsionante.

La Figura 15 muestra la dinámica de crecimiento de la cepa *Shewanella vesiculosa* M7^T en medio MM5 a 10 °C y los valores de pH alcanzados. La fase exponencial comenzó pasadas las 12 horas de inoculación y llegó a alcanzar un máximo de $7,3 \times 10^8$ ufc/ml a las 96 h. Luego, las células entraron en una larga fase estacionaria hasta las 144 h, donde finalmente ocurrió un decrecimiento de viables que marcó la fase de muerte celular. A medida que disminuyó la viabilidad celular, también bajaron los valores de pH en el medio, de un valor inicial de 6,2 a 4,6 después de las 170 horas.

La actividad emulsionante en el sobrenadante se detectó a partir de las 24 h, coincidiendo con la fase exponencial de crecimiento de la cepa. Esta actividad aumentó asociada al crecimiento hasta llegar a un valor máximo frente a *n*-hexadecano del 70% y se obtuvo en la fase estacionaria de crecimiento de la cepa (144 h). Finalmente al comenzar la fase de muerte celular, se observó un decrecimiento del porcentaje de emulsión.

Por otra parte, la tensión superficial del sobrenadante medida mediante el método del anillo no mostró descensos en el medio MM5 durante el crecimiento de la cepa analizada. La tensión superficial osciló entre 54 y 74 mNm⁻¹ durante todo el cultivo.

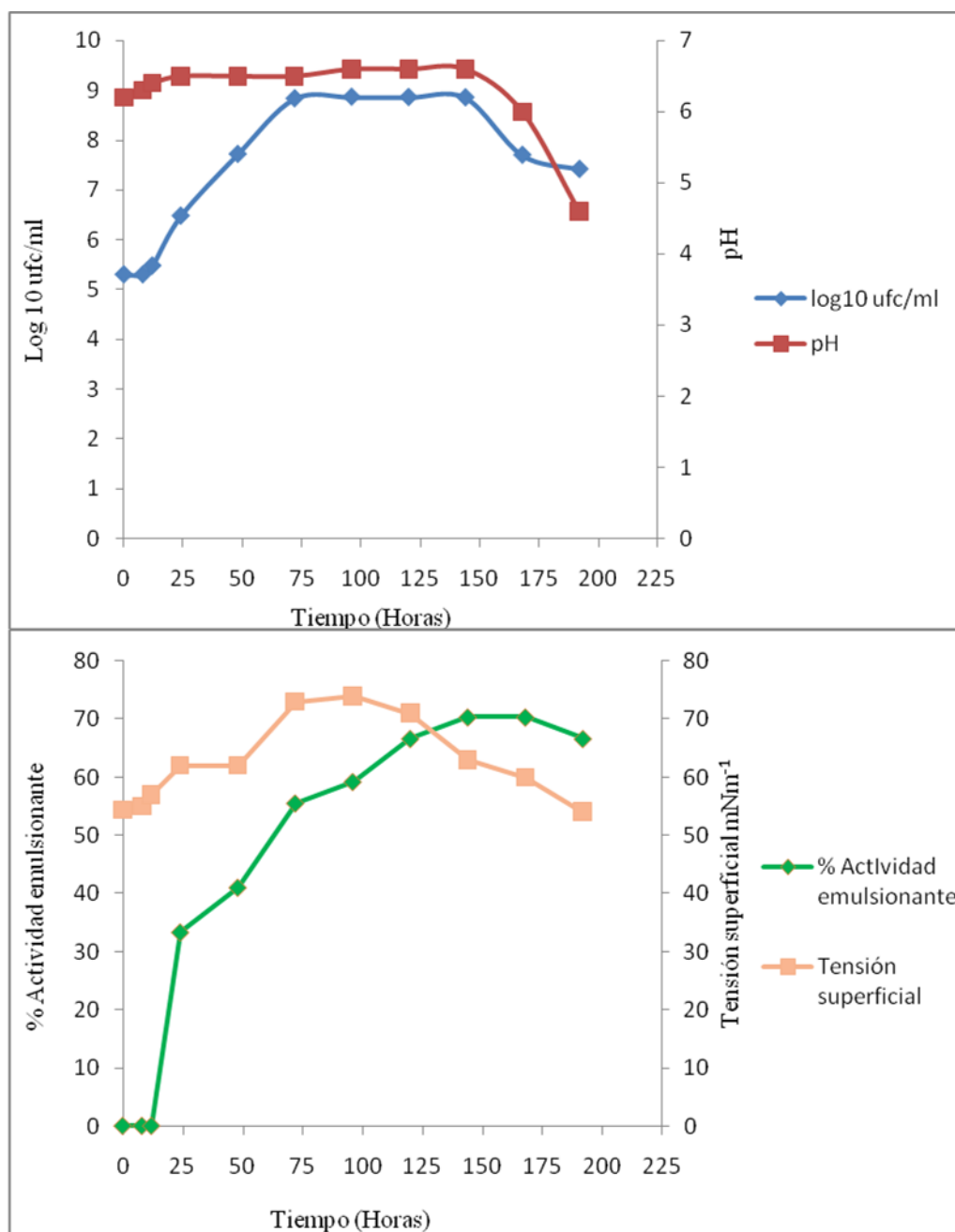


Figura 15: Cinética de crecimiento y actividad emulsionante de la cepa *Shewanella vesiculosa* M7^T en medio MM5 a 10 °C.

6. Caracterización química del EPS de *Shewanella vesiculosa* M7^T

6.1 Obtención del EPS de *S. vesiculosa* M7^T

El material extracelular se obtuvo al finalizar la fase exponencial de crecimiento de la cepa *S. vesiculosa* M7^T en medio MM5 a 10 °C, donde se alcanzó la máxima actividad emulsionante. Para la recuperación del EPS se realizaron sucesivas operaciones de

centrifugado del cultivo, filtración tangencial de 0,45 μm , concentración de la muestra y diálisis a través de membranas de 10 kDa. Finalmente el concentrado fue sometido a liofilización durante 3 días para su posterior caracterización química.

La Figura 16 muestra la imagen de tinción negativa captada a través de MET del liofilizado de la cepa. Se puede apreciar el aspecto complejo del EPS de *S. vesiculosa* M7^T, integrado por material extracelular liberado al medio, acompañado de abundante presencia de VME.

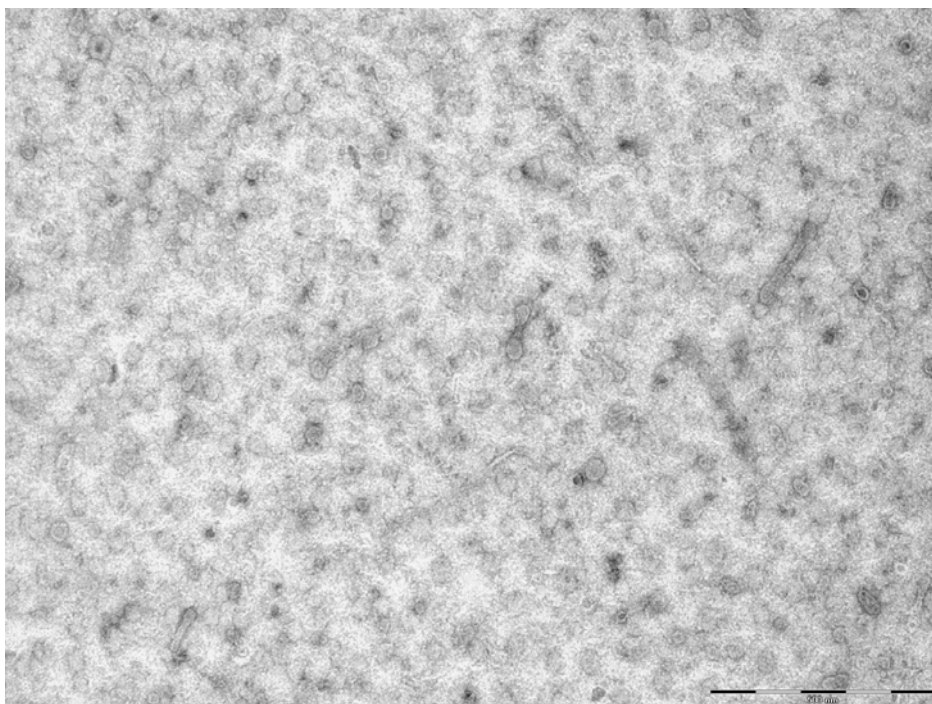


Figura 16: Imágen de MET de tinción negativa del EPS liofilizado de *S. vesiculosa* M7^T. (Barra 500nm)

6.2 Composición química general del EPS de *S. vesiculosa* M7^T

El EPS liofilizado mostró un valor de carbohidratos totales del 17,7% según el método del fenol sulfúrico y el contenido de proteínas totales fue del 6,9% determinado por Bradford, así como también un valor de lípidos totales del 16,6%.

Respecto al análisis elemental por combustión realizado al liofilizado se determinó la presencia de carbono (43,37%), nitrógeno (5,77%), hidrógeno (7,85%) y azufre (0,52%).

6.2.1 Composición química de azúcares del EPS

Mediante el empleo de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), se determinó la composición de sacáridos del EPS liofilizado de *S. vesiculosa* M7^T, previa hidrólisis de la muestra con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M, durante 24 horas a 100 °C.

La Figura 17 muestra los cromatogramas obtenidos, en los cuales se evidencia la presencia de monosacáridos mayoritarios como glucosa y galactosa; seguido de los disacáridos sacarosa y maltosa. Además se observó señal de glucoheptosa y la presencia de otra heptosa aún sin identificar.

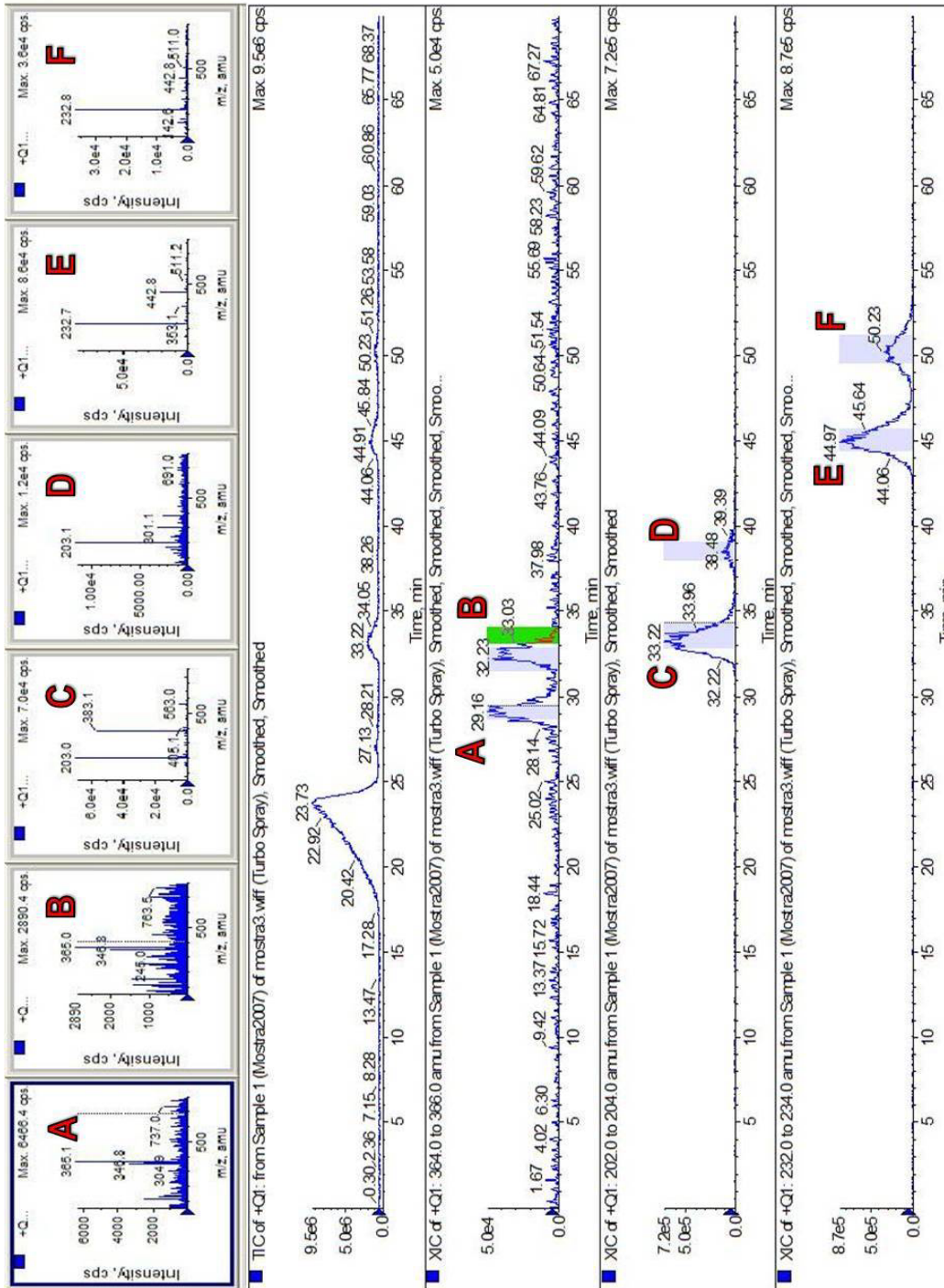


Figura 17: Cromatogramas de los azúcares detectados mediante HPLC-MS del EPS liofilizado de *S. vesiculosa* M7^T. A: sacarosa; B: maltosa; C: glucosa; D: galactosa; E: glucoheptosa y F: heptosa sin identificar.

6.2.2 Composición de aminoácidos del EPS

Mediante cromatografía de intercambio iónico se determinó la composición de aminoácidos presentes en el liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T. Las muestras fueron hidrolizadas con ácido clorhídrico (6 M) durante 24 h y se empleó norleucina como patrón interno.

En la Tabla 9 se detallan los aminoácidos presentes en el liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T. El contenido total de aminoácidos fue del 7,2 % del peso seco total de la muestra.

El análisis del liofilizado hidrolizado permitió identificar la presencia de 3 aminoácidos mayoritarios (tirosina, fenilalanina y glutámico), que contribuyeron al 40,4% del contenido total de aminoácidos. Respecto a la distribución de aminoácidos hidrofóbicos, se alcanzó un 40,7% y para los aminoácidos hidrofílicos fue del 59,3% del contenido total de aminoácidos.

También fueron identificados bajo las mismas condiciones de hidrólisis y técnicas empleadas, otros dos compuestos presentes en la muestra liofilizada de EPS de *S. vesiculosa* M7^T, estos fueron la glucosamina y el ácido murámico que aportaron el 7,55% y 1,40% del peso respectivamente.

Tabla 9: Composición de aminoácidos del liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T

| Componentes | % en peso del EPS |
|--------------|-------------------|
| Ac. Cisteico | 0,22 |
| Asp | 0,65 |
| Glu | 0,79 |
| Ser | 0,42 |
| Gly | 0,29 |
| His | 0,11 |
| Thr | 0,38 |
| Arg | 0,16 |
| Ala | 0,42 |
| Pro | 0,17 |
| Tyr | 1,08 |
| Val | 0,12 |
| Met | 0,34 |
| Ile | 0,17 |
| Leu | 0,35 |
| Lys | 0,22 |
| Phe | 1,05 |
| Trp | 0,32 |
| DAP | 0,09 |
| Total | 7,2 |

6.2.3 Lípidos polares del EPS

Para la identificación de lípidos polares se realizó una TLC bidimensional de la muestra liofilizada de EPS de *S. vesiculosa* M7^T, la cual fue previamente extraída con solventes orgánicos. La placa fue revelada con una solución de ácido fosfomolibdico y finalmente escaneada y el patrón de manchas obtenidas se puede observar en la Figura 18, donde destacan 6 manchas mayoritarias correspondientes a lípidos.

Al establecer una comparación entre la imagen obtenida con los datos bibliográficos, se dedujo que la mancha número 5 correspondió a fosfatidiletanolamina (PE). Por otra parte, se comparó la TLC de la muestra con una placa de referencia donde se habían corrido patrones de lípidos puros en las mismas condiciones y resultó que la mancha número 1 pudiera corresponder a glicerolípidos de tipo tri-diacilglicéridos; mientras que la mancha número 3 posiblemente sean ácidos grasos.

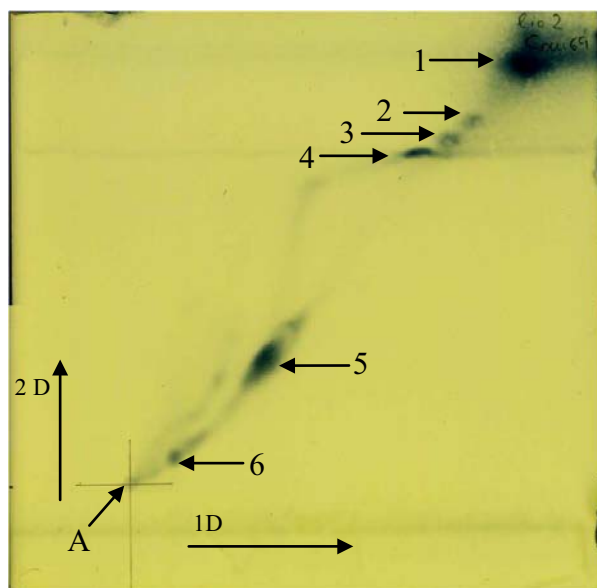


Figura 18: Cromatografía en placa fina de los lípidos polares presentes en el liofilizado de EPS de *Shewanella vesiculosa* M7^T revelados con solución de ácido fosfomolibdico. (A) punto de aplicación de la muestra. (1) glicerolípidos, (3) ácidos grasos, (5) fosfoetanolamina. (2, 4, 6) compuestos apolares desconocidos. (1D y 2D: primera y segunda dimensión respectivamente)

6.3 Análisis del LPS

La detección del lipopolisacárido se llevó a cabo a partir del liofilizado de EPS de *Shewanella vesiculosa* M7^T ya que al visualizar la presencia de VME en el liofilizado cabía esperar que se detectara este componente característico de la membrana externa de bacterias gramnegativas. Para ello, al liofilizado se le añadió tampón de lisis y proteinasa K para finalmente visualizarlo en gel de poliacrilamida con SDS, teñido con sales de plata.

En la Figura 19 se muestra el perfil electroforético del LPS del liofilizado de EPS, el cual mostró el patrón de migración en forma de “escalera” característico de un LPS tipo S.

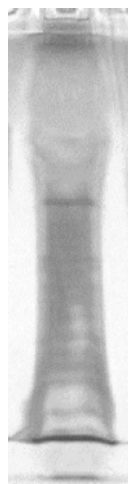


Figura 19: Perfil electroforético del LPS obtenido a partir del liofilizado de EPS de *Shewanella vesiculosa* M7^T, en gel de poliacrilamida teñido con sales de plata.

7. Estudio de la capacidad emulsionante del EPS de *Shewanella vesiculosa* M7^T

La Figura 20, muestra la actividad emulsionante del liofilizado del EPS obtenido a partir de *S. vesiculosa* M7^T, frente a diferentes aceites comerciales. El ensayo se realizó para determinar la habilidad de formar emulsiones aceite en agua, basado en la versión modificada del método descrito por Cirigliano y Carman, (1984), tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

En general, el liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T mostró mayor efecto emulsionante frente a los aceites de oliva, girasol y maíz, que la goma arábica y el xantano, empleados como controles positivos.

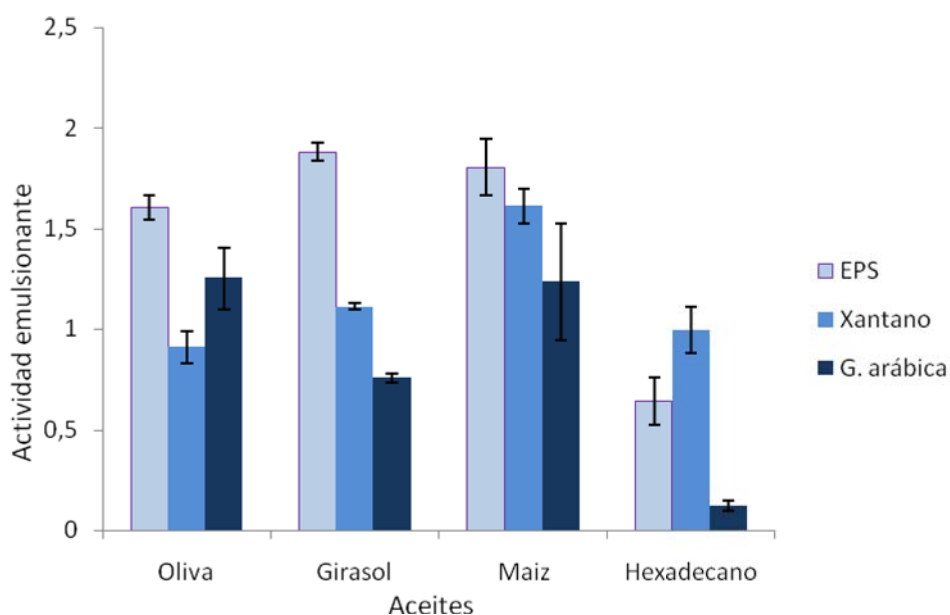


Figura 20: Actividad emulsionante del liofilizado de EPS de *Shewanella vesiculosa* M7^T comparado con emulsionantes comerciales (goma arábica y xantano) frente a aceites de oliva, maíz, girasol y *n*-hexadecano.

Los mayores resultados se obtuvieron con la mezcla del EPS frente al aceite de girasol. A pesar de no encontrarse diferencias significativas en el análisis de varianza entre las muestras (datos no mostrados), se puede observar que la emulsión del EPS fue superior con respecto a los controles positivos estudiados. Seguida de la emulsión resultante de la combinación de la muestra de EPS con aceite de maíz, la cual fue ligeramente superior comparada con las emulsiones obtenidas con la goma arábica y más parecida a la emulsión del xantano. Sin embargo, con respecto al aceite de oliva, la emulsión del EPS fue más próxima a la descrita por goma arábica, aunque también superior con respecto a los dos controles positivos.

Respecto al ensayo frente al *n*-hexadecano, el EPS liofilizado alcanzó mayor actividad emulsionante sólo frente a la combinación de goma arábica- *n*-hexadecano, pero menor que la emulsión obtenida por xantano bajo las mismas condiciones.

Finalmente, el liofilizado de EPS no tuvo efecto sobre la tensión superficial del agua ($72,1 \text{ mNm}^{-1}$ a 21°C).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El estudio de nuevas especies microbianas adaptadas al frío, que nuestro grupo de trabajo ha aislado de muestras antárticas, resulta interesante bajo distintos puntos de vista. Por una parte, el simple hecho de proceder de un ambiente extremo ha permitido clasificar muchos de los aislamientos como nuevas especies (Bozal y col., 1997, 2002, 2003, 2009; Llarch y col., 1997; Montes y col., 1999, 2004, 2008; Carrión y col., 2011). Estos estudios taxonómicos fueron abordados en trabajos anteriores del grupo. Por otra parte, el hecho de trabajar con bacterias totalmente nuevas abre un enorme campo de investigación tanto básico como aplicado con posibilidad de hallar nuevos productos de interés biotecnológico. El trabajo que aquí se presenta, se ha centrado en el estudio estructural y la caracterización de algunas de las nuevas bacterias antárticas y de las sustancias exopoliméricas que producen.

El interés en el estudio de los EPS producidos por bacterias antárticas está justificado ya que se ha descrito como una de las adaptaciones más frecuentes a estos ambientes extremos (Costerton, 1999). Por otra parte, existe un interés real en el aislamiento y caracterización estructural y funcional de EPS obtenidos a partir de microorganismos que pudieran ser utilizados como agentes emulsionantes, agregantes y espesantes, así como también en la recuperación de metales, en la crioprotección y en el control de biofilms (Kumar y col., 2007). Es por ello que el trabajo que se presenta ha abordado tanto el estudio estructural de las bacterias antárticas y sus EPS, como el estudio de la capacidad emulsionante de los mismos.

1. Estudio estructural de las bacterias de la Antártida adaptadas al frío y de sus EPS

Uno de los aspectos más destacables en esta tesis ha sido la caracterización estructural de cepas antárticas y del material extracelular que producen. Actualmente, es un hecho probado que las técnicas que se utilizan para el procesamiento de las muestras influyen en la estructura observada y se ha demostrado que algunas técnicas pueden generar “artefactos” estructurales debido a la fijación química (Nevot y col., 2006a; Dohnalkova y col., 2011).

Los dos pasos a tener en cuenta para una buena preservación de la muestra son: la fijación y seguidamente la sustitución del agua contenida en la muestra por una resina que aporte consistencia y permita realizar cortes ultrafinos. En los métodos convencionales, la fijación química se realiza normalmente con glutaraldehído mientras que la sustitución se lleva a cabo

a temperatura ambiente con disolventes orgánicos. La fijación química puede desnaturalizar proteínas y alterar su distribución, así como modificar la conformación de ácidos nucleicos. Al mismo tiempo, los disolventes orgánicos a temperatura ambiente arrastran materiales de la muestra, especialmente los que están altamente hidratados como los exopolímeros bacterianos.

Actualmente se utilizan equipos de criofijación y criosustitución. La técnica de criofijación a alta presión (HPF), implica bajar a temperaturas de nitrógeno líquido en milisegundos. De este modo, al fijar la muestra por congelación a alta velocidad (fijación física) se logra una inmovilización de todos los componentes de la misma y el agua presente en ella no cristaliza, sino que pasa a un estado amorfo (vítreo) por lo que la estructura de la muestra no se altera (Dubochet y col., 1988; Harris, 1997; Bozal y col., 2007). Además, en la criosustitución el hielo vítreo es sustituido en frío por disolventes y luego la muestra se incluye en resinas, sin que ello suponga el desplazamiento o arrastre de ningún componente de la muestra. Por este motivo, el empleo de la técnica de criofijación a alta presión y criosustitución (HPF-FS), permite obtener información estructural más detallada al lograr preservar la ultraestructura celular próxima a su estado natural y así mismo permite observar materiales extracelulares altamente hidratados, como cápsulas o sustancias poliméricas excretadas al medio (Graham, 1992; Harris, 1997; Hunter y Beveridge, 2005).

Así por ejemplo, Nevot y colaboradores, (2006a), demostraron para la bacteria *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T, que las muestras sometidas a fijación química no mostraban material extracelular alrededor de las bacterias ni en el espacio intercelular. Sin embargo, cuando la misma cepa se sometía a HPF-FS, se podía observar un material capsular alrededor de la bacteria con abundante material entre células.

Por todo ello, la caracterización estructural de las cepas antárticas se realizó mediante las técnicas de HPF-FS, seguidas de la observación de cortes ultrafinos por microscopía electrónica de transmisión (MET). Este estudio permitió mostrar que la mayoría de las cepas antárticas estudiadas presentan una compleja composición de su material extracelular. Por una parte, se observaron finas fibras colocadas perpendicularmente a la superficie celular mientras que los espacios entre células contienen grandes cantidades de vesículas de membrana externa

(VME), formando un amplio entramado. Las cepas que presentaron mayor cantidad de vesículas de membrana en su material extracelular pertenecían a los géneros *Shewanella* y *Pseudoalteromonas*.

Es la primera vez que se describe y visualiza de manera tan clara la gran cantidad de VME que producen bacterias no patógenas de ambientes naturales. Asimismo, es la primera vez que se describe la presencia de estas estructuras en cepas del género *Marinobacter* y *Psychrobacter*. Anteriormente, se había descrito la presencia de VME en matrices de biofilms de ecosistemas naturales y biofilms preparados en el laboratorio (Beveridge y col., 1997; Schooling y Beveridge, 2006). Nuestro hallazgo hace pensar que las VME son estructuras abundantes en ambientes naturales y que sin duda deben cumplir funciones importantes para la supervivencia de estas bacterias en su entorno. Al mismo tiempo, nuestro estudio pone también en evidencia la importancia de las técnicas de fijación y procesamiento para observar las muestras mediante microscopía electrónica. Son numerosos los estudios que han mostrado visiones muy alteradas de las matrices extracelulares, tanto de los EPS como de las VME (Dubochet y col., 1983; Graham y col., 1991; Hunter y Beveridge, 2005). Los EPS o no se han visualizado, o se han observado muchas veces como un material formado por finos filamentos, mientras que en realidad se trata de una capa alrededor de las células más o menos homogénea y altamente hidratada. Así mismo, se han publicado muy pocas imágenes de las VME en las que se aprecie su abundancia real alrededor de las células, e incluso se muestre claramente que arrastran el LPS y material capsular que pueda haber alrededor de las células.

Las VME de *S. livingstonensis* NF22^T, *S. vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4-2, *Psychrobacter fozii* NF23^T y *Marinobacter guineae* M3B^T, mostraron las características típicas de estas estructuras, las cuales han sido descritas como estructuras esféricas rodeadas por una bicapa lipídica, cuya tamaño oscila en el rango de 20 a 200 nm (Beveridge, 1999). A nivel de ultraestructura, no se han observado diferencias significativas respecto a las VME descritas en otras bacterias gramnegativas, a pesar de no encontrarse publicadas imágenes tan nítidas y claras de las VME de otras cepas.

De hecho, actualmente se acepta que la mayoría de bacterias gramnegativas presentan capacidad para secretar VME durante su crecimiento y entre las más estudiadas destacan:

Escherichia coli, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori* y *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T (Devoe y Gilchrist, 1973; Hoekstra y col., 1976; Fioacca y col., 1999; Kadurugamuwa y Beveridge, 1999; Nevot y col., 2006b). Sin embargo, las imágenes que se muestran en estas publicaciones son, en la mayoría de los casos, muy deficientes. Sólo en el caso de *P. antarctica* NF₃^T, analizada en trabajos anteriores de nuestro grupo con las mismas técnicas, el material extracelular ya se visualizó con un aspecto similar e integrado por material capsular y VME (Nevot y col., 2006a).

El análisis estructural también reveló que las VME están rodeadas de la misma capa de fibras poliméricas dispuestas perpendicularmente alrededor de la membrana. Estas fibras también se observan alrededor de las células, lo que hace suponer que en el proceso de vesiculación este material también se arrastra y queda alrededor de las VME. Basados en la longitud de las fibras, así como en las tinciones en geles SDS-PAGE realizadas a las fracciones de VME donde se muestran bandas localizadas en la parte superior del gel, se sugiere que estas finas fibras alrededor de las células y de las VME podrían corresponder a polisacáridos capsulares. De hecho, Nevot y colaboradores, (2006a), ya describieron la presencia de estas fibras para *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T y además coinciden con el tipo de estructuras visualizadas empleando esta técnica en cepas capsuladas de *Haemophilus pleuropneumoniae*, *Proteus mirabilis* (Graham y col., 1991) y *Shewanella* spp. (Korenevsky y col., 2002; Stukalov y col., 2008).

Se plantea que el material capsular pudiera contribuir a la adhesión de las vesículas a superficies u otras células de su entorno. En bacterias patógenas se ha demostrado que las VME se adhieren a células de cultivos celulares y también se ha demostrado su adhesión en entornos más complejos como son los tejidos animales. Así por ejemplo, las VME de *Helicobacter pylori* se observaron adheridas a células intestinales en biopsias de pacientes infectados (Heczko y col., 2000). En el caso de *Bacteroides fragilis*, también se demostró que sus VME tienen actividad hemaglutinante, lo que indica que pueden actuar como puentes uniendo células (Patrick y col., 1996). De momento, no hemos realizado estudios para corroborar la capacidad de adhesión de las VME de las cepas antárticas.

En patógenos como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Pseudomonas aeruginosa*, también se ha demostrado que la presencia de material capsular en sus VME

contribuye al perfil antigénico de estas vesículas, con implicaciones en algunos usos como la preparación de vacunas (Bethell y Pollard, 2002). Los carbohidratos que conforman la cápsula que rodea a muchas bacterias patógenas son importantes en la supervivencia y virulencia dentro del huésped, además de ser unas de las principales biomoléculas que son reconocidas por el sistema inmune (Ellis y Kuehn, 2010). En el caso de las bacterias antárticas analizadas, desconocemos si interactúan con otros organismos de su entorno y por tanto si su antigenicidad y capacidad inmunomoduladora juegan un rol importante en el ecosistema.

2. Caracterización de vesículas de membrana de bacterias antárticas adaptadas al frío

Es conocido que las VME de bacterias gramnegativas, están compuestas principalmente de lípidos que provienen de la membrana externa así como de proteínas de dicha membrana y del espacio periplásmico. También se han identificado la presencia de factores de virulencia como el LPS y en algunos casos se han detectado proteínas citoplasmáticas y material genético (Dorward y col., 1989; Kolling y Matthews, 1999; Post y col., 2005; Lee y col., 2008).

Para analizar el contenido proteico de las VME de nuestras cepas se realizaron en primer lugar geles de SDS-PAGE y se compararon con los perfiles proteicos de las membranas externas extraídas de las propias cepas. Los análisis electroforéticos mostraron en todos los casos algunas diferencias en los perfiles proteicos de las VME con respecto a los de la membrana externa. Las VME muestran ausencia de algunas proteínas de la membrana externa y enriquecimiento de otras, lo que coincide con el modelo general de formación de estas estructuras descrito por Kadurugamuwa y Beveridge, (1995). Este modelo se basa en la incorporación o exclusión de manera selectiva de componentes específicos de la membrana externa y parte del periplasma durante la formación de la vesícula. Estos resultados coinciden también con los obtenidos anteriormente por Nevot y colaboradores, (2008), con la cepa antártica *P. antarctica* NF₃^T, cuyas VME presentan un perfil electroforético similar pero no idéntico al de membrana externa de la propia bacteria.

En trabajos realizados con otras bacterias, varios autores han planteado que las diferencias en los perfiles de proteínas se deben a que el proceso de formación de VME ocurre en zonas de la membrana externa donde tiene lugar la incorporación o exclusión selectiva de proteínas

específicas, así como la concentración de ciertas proteínas del periplasma (Horstman y Kuehn, 2000; Lee y col., 2008).

En este trabajo, también se procedió a comparar el perfil de ácidos grasos de las células de *S. vesiculosa* M7^T, con el perfil de ácidos grasos de las VME de la bacteria. Los ácidos grasos mayoritarios encontrados en la cepa coinciden con los descritos previamente en la caracterización taxonómica de la cepa *S. vesiculosa* M7^T, destacando ácidos grasos como Summed Feature 3 (C_{16:1 w7c} y/o iso-C_{15:0 2-OH}); iso-C_{13:0}; iso-C_{15:0}; C_{16:0}; C_{17:1 w8c} y C_{15:0} (Bozal y col., 2009), siendo este perfil característico del género *Shewanella*. En las VME, el perfil de ácidos grasos detectado fue similar, lo cual confirma el origen de estas estructuras a partir de la membrana externa de la bacteria. En este trabajo, no se ha profundizado suficientemente en el estudio de los ácidos grasos y aunque se han observado ligeras variaciones entre la composición de ácidos grasos presentes en las células y en las VME, no podemos señalar aún si tienen influencia sobre el proceso de vesiculación. De hecho, el modelo de formación de VME en bacterias gramnegativas no está resuelto, aunque resulta sorprendente si se tiene en cuenta que entre las distintas moléculas de lipopolisacáridos (LPS) se puede generar una fuerte repulsión electrostática y también porque las moléculas de LPS en determinadas circunstancias se pueden ensamblar en formas distintas a una bicapa lipídica (Nikaido, 2003). Cabe señalar que no existen estudios que indiquen que en los puntos de la membrana externa en que se produce la vesiculación, la composición de ácidos grasos sea distinta a la presente en otros puntos de dicha membrana.

La temperatura es uno de los factores más importante a tener en cuenta en el crecimiento microbiano. Es conocido que los microorganismos psicrófilos se adaptan a bajas temperaturas cercanas al punto de congelación del agua logrando mantener la actividad microbiana (Siddiqui y Cavicchioli, 2006; Panikov y Sizova, 2007; Margesin y col., 2009). Quizás la producción de VME en cepas antárticas podría estar relacionada con la adaptación a las bajas temperaturas. Es por este motivo que se analizó la influencia de este parámetro sobre la producción de VME en *S. livingstonensis* NF22^T. Se trata de una bacteria psicrófila caracterizada en estudios anteriores por nuestro grupo y con temperatura óptima de crecimiento cercana a los 15 °C, una temperatura máxima de 20 °C y con capacidad para crecer hasta a 0 °C.

La cuantificación de VME permitió determinar que esta cepa produce mayor cantidad de vesículas a bajas temperaturas (4 °C y 10 °C), lo cual fue confirmado mediante micrografías obtenidas a partir de MET donde se observaron que las VME son más abundantes en las matrices extracelulares de la bacteria cuando crecen bajo estas condiciones. Las temperaturas de incubación bajas no sólo modificaban la cantidad de VME producidas, sino también la morfología de las mismas. Además, a temperaturas elevadas fueron observadas estructuras parecidas a esferoplastos y células elongadas. La presencia de células filamentosas y esferoplastos fueron también observados en *Shewanella oneidensis* MR-1 (Abboud y col., 2005), pero en esta cepa mesófila estas estructuras se detectaron al crecer a bajas temperaturas y no fueron descritas VME. La presencia de células alargadas y esferoplastos se ha descrito en algunas bacterias al crecer en situaciones de estrés (Slater y Schaechter, 1974; Fiocca y col., 1999) y para la bacteria psicrotolerante *S. livingstonensis* NF22^T, la cual no crece por encima de los 20 °C, un crecimiento a 18 °C pudiera considerarse una situación estresante.

Los estudios realizados por Nevot y colaboradores, (2008), sobre la influencia de la temperatura en la cepa *P. antarctica* NF₃^T, mostraron que esta cepa mantenía tamaños similares sin cambios morfológicos en un rango fisiológico de temperatura de crecimiento y presentaba una ligera tendencia al incremento de la superficie en relación al volumen celular a temperaturas más bajas. Bajos tales condiciones, es conocido que la difusión de los diferentes solutos se dificultan así como todos los procesos celulares de la bacteria, por lo que se sugiere que el incremento de la superficie relativa celular posibilite una mayor captación de nutrientes y por tanto sería una estrategia adaptativa (Wiebe y col., 1992). Quizás también la mayor secreción de VME se explicaría como un mecanismo que permitiría mantener cerca de las células mayor concentración de nutrientes como Fe⁺³ u otros compuestos, ya que es conocido que las VME contienen sideróforos, enzimas y receptores que pueden contribuir a la adquisición de nutrientes y por tanto a la supervivencia de la bacteria (Thompson y col., 1985; Bauman y Kuehn 2006; Vasilyeva y col., 2008).

De momento resulta difícil poder explicar la influencia de la temperatura en la producción y estructura de las VME de *S. livingstonensis* NF22^T. El incremento de VME liberadas al medio ha sido descrita por algunos autores como desarrollo a una respuesta de estrés (Zhang y col., 2005; McBroom y Kuehn, 2007). En nuestro estudio, no se comprobó la presencia de

marcadores de estrés, pero para la bacteria antártica *S. livingstonensis* NF22^T, el crecimiento a 4 °C o 10 °C no sería una situación estresante, ya que a estas temperaturas se alcanzan densidades poblacionales similares a la temperatura óptima.

Para tener una visión global de las proteínas que conforman las VME, se pueden llevar a cabo estudios proteómicos, los cuales posibilitan la identificación, cuantificación y caracterización estructural, bioquímica y funcional de las proteínas presentes en las VME (Abel y col., 2007). Para ello, se pueden emplear geles de proteínas en dos dimensiones (2D), que constituyen una herramienta útil en la separación de proteínas, pero que en muchas ocasiones no puede resolver correctamente proteínas hidrofóbicas, proteínas muy básicas o de alto peso molecular que son frecuentes en las VME (Wu y Yates, 2003). Por este motivo, el uso de geles en 2D no siempre ha logrado resolver de forma satisfactoria la proteómica de las VME (Post y col., 2005), lo que sugiere que la separación de proteínas por este método no siempre es la más conveniente para el análisis global de proteínas de VME. Una alternativa válida y aceptada a los análisis en geles de 2D, es la combinación de geles SDS-PAGE de una dimensión (1D) con la técnica de separación de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Aebersold y Mann, 2003).

Así pues, en este trabajo fueron identificadas las proteínas mayoritarias presentes en las VME purificadas de *S. livingstonensis* NF22^T y *S. vesiculosa* M7^T, mediante electroforesis monodimensional como ya había sido descrito por otros autores (Post y col., 2005; Nevot y col., 2006b). Los resultados obtenidos en los geles PAGE de las VME de ambas bacterias muestran numerosas bandas tal como se han descrito para otras bacterias gramnegativas (Lee y col., 2008). Las bandas mayoritarias fueron cortadas del gel, luego tripsinizadas y los péptidos fueron separados por cromatografía líquida (LC) que permite una buena separación a pesar de su hidrofobicidad. Al no encontrarse aún secuenciados los genomas de ambas cepas, el análisis proteómico se realizó mediante la comparación de la huella peptídica con la de otras especies próximas, lo que permitió identificar presuntivamente algunas de las proteínas presentes en las VME. Los péptidos fueron identificados tomando las bases de datos, NCBI/all y NCBI/Bacterias.

Según estudios proteómicos publicados sobre VME, se han identificado más de 200 proteínas vesiculares a partir de diferentes bacterias gramnegativas tales como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T, *Neisseria meningitidis* y de mutantes provenientes de *E. coli* y *N. meningitidis* (Post y col., 2005; Bauman y Kuehn, 2006; Ferrari y col., 2006; Nevot y col., 2006a; Lee y col., 2007; Berlanda Scorza y col., 2008). Si bien los nombres de las proteínas bacterianas son diferentes en cada especie, éstas pueden ser clasificadas dentro de familias de proteínas basadas en su homología y función. Entre las diferentes familias se encuentran: las porinas, abundantes proteínas de membrana externa; mureína hidrolasas que son responsables de la hidrólisis de ciertos glicopéptidos de pared celular, particularmente peptidoglicano, así como también se agrupan las bombas de eflujo tipo multidrogas, las cuales participan en la liberación de compuestos tóxicos (Kobayashi y col., 2000). Por otra parte, muchas VME derivadas de diferentes cepas contienen transportadores, proteasas/chaperonas y proteínas de la motilidad relacionadas con fimbrias y pilis. En cepas patógenas, se encuentran las proteínas involucradas con factores de virulencia que incluyen hemolisinas y proteasa IgA (Post y col., 2005; Ferrari y col., 2006).

En el estudio proteómico de *S. livingstonensis* NF22^T y *S. vesiculosa* M7^T, se identificaron fundamentalmente proteínas de membrana externa y periplásmicas involucradas en diferentes funciones fisiológicas como se muestran en las Tablas 10 y 11 según la base de datos COG (*cluster of orthologous groups*) (Tatusov y col., 2001).

Tabla 10: Clasificación COG de las proteínas presentes en las VME de *Shewanella livingstonensis* NF22^T.

| Grupos COG | Función | Número de proteínas |
|-------------------|---|----------------------------|
| E | Metabolismo y transporte de aminoácidos | 1 |
| F | Metabolismo y transporte de nucleótidos | 8 |
| I | Metabolismo de lípidos | 2 |
| M | Biogénesis de las envueltas celulares, membrana externa | 6 |
| N | Motilidad celular y secreción | 3 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 25 |
| R | Funciones generales | 3 |
| S | Funciones desconocidas | 4 |

Tabla 11: Clasificación COG de las proteínas presentes en las VME de *Shewanella vesiculosa* M7^T.

| Grupos COG | Función | Número de proteínas |
|-------------------|---|----------------------------|
| C | Producción y conversión de energía | 3 |
| E | Metabolismo y transporte de amino ácidos | 2 |
| F | Metabolismo y transporte de nucleótidos | 1 |
| I | Metabolismo de lípidos | 1 |
| M | Biogénesis de las envueltas celulares, membrana externa | 10 |
| O | Recambio proteico, chaperonas | 1 |
| P | Transporte y metabolismo de iones inorgánicos | 25 |
| R | Funciones generales | 2 |
| S | Funciones desconocidas | 7 |

De manera general en ambas cepas destacan por su abundancia las proteínas implicadas en el transporte y metabolismo de iones inorgánicos. En el caso particular de *S. livingstonensis* NF22^T se observó mayor presencia de proteínas del grupo F y M, que abarcan funciones de metabolismo y transporte de nucleótidos y biogénesis de las envueltas celulares y membrana externa, respectivamente. Este último grupo también destacó para las proteínas identificadas de *S. vesiculosa* M7^T. Por otra parte, llama la atención la presencia de proteínas clasificadas en el grupo S, que abarca funciones desconocidas.

Las proteínas más abundantes corresponden a los receptores putativos dependientes de Ton B y receptores de sideróforos dependientes de Ton B. Esta familia de proteínas de la membrana

externa están principalmente involucradas en la absorción de moléculas de mayor tamaño, fundamentalmente sideróforos de hierro y vitamina B12 (Koebnik, 2005).

Para las bacterias de la Antártida, *S. livingstonensis* NF22^T y *S. vesiculosa* M7^T, la sobreexpresión de estas proteínas podría ser un mecanismo de adaptación, tal como fue propuesto por Nevot y colaboradores, (2006b). Estos autores sugirieron que los receptores dependientes de Ton B (BtuB, FhuA y FhuE) en las VME de *P. antarctica* NF3^T, jugarían un papel de sensores de nutrientes y transportadores y su presencia representaría una alternativa de supervivencia en sistemas con limitación de nutrientes como el hierro. Se ha descrito que este elemento juega un rol esencial en la evolución de la vida en la Tierra y es un requerimiento para muchos microorganismos (Posey y Gherardini, 2000). Como elemento traza es frecuentemente usado como cofactor en procesos metabólicos, incluyendo síntesis desoxirribonucleótidos, fosforilación oxidativa y transporte de electrones (Briat, 1992). Para colonizar regiones con limitaciones de hierro y satisfacer sus requerimientos nutricionales, las bacterias han desarrollado un mecanismo de secreción de compuestos sideróforos, los cuales presentan una alta afinidad por este compuesto, lo que les permite emplear estas estructuras como una estrategia y/o ventaja adaptativa para la obtención de nutrientes esenciales.

De igual modo, una situación limitante de nutrientes, podría también explicar la presencia en *S. livingstonensis* NF22^T, de proteínas putativas identificadas como precursores periplasmáticos bifuncionales con actividad UDP-azúcar hidrolasa/5'-nucleotidasa, precursor de proteínas periplasmáticas de unión a fosfato y porinas O y P selectivas a fosfato. Como es conocido, el fósforo es un componente esencial de las macromoléculas y las bacterias necesitan un suministro óptimo de este compuesto del entorno. Estos precursores así como las porinas pueden desempeñar funciones en la captura de nucleótidos y en el metabolismo de fósforo. La existencia de porinas en VME tanto en *S. livingstonensis* NF22^T como en *S. vesiculosa* M7^T, nos sugiere que estas proteínas podrían estar involucradas en la supervivencia bacteriana en el medio ambiente antártico, así como las proteínas de secreción de membrana externa tipo I (TolC) y enzimas de degradación proteolíticas (peptidasa M16 y M28 respectivamente para cada cepa).

Entre las proteínas integrales de membrana externa detectadas en *S. vesiculosa* M7^T, cabe destacar la proteína OmpA, la cual forma canales hidrofílicos que permiten la difusión inespecífica de moléculas a través de la membrana externa. Esta proteína de membrana conjuntamente con la OmpC y OmpF, han sido también encontradas en las VME de todas las cepas de *E. coli* estudiadas hasta la fecha (Kesty y Kuehn, 2004). Estudios recientes revelan que esta proteína podría presentar funciones adicionales. En este sentido, es interesante el estudio publicado por Walzer y colaboradores, (2006), en el que describen la capacidad de la cepa *Acinetobacter radioresistens* KA53, de excretar al medio una proteína homóloga de OmpA (AInA). Según los autores, esta proteína a pesar de presentar varios dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana externa de la bacteria, es excretada al medio en forma soluble, conjuntamente con material extracelular complejo de alto peso molecular y compuesto por proteínas y polisacáridos. Además, presenta una alta capacidad emulsionante que los autores atribuyen a dicha proteína AInA y que ayudaría a emulsificar fuentes de carbono hidrofóbicas que la bacteria es capaz de degradar. Este estudio es interesante en relación a nuestro trabajo por dos motivos. En primer lugar resulta difícil entender que una proteína de tipo OmpA sea excretada en forma soluble debido a sus dominios hidrofóbicos y por tanto a su fuerte inserción en la membrana externa. En el caso de *E. coli* (Wai y col., 2003) y en nuestra cepa *S. vesiculosa* M7^T las proteínas tipo OmpA se han encontrado en el material extracelular integradas en VME. Por otra parte, el hecho de que se le atribuya a este tipo de proteína un alto poder emulsionante explicaría en parte la capacidad emulsionante que nosotros hemos encontrado también en el EPS de *S. vesiculosa* M7^T como comentaremos más adelante.

El análisis proteómico también reveló otras funciones potenciales de las proteínas identificadas en el mismo. Así, por ejemplo, se han identificado proteínas involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos, lo que sugiere la participación de las VME en la degradación de estos compuestos. Trabajos anteriores en bacterias gramnegativas, detectaron la presencia de proteínas tolerantes a solventes orgánicos (OstA) que pueden contribuir a la supervivencia de la bacteria mediante la reducción de compuestos tóxicos como el *n*-hexano (Post y col., 2005; Lee y col., 2007).

Un aspecto interesante del trabajo, ha sido el estudio proteómico de las VME de *S. livingstonensis* NF22^T a las temperaturas de 4 °C y 16 °C para determinar si la temperatura influía en el tipo de proteínas excretadas al medio. A baja temperatura las proteínas sobreexpresadas estaban relacionadas principalmente con funciones de transporte a nivel de membrana y fueron principalmente proteínas homólogas a receptores dependientes de TonB, porinas y precursores de proteínas periplásmicas de unión a fosfato. La inducción de estas proteínas en condiciones de frío podría ser una vía para contrarrestar el menor nivel de difusión de los solutos a bajas temperaturas. Cabe destacar un estudio realizado por Kawamoto y colaboradores, (2007), en el que se llevó a cabo un análisis proteómico global de proteínas inducidas por frío en la cepa *S. livingstonensis* Ac10. Dichos autores también observaron una sobreexpresión en frío de las proteínas implicadas en funciones de transporte a nivel de membrana.

Es un hecho conocido que existen bacterias que modulan la permeabilidad de sus membranas externas para adaptarse al medio ambiente. Algunas bacterias regulan la producción de porinas de membrana externa dependiendo del medio ambiente en que se encuentren. Por ejemplo: *Shewanella frigidimarina* NCIMB400R produce una porina inducible de membrana externa IfcO, bajo condiciones anaerobias (Reyes-Ramírez y col., 2003) y la cepa *Photobacterium profundum* SS9, produce OmpL bajo condiciones de alta presión hidrostática (Welch y Bartlett, 1996). Mientras que la inducción de OmpA y OmpC en *S. livingstonensis* Ac10 pueden contrarrestar la baja difusión de solutos que ocurre a bajas temperaturas y permitir la captación de nutrientes de manera más eficiente (Kawamoto y col., 2007).

Diversos autores han descrito la presencia de proteínas periplásmicas en los perfiles proteicos de VME como fosfatasa alcalina y AcrA (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995, 1996; Li y col., 1996; Horstman y Kuehn, 2000). También en nuestras cepas hemos detectado proteínas de periplasma como proteasas y peptidasas, lo cual es esperado teniendo en cuenta los mecanismos propuestos para describir el proceso de formación de las VME y comentados en el capítulo de la Introducción. El hecho de que algunas enzimas degradativas se encuentren en el interior de las VME permitiría liberarlas al medio de forma más concentrada y no quedarían diluidas en el entorno. Además, la capacidad de adhesión demostrada por algunas VME (Kadurugamuwa y Beveridge, 1996), permitiría que se adhirieran a sustratos y las enzimas

fueran liberadas y ejercieran su función degradativa. Nuestro grupo de trabajo, en estudios anteriores, también describió que las VME de la cepa *P. antarctica* NF₃^T, contenían proteínas periplásmicas, como las de unión específica a sulfatos (CysP) y a ferri-sideróforos (FepB), lo que sugeriría que juegan el papel de unirse a los nutrientes en el lumen de las VME enmascarando la concentración efectiva de estos y de este modo forzarían la entrada de más nutrientes al interior de la vesículas.

A temperaturas de 16 °C, también hemos podido observar la sobreexpresión del factor de elongación-traducción GTPasa, una proteína involucrada en la síntesis de proteínas, la cual ha sido identificada en VME de *S. livingstonensis* NF22^T, lo que sugiere que esta proteína citoplásmica es secretada a través de VME. Aunque se ha planteado que las VME están compuestas por lípidos y proteínas de membrana externa y periplásmicas, quedando excluidas las provenientes del citoplasma (Horstman y Kuehn, 2000), existen diversos análisis de las VME de cepas de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que revelan la presencia de proteínas citoplásmicas (Horstman y Kuehn, 2000; Bauman y Kuehn, 2006; Lee y col., 2007). Otros análisis proteómicos también muestran que las VME contienen proteínas procedentes del citoplasma de la célula (Molloy y col., 2000; Henry y col., 2004; Ferrari y col., 2006; Wei y col., 2006; Xu y col., 2006; Lee y col., 2007). Entre las proteínas citoplasmática asociadas a VME destacan por su abundancia proteínas ribosomales (S1 y L7/12) (Ferrari y col., 2006). La detección en el lumen de las VME de proteínas citoplásmicas y al mismo tiempo de ADN y ARN (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995, 1996), resulta difícil de explicar si se tiene en cuenta el proceso de formación de VME aceptado, a partir exclusivamente de la membrana externa. Se ha sugerido por parte de algunos autores, un modelo según el cual las VME durante su proceso de formación podrían arrastrar también a la membrana citoplásmica y parte de contenido citoplásmico (Dorward y col., 1989; Kadurugamuwa y Beveridge, 1995; Kolling y Matthews, 1999; Yaron y col., 2000). Este interesante debate no ha sido abordado en este trabajo y está siendo objeto de estudio por nuestro grupo en el marco de otra tesis doctoral.

Crecientes evidencias sugieren que cientos de proteínas, lípidos y material genético pueden ser secretados por la vía de las VME (Dorward y col., 1989; Horstman y Kuehn, 2000; Mashburn-Warren y Whiteley, 2006; Lee y col., 2007). En nuestro estudio, el número de

proteínas presuntamente identificadas no ha sido tan elevado probablemente porque de momento no disponemos de la secuencia del genoma de las bacterias estudiadas y la procedencia de las cepas y su estudio reciente hace que todavía se desconozcan muchas de las proteínas que producen. De hecho, en el estudio proteómico se han detectado un número considerable de proteínas poco caracterizadas y de función desconocida. Además, numerosos péptidos identificados que han mostrado un buen espectro de masas, no han presentado homología con ninguna proteína depositada hasta el momento en las bases de datos actuales.

3. Estudio de la actividad emulsionante en cultivos de bacterias de la Antártida adaptadas al frío

Las cepas estudiadas fueron aisladas a partir de muestras de agua y sedimentos marinos, procedentes de distintos puntos de la Antártida. El objetivo de este apartado ha sido realizar un primer muestreo de cepas para detectar su capacidad de producir actividad emulsionante frente al *n*-hexadecano.

Este primer estudio se realizó con aquellas cepas que presentaban un aspecto mucoso en su morfología colonial, ya que ello podía indicar que probablemente secretaban al medio abundante material extracelular. El material extracelular excretado por bacterias al medio exterior puede presentar distinta naturaleza pero generalmente tiene composición polisacáridica así como con frecuencia presenta propiedades emulsionantes. Son numerosos los ejemplos de emulsionantes bacterianos polisacáridicos descritos en la literatura y con aplicaciones biotecnológicas (Rosenberg y col., 1979; Lin y Casida, 1984; Talmont y col., 1991; Lee y col., 2000).

En el cribado se incluyeron cepas pertenecientes a distintos géneros bacterianos *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella* y *Marinobacter*. Muchos de estos géneros incluyen especies ya descritas en la literatura con capacidad para producir compuestos emulsionantes (Bozal y col., 1994; Rougeaux y col., 1996; Zanchetta y Guezennec, 2001; Mancuso Nichols y col., 2004; Nevot y col., 2008), pero en nuestro caso las cepas utilizadas eran nuevas y ello implica la posibilidad de encontrar nuevos emulsionantes. La única especie con la que el grupo ya había trabajado anteriormente era *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T (Bozal y col., 1994, 1997), la cual tiene la capacidad de

crecer a temperaturas que oscilan entre -4 y 30 °C y produce una gran cantidad de EPS que confiere a sus colonias un aspecto mucoso.

Este primer cribado se realizó haciendo crecer las cepas en un medio mínimo mineral (MM5) ya utilizado en estudios anteriores por Bozal y colaboradores, (1994). Este medio permitió buen crecimiento de la cepa *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T y la producción de abundante cantidad de EPS. Al no contener peptonas en su composición, no interfiere en la actividad emulsionante contra *n*-hexadecano. De todos modos, no todas las cepas ensayadas crecieron bien en este medio, así por ejemplo para *Psychrobacter fozii* NF23^T, *Psychrobacter luti* NF11^T y *Pseudomonas guineae* M8^T, el nivel de crecimiento fue muy bajo y el hecho de que no se detectara actividad emulsionante en los cultivos, no significa que en un medio más adecuado no pudiera detectarse esta actividad, aunque no se continuó el estudio con estas cepas. Para la bacteria halófila *Marinobacter guineae* M3B^T, se utilizó como medio de cultivo Caldo Marino (Difco), ya que no crece en MM5. En este caso, a pesar de que se obtuvo un buen crecimiento, no se detectó actividad emulsionante. Es evidente que el medio de cultivo empleado no sólo influye en el crecimiento, sino que también puede influir en la actividad emulsionante y puede ser que el Caldo Marino que es un medio con alto contenido en sales y otros componentes, pueda interferir en la detección de la actividad emulsionante (Gutiérrez y col., 2009). Por esta razón, no se continuaron los análisis con esta cepa y dicho medio.

El ensayo utilizado para la detección de actividad emulsionante frente al *n*-hexadecano es un ensayo estándar utilizado en numerosos estudios con este fin (Cooper y Goldenberg, 1987), ya que resulta fácil de realizar y es útil como primera aproximación. El material emulsionante producido por las bacterias puede acumularse alrededor de la células, formando una capa adherida a las células de tipo cápsula que puede alcanzar un considerable grosor, así como desprenderse parcialmente o liberarse completamente al medio de cultivo (Kachlany y col., 2001). Es por este motivo que se ensayó la actividad emulsionante en tres fracciones: en el cultivo completo, en el sobrenadante del cultivo una vez eliminadas las células por centrifugación y en una tercera fracción correspondiente al lavado de las células. Las bacterias que mostraron mayor capacidad emulsionante fueron las dos cepas del género *Pseudoalteromonas* (M4-2 y NF₃^T), así como las dos cepas del género *Shewanella* (NF22^T y M7^T) y para ambos géneros la actividad emulsionante fue mayor en la fracción

correspondiente al lavado de células lo que hacía pensar que estas cepas producían un material extracelular de tipo capsular que quedaba adherido a las células.

En este primer ensayo también se determinó la tensión superficial de los sobrenadantes ya que existen compuestos bacterianos que pueden comportarse simultáneamente como emulsionantes y tensoactivos. Los descensos de la tensión superficial no fueron notables, siendo los valores más bajos los obtenidos con la cepa de *Shewanella vesiculosa* M7^T y con *Pseudomonas deceptionensis* M1^T, aunque estos valores están lejos de valores encontrados en tensoactivos bacterianos que pueden llegar a ser de 30 mN/m⁻¹.

4. Estudio de la capacidad emulsionante de distintas fracciones del cultivo de bacterias de la Antártida adaptadas al frío

Como hemos indicado anteriormente, el estudio estructural mediante MET de las cepas antárticas y sus EPS, confirmó, en muchas de ellas, la presencia de abundantes VME y material capsular. Es por este motivo que se procedió a un segundo cribado para determinar si la capacidad emulsionante estaba ligada al material capsular o a la fracción de VME.

Los resultados mostraron que para las cepas de los géneros *Pseudoalteromonas* y *Shewanella* la actividad emulsionante era muy elevada tanto en la fracción capsular como en la de las VME, formando ambas fracciones emulsiones estables entre el 70 y 80%. Este hallazgo no resulta sorprendente ya que por una parte, la capacidad de numerosos exopolisacáridos de presentar actividad emulsionante es bien conocida y en algunos casos aplicada a la industria como es el caso del emulsan producido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Rosenberg y col., 1979) o el EPS de *Sphingomonas paucimobilis* (Ashtaputre y Shah, 1995). Por otra parte, la actividad emulsionante vinculada a VME, es más novedosa. En varios estudios se han descrito bioemulsificantes con alto peso molecular y compuestos por glicoproteínas o complejos de polisacáridos y proteínas (Kaplan y col., 1987; Gutiérrez y col., 2007a, 2009). Sin embargo, en estos trabajos no se han realizado estudios estructurales para detectar la presencia de VME que justificarían el contenido proteico de los bioemulsificantes. Un ejemplo altamente estudiado es el alasan, producido por *Acinetobacter radioresistens* KA53 (Toren y col., 2002). De hecho, fue el primer bioemulsificante para el cual se estableció que el componente activo era una proteína de membrana externa (OmpA). Los autores han publicado

que a pesar de presentar dominios altamente hidrofóbicos y estar por tanto bien insertada en la membrana externa, esta proteína OmpA, en esta bacteria y en otras de la misma especie se excretan al medio en forma soluble (Walzer y col., 2006). Ya hemos comentado que resulta difícil de entender que una proteína integral de membrana se excrete en forma soluble y más cuando se ha demostrado que proteínas análogas de OmpA en cepas patogénicas de *E. coli*, se excretan asociadas a VME (Wai y col., 2003). También en nuestro estudio proteómico hemos detectado una proteína OmpA asociada a las VME de *S. vesiculosa* M7^T, aunque de momento desconocemos si podría ser la responsable de la actividad emulsionante de la cepa. Nos inclinamos a pensar que la actividad emulsionante de estas cepas antárticas de *Pseudoalteromonas* y *Shewanella* depende de varios de los componentes presentes en los EPS. Debemos recordar también que resulta difícil determinar en qué fracción reside la actividad emulsionante, ya que las VME además del contenido proteico, arrastran en su superficie material capsular adherido a la membrana externa.

Por otra parte, las cepas antárticas analizadas del género *Pseudomonas* (M1^T) y *Marinobacter* (M3B^T) que no presentaron VME en su análisis estructural o mostraron un contenido muy bajo de las mismas, tampoco mostraron actividad emulsionante en la fracción obtenida para separar VME, lo cual confirmaría que algún componente de las mismas está efectivamente implicado en la actividad emulsionante.

Para todas las cepas analizadas la actividad emulsionante es mayor en la fracción del lavado de las células que en el sobrenadante, lo que también confirmaría qué parte de la actividad emulsionante es debida a material capsular que se arrastra en el proceso de lavado.

5. Estudio del crecimiento y actividad emulsionante de *Shewanella vesiculosa* M7^T

Durante el cribado de cepas de la Antártida para buscar agentes emulsionantes, destacó la nueva bacteria *Shewanella vesiculosa* M7^T por su habilidad de producir una buena emulsión frente al *n*-hexadecano durante su crecimiento en medio mínimo MM5. Estudios previamente realizados por Bozal y colaboradores, (2009), describen a la cepa *Shewanella vesiculosa* M7^T como una bacteria heterótrofa, gramnegativa, que forma colonias convexas y semimucoides o viscosas en medio sólido y crece en un rango de temperatura entre -4 y 30 °C y óptima entre 15 y 20 °C.

En el caso particular de la cepa *S. vesiculosa* M7^T, la actividad emulsionante se detectó durante el crecimiento y alcanzó su máximo al final de la fase estacionaria. Probablemente, la cepa acumula el complejo EPS descrito, a medida que crece y este EPS es el responsable de que la actividad emulsionante vaya aumentando. De todos modos, no hemos realizado de momento una cuantificación del EPS a lo largo de la curva de crecimiento. Similares resultados han sido descritos con otros EPS, como el E-382 obtenido a partir de la cepa *Flexibacter* sp. TG 382 (Gutiérrez y col., 2009), así como el EPS AE22 proveniente de la cepa marina *Antarctobacter* sp. TG22 (Gutiérrez y col., 2007b). En ambos casos se describe como la síntesis de los EPS ocurre durante el crecimiento celular y se mantienen también durante la fase estacionaria.

6. Caracterización química del material extracelular de *Shewanella vesiculosa* M7^T

Como se ha comentado anteriormente, una de las características que destacan de los EPS sintetizados por células bacterianas, es la diversidad que presentan en cuanto a su composición química. Por una parte cada especie bacteriana o género puede presentar capacidades metabólicas nuevas y por tanto, formar EPS nuevos en cuanto a composición y propiedades. Además, para una misma bacteria podemos también encontrar una considerable variabilidad en el EPS que puede ser atribuible a diferentes factores entre los que se encuentran, el medio de cultivo utilizado, las condiciones de crecimiento, o las propias técnicas analíticas empleadas, entre otros (Nielsen y Jahn, 1999). Normalmente, la naturaleza compleja de muchos EPS bacterianos implica que para proceder a su análisis químico se deben combinar diferentes técnicas analíticas (Wingender y col., 1999).

En el caso del EPS a partir de *S. vesiculosa* M7^T, su obtención se llevó a cabo a 10 °C, en un medio mínimo mineral y con glucosa como única fuente de carbono. Para la recuperación del EPS se utilizó el método de la centrifugación a alta velocidad que ha sido descrito como uno de los que proporciona un buen rendimiento de recuperación de materiales capsulares adheridos a la células, con una mínima lisis celular si se compara con otros métodos químicos y físicos de extracción de EPS como extracción alcalina o a altas temperaturas (Pal y Paul, 2008; Sheng y col., 2010; Donot y col., 2012).

Los primeros estudios de la composición química mostraron que la suma de carbohidratos totales, proteínas y lípidos no completaron el 100% de la muestra y la cantidad de ácidos nucleicos no se ha tenido en cuenta ya que fue muy baja. Este hecho aunque resulta sorprendente, ha sido descrito por varios autores al analizar diversos EPS bacterianos. Así por ejemplo, Gutiérrez y colaboradores, (2007b), al analizar el agente emulsionante AE22, obtenido a partir del polímero extracelular de la bacteria marina *Antarctobacter*, detectaron que sólo el 80% del polímero fue representado por los análisis químicos realizados. Este hecho que ocurre con frecuencia en otros EPS bacterianos (Ogawa y col., 2001), se ha atribuido a dos cuestiones esenciales, por un lado a la presencia de ácidos urónicos (Anton y col., 1988; Béjar y col., 1996) o a la presencia de enlaces glicosídicos de hexosaminas (Biermann, 1988). Estos compuestos pueden presentar alta resistencia a la degradación bajo las condiciones de hidrólisis ácidas utilizadas. Por otro lado, nuevos polímeros bacterianos pueden contener compuestos inusuales que resistan los métodos de detección usados en los estudios (Gutiérrez y col., 2007a).

En cuanto a la caracterización parcial del liofilizado de EPS de *S. vesiculosa* M7^T mediante técnicas cromatográficas, los resultados mostraron analogía respecto a la composición química de otros EPS, al presentar un perfil de azúcares típico de otras matrices exopoliméricas bacterianas, con presencia de hexosas como glucosa y galactosa, disacáridos como sacarosa y maltosa así como heptosas. Según los estudios de Kenne y Lindberg, (1983), muchos EPS secretados por bacterias están regularmente compuestos de complejas unidades químicas repetidas, las cuales pueden contener un número de azúcares unidas en un variedad de formas y pueden presentar ramificaciones. Estudios más recientes enuncian que la mayoría de los EPS son heteropolisacáridos que contienen de 3 a 4 monosacáridos diferentes, formando grupos de 10 o menos, para formar unidades repetidas (Decho, 1990) y entre los compuestos más frecuentes podemos encontrar pentosas (D-arabinosa, ribosa, xilosa) y hexosas (D-glucosa, manosa, galactosa, fucosa).

Como se ha comentado en la Introducción del trabajo, numerosos autores también han descrito la presencia de otros compuestos en las matrices exopoliméricas bacterianas. Así por ejemplo, aminoazúcares como D-glucosamina y galactosamina y también ácidos urónicos como el D-galacturónico y el D-glucurónico. Para el caso del EPS de *S. vesiculosa* M7^T, los

análisis realizados por HPLC permitieron detectar la presencia de altos valores de glucosamina. Esto nos conduce a pensar que probablemente la abundancia relativa de glucosamina en la muestra de EPS de *S. vesiculosa* M7^T, a pesar de no haberse detectado ácidos urónicos, pudieran ser la causa de no haber ocurrido una hidrólisis total del EPS y por consiguiente tenga que ver con la presencia de disacáridos en la muestra aún después de someterse durante 24 horas a la hidrólisis ácida. Este hecho estaría de acuerdo con el estudio de Gutiérrez y colaboradores, (2008), al analizar el EPS PE12 producido por la cepa *Pseudoalteromonas* sp. TG12, en el que describen que los altos niveles de glucosamina y ácidos urónicos contribuirían a detectar un bajo porcentaje de compuestos químicos respecto al peso total analizado.

Tal como se ha comentado anteriormente y como resultado del estudio estructural mediante microscopía electrónica (Figura 16), se pudo apreciar el aspecto complejo que presentaba el EPS de *S. vesiculosa* M7^T, el cual estaba integrado por material polimérico, acompañado de abundantes VME. Como estas vesículas proceden de la membrana externa bacteriana, cabía esperar detectar compuestos derivados de esta estructura. Tal fue el caso de la detección de compuestos como el ácido murámico y diaminopimélico. Este último es un aminoácido típico que conforman la pared celular de bacterias, mientras que diferentes estudios utilizan la presencia de ácido murámico como un indicador de los niveles de peptidoglicano (PG) al ser un constituyente del mismo (Findlay y col., 1983; Fox y Fox, 1991; Elmroth y col., 1993).

También se identificó mediante análisis electroforético de la fracción liofilizada de EPS, la presencia de lipopolisacárido (LPS), lo cual indica nuevamente que las VME derivan de la membrana externa bacteriana. El patrón de migración del LPS mostró forma de “escalera”, característico de un LPS tipo S, sugiriendo que los polímeros-O del LPS presentarían longitudes variables. Este tipo de patrón de LPS también ha sido caracterizado en otras cepas de *Shewanella* (Korenevsky y col., 2002). De acuerdo a estos autores, el patrón de LPS puede variar según la especie de *Shewanella* ensayada y en función de la temperatura de incubación, aunque en nuestro trabajo no hemos realizado más estudios relacionados con el LPS. Es interesante señalar que las fibras que se observan por MET alrededor de las VME de *S. vesiculosa* M7^T, podrían corresponder a los polímeros-O del LPS y/o también podrían corresponder a material polisacárido capsular. Se necesitaría realizar más estudios del LPS

de *S. vesiculosa* M7^T, pero la elevada longitud de las fibras visualizadas y la presencia de bandas localizadas en regiones superiores del gel de electroforesis que se tiñen también como carbohidratos, nos conduce a pensar que se trataría de material capsular. Resultados similares habían sido descritos por Nevot y colaboradores (2006a), con la cepa *P. antarctica* NF₃^T.

Otros compuestos detectados en los EPS bacterianos han sido lípidos, ácidos nucleicos y algunos compuestos inorgánicos (Frolund y col., 1996; Dignac y col., 1998; D'Abzac y col., 2010a,b). Si recordamos la imagen de MET de la Figura 16 del EPS de *S. vesiculosa* M7^T constituida mayoritariamente por VME, no debería sorprendernos el elevado contenido en lípidos detectado en este EPS. En este contexto, se detectaron la presencia de lípidos polares, mediante cromatografía en placa fina (TLC) en dos direcciones. Destacó la presencia de fosfatidiletanolamina (PE) respecto a otros fosfolípidos, lo que coincide con lo planteado anteriormente por Nevot y colaboradores, (2006a), con la cepa *P. antártica* NF₃^T, en la cual el perfil cromatográfico de los lípidos polares de VME estaba enriquecido por PE respecto a fosfatidilglicerol (PG). La fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol son los principales fosfolípidos que se han detectado en algunas especies de *Shewanella*, a pesar de que no hay muchos estudios al respecto (Tofin y col., 2004; Frolunda y col., 2005). Estos fosfolípidos se encuentran tanto en la membrana interna como en la externa bacteriana (Osborn y col., 1972), pero desconocemos el motivo por el cuál se produce un enriquecimiento de PE respecto a PG en el EPS que contiene mayoritariamente fosfolípidos procedentes de la membrana externa. Tampoco de momento, hemos caracterizado los otros lípidos del EPS detectados por TLC en el EPS de *S. vesiculosa* M7^T.

Además de la presencia de azúcares, lípidos y proteínas, también se detectó en el EPS de *S. vesiculosa* M7^T una pequeña concentración de ADN, aunque no se ha detallado en resultados. La presencia de ADN en los EPS extraídos de distintas bacterias ha sido descrito repetidamente (Kadurugamuwa y Beveridge, 1995, 1997; Beveridge y Kadurugamuwa, 1996; Li y col., 1996), pero su procedencia no está aún clara. Por una parte, podría proceder de cierta lisis celular ocurrida durante la propia obtención y extracción del EPS. Por otra parte, existen numerosos estudios que señalan que las propias VME contienen ADN, aunque no está claro cómo esta molécula del citoplasma puede llegar al interior de las VME que se forman a partir de la membrana externa sin incluir membrana interna ni contenidos citoplasmático

(Renelli y col., 2004). Este interesante aspecto relacionado con la presencia de material genético en las VME de *S. vesiculosa* M7^T está siendo objeto de estudio por parte de nuestro grupo.

En este estudio se demostró la variada y compleja composición química del EPS de *S. vesiculosa* M7^T, lo que nos sugiere un espectro amplio de propiedades y por consiguiente una valoración de posibles aplicaciones en distintos campos industriales (Weiner, 1997). En este aspecto, una de las primeras aplicaciones de los EPS microbianos se basó en que muchos muestran propiedades estabilizantes y formadores de geles, así como surfactantes, los cuales pueden ser utilizados en distintas industrias, lo que proporciona un aumento en la viscosidad y/o producir mejoras en la textura de ciertos productos (Navon-Venezia y col., 1995; Shepherd y col., 1995; Desai y Banat, 1997; Rosenberg y Ron, 1999; Gutiérrez y col., 2007 a,b, 2009).

En este contexto, la prospección de nuevas moléculas emulsionantes, principalmente en ambientes naturales relativamente inexplorados por el hombre, pueden revelar potencialmente nuevas propiedades fisicoquímicas (Weiner, 1997; Banat y col., 2000). Particularmente, los ecosistemas marinos han sido reconocidos como una rica fuente de EPS microbianos que pueden ser aprovechados y desarrollados para distintas aplicaciones comerciales (Sutherland, 1998).

Como se ha comentado anteriormente, durante la prospección realizada para detectar actividad emulsionante en distintas cepas marinas adaptadas al frío, se seleccionó *S. vesiculosa* M7^T, por su habilidad de producir una excelente emulsión contra *n*-hexadecano durante su crecimiento en medio mínimo líquido. Las emulsiones formadas utilizando el EPS liofilizado de *S. vesiculosa* M7^T, destacaron por mantenerse estables durante meses a temperatura ambiente, aunque en el apartado de resultados sólo se han mostrado los correspondientes a 48 horas.

Durante el proceso para determinar la actividad emulsionante, fueron empleados los controles positivos comerciales goma arábica y xantano. Es conocido, que la goma arábica es uno de los biopolímeros más empleados industrialmente ya que tiene la capacidad de formar y estabilizar

emulsiones de aceite en agua. Presenta un amplio rango de uso en aplicaciones biotecnológicas e industriales que abarcan desde la salud humana hasta productos para la alimentación así como farmacéuticos y textiles (Desai y Banat, 1997; Banat y col., 2000). Sin embargo, según Sanderson, (1990), este hidocoloide tiene un bajo rendimiento debido a que se necesitan concentraciones relativamente altas, hasta del 20% (p/v), para lograr un óptimo funcionamiento (Dickinson y col., 1988; Randall y col., 1988). En este trabajo, se realizaron los ensayos de actividad emulsionante a una baja concentración de EPS (0,02%) la cual fue suficiente para lograr emulsiones estables superiores a las obtenidas en las mismas condiciones con la goma arábica y el xantano, demostrando una mayor capacidad emulsionante. Este estudio ha sido similar al realizado por Gutiérrez y colaboradores, (2009), con el EPS AE22 obtenido a partir de la cepa marina *Antarctobacter* sp. TG22. Este nuevo biopolímero también mostró una buena capacidad emulsionante respecto a la goma arábica y al xantano pero las diferencias no fueron tan marcadas como las obtenidas con el EPS de *S. vesiculosa* M7^T.

El hecho de que el EPS obtenido a partir de *S. vesiculosa* M7^T mostrara una excelente actividad emulsionante frente a diferentes aceites comestibles, sugiere un potencial uso como agente emulsionante en la industria alimentaria.

Con respecto a las emulsiones formadas frente al *n*-hexadecano, se pudo apreciar que permanecieron estables durante varios meses a temperatura ambiente, lo que coincide con trabajos realizados por Gutiérrez y colaboradores, (2009), con el polímero E-382 proveniente de la cepa marina *Flexibacter* sp. TG382.

Algunos emulsionantes pueden presentar simultáneamente actividad surfactante, produciendo descensos en la tensión superficial (TS), por este motivo también evaluamos este parámetro en nuestro estudio. En el caso de *S. vesiculosa* M7^T, al crecer sobre un medio mínimo hemos descrito que va aumentando la actividad emulsionante del medio de cultivo, sin embargo no se observaron descensos significativos en la tensión superficial en soluciones del EPS en agua (0,02%), lo que sugiere que el emulsionante producido no presenta actividad surfactante. De hecho, no necesariamente la actividad emulsionante y surfactante están presentes en un mismo compuesto. Es conocido que algunas bacterias producen surfactantes de bajo peso

molecular que reducen la tensión interfacial y/o superficial de líquido y al mismo tiempo actúan como emulsionantes (Rosenberg y Ron, 1999; Haba y col., 2003), mientras que otros compuestos como el EPS TG382 de *Flexibacter* sp. son surfactantes de alto peso molecular pero actúan principalmente formando emulsiones estables de aceite en agua y no como tensoactivos (Rosenberg y Ron, 1997), este parece ser el caso del EPS de *S. vesiculosa* M7^T, el cual fue capaz de generar emulsiones estables, sin producir cambios significativos en la tensión superficial del medio de cultivo.

Resulta difícil explicar el mecanismo por el cual el EPS de *S. vesiculosa* M7^T ejerce su actividad emulsionante, dada su complejidad estructural que incluye polímeros solubles de alto peso molecular y abundantes VME.

En general, se han descrito dos mecanismos para explicar la capacidad de formar y estabilizar emulsiones por compuestos poliméricos de alto peso molecular solubles en agua (Gutiérrez y col., 2009). Por una parte, pueden aumentar la viscosidad de la fase continua de la emulsión, lo cual hace que las partículas dispersas en ella se mantengan separadas y no haya coalescencia de las mismas. Este sería el caso de la goma xantano altamente espesante. En segundo lugar, algunos polímeros se podrían adsorber a la interfase aceite-agua, lo cual sucedería en el caso de que estuvieran presentes proteínas anfipáticas o cadenas polisacáridicas con regiones hidrofóbicas. De hecho se han descrito EPS que presentarían ambos mecanismos como es el caso del emulsificante emulsan, que tiene un importante contenido proteico.

En el caso del EPS de *S. vesiculosa* M7^T, podría también presentar ambos mecanismos, ya que presenta actividad espesante y también componentes anfipáticos, como por ejemplo proteínas presentes en las VME de tipo porina (OmpA) que presentan actividad emulsionante y también el LPS presente en las VME y con características anfipáticas. La actividad emulsionante ligada a proteínas de membrana externa como OmpA ha sido descrita como ya hemos dicho por Walzer y colaboradores (2006). Un hecho sorprendente y difícil de entender del estudio de estos autores, es que aseguran que esta proteína de membrana se libera al medio en forma soluble, mientras que en otras bacterias como *E. coli*, su liberación siempre se ha producido a través de VME. Estos autores no han presentado ningún estudio estructural de la

matriz extracelular de la cepa *Acinetobacter radioresistens* KA53, que liberan OmpA, pero es muy probable que si lo hubieran hecho, habrían detectado que dicha proteína estaría insertada en pequeñas VME (20 nm) como sucede en *S. vesiculosa* M7^T y en otras bacterias gramnegativas.

En definitiva creemos que la actividad emulsionante que presenta el EPS de *S. vesiculosa* M7^T se debe a varios componentes que incluirían proteínas de membrana anfipáticas, el LPS de las propias VME y polisacáridos que ejercerían un efecto espesante estabilizador. Será necesario realizar otros estudios en un futuro para poder elucidar definitivamente el mecanismo emulsionante que presenta este complejo EPS.

VI.CONCLUSIONES

VI.CONCLUSIONES

1. El análisis estructural de las bacterias antárticas muestra que la mayoría, concretamente las cepas *Shewanella livingstonensis* NF22^T, *Shewanella vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4-2, *Psychrobacter fozii* NF23^T y *Marinobacter guineae* M3B^T, excretan abundante material extracelular que se puede observar correctamente mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) después de criofijación a alta presión (HPF) y criosustitución (FS).
2. El material extracelular observado en dichas bacterias es complejo y está formado por un polímero capsular alrededor de las células y una gran cantidad de vesículas de membrana externa (VME) inmersas en una red polimérica, siendo la primera vez que se describe la presencia de VME en bacterias gramnegativas pertenecientes a los géneros *Psychrobacter* y *Marinobacter*.
3. Las imágenes de MET y el perfil electroforético de las proteínas de las VME comparado con el de la membrana externa (ME) de las bacterias, confirman que las VME se forman a partir de dicha membrana externa. Asimismo, el estudio proteómico de las VME de *Shewanella livingstonensis* NF22^T y *Shewanella vesiculosa* M7^T, indica que la mayoría de proteínas identificadas son proteínas de membrana externa involucradas principalmente en el transporte y metabolismo de iones inorgánicos.
4. Para la cepa *Shewanella livingstonensis* NF22^T se ha demostrado que la temperatura influye en la producción de VME. A bajas temperaturas la cantidad de VME que produce la cepa es mayor, su tamaño es menor y más regular y el perfil electroforético muestra la expresión diferencial de algunas proteínas. A baja temperatura las proteínas sobreexpresadas están relacionadas con funciones de transporte a nivel de membrana, lo cual podría contrarrestar la baja difusión de solutos que ocurre en ambientes fríos y permitiría la captación de nutrientes esenciales de manera más eficiente.
5. Las cepas antárticas *Shewanella vesiculosa* M7^T, *Shewanella livingstonensis* NF22^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4-2, *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T, *Psychrobacter fozii* NF23^T, *Marinobacter guineae* M3B^T y *Pseudomonas deceptionensis* M1^T mostraron una

buena actividad emulsionante, ligada para la mayoría de ellas tanto al material capsular unido a las células como a la fracción de las VME.

6. El material extracelular (EPS) obtenido y purificado a partir de *Shewanella vesiculosa* M7^T presenta una actividad emulsionante frente a aceites comestibles mayor a la de los emulsionantes comercializados goma arábica y xantano y su caracterización ha revelado que contiene abundantes VME y polímeros polisacáridicos, siendo sus componentes químicos mayoritarios azúcares neutros y aminados, lípidos de membrana y aminoácidos.

VII.BIBLIOGRAFÍA

VII.BIBLIOGRAFÍA

1. Abboud, R., Popa, R., Souza-Egipsy, V., Giometti, C.S., Tollaksen, S., Mosher, J.J., Findlay, R.H., Neelson, K.H. (2005). Low-temperature growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2):811-6.
2. Abel, A., Sánchez, S., Arenas, J., Criado, M.T., Ferreirós, C.M. (2007). Bioinformatic analysis of outer membrane proteome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *Int. Microbiol.* 10(1):5-11.
3. Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422 (6928):198-207.
4. Alldredge, A.L., Silver, M.W. (1988). Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Prog. Oceanogr.* 20: 41-82.
5. Antón, J., Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F. (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferox mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2381-2386.
6. Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., Tallon, R., Quesada, E., Béjar, V. (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 7: 319-326.
7. Ashtaputre, A.A., Shah, A.K. (1995). Studies on the exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*-GS1: Nutritional requirements and precursor-forming enzymes. *Current Microbiology* 31 (4):234-238.
8. Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.
9. Battin, T.J., Sengschmitt, D. (1999). Linking sediment biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: Evidence from a large river. *Microb. Ecol.* 37: 185-196.
10. Bauman, S.J., Kuehn, M.J. (2006). Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes. Infect.* 8: 2400-8.
11. Béjar, V., Calvo, C., Moliz, J., Díaz-Martínez, F., Quesada, E. (1996). Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59: 77-86.
12. Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M.J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A.R., Serino, L., Gomes Moriel, D., Nesta, B., Fontana, M.R., Spagnuolo, A.,

- Pizza, M., Norais, N., Grandi, G. (2008). Proteomic characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* Δ tolR IHE3034 mutant. *Mol. Cell. Proteomics* 7: 473-485.
13. Bethell, D., Pollard, A.J. (2002). Meningococcal vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 1: 75-83.
14. Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J. L. (1996). Periplasm, periplasmic spaces, and their relation to bacterial wall structure: novel secretion of selected periplasmic proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 2: 1-8.
15. Beveridge, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L., Li, Z. (1997). Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 291-303.
16. Beveridge, T.J. (1999). Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181: 4725-4733.
17. Beveridge, T.J. (2006). Cryotransmission electron microscopy is enabling investigators to examine native, hydrated structures in bacteria and biofilms. *Microbe* 1: 279-284.
18. Bhaskar, P.V., Bhosle, N.B. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Curr. Sci.* 88(1): 45-53.
19. Biddanda, A.B. (1985). Microbial synthesis of macroparticulate matter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 20: 241-251.
20. Biermann, C.J. (1988). Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 46: 251-271.
21. Bozal, N., Manresa, A., Castellvi, J., Guinea, J. (1994). A new bacterial strain of Antarctica, *Alteromonas* sp. that produces a heteropolymer slime. *Polar Biol.* 14:561-567.
22. Bozal, N., Tudela, E., Roselló Mora, R., Lalucat, J., Guinea, J. (1997). *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov; isolated from antartic coastal environment. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 47: 345-351.
23. Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., Jiménez, F., Guinea, J. (2002). *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 195-205.
24. Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., Guinea, J. (2003). Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1093-1100.

25. Bozal, N., Montes, M.J., Mercadé, E. (2007). *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2609-2612.
26. Bozal, N., Montes, M.J., Miñana-Galbis, D., Manresa, A., Mercadé, E. (2009). A new psychrotolerant bacterium isolated from Antarctic coastal area: *Shewanella vesiculosa* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:336-340.
27. Bradford, M.M. (1976). A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
28. Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13: 20-26.
29. Bremner, J.M. (1965). Total nitrogen. In: C.A. Black (Ed.). *Methods of Soil Analysis, Part 2*, American Society of Agronomy, Madison, pp. 1149-1178.
30. Briat, J.F. (1992). Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2475-2483.
31. Brown, M.J., Lester, J.N. (1980). Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:107-85.
32. Caron, D.A. (1987). Grazing of attached bacteria by heterotrophic microflagellates. *Microb. Ecol.* 13:203-218.
33. Carrión, O., Miñana-Galbis, D., Montes, M.J., Mercadé, E. (2011). *Pseudomonas deceptionensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from the Antarctic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2401-2405.
34. Chesterton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.* 238:86-95.
35. Choi, D.S., Kim, D.K., Choi, S.J., Lee, J., Choi, J.P., Rho, S., Park, S.H., Kim, Y.K., Hwang, D., Gho, Y.S. (2011). Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomic* 11 (16): 3424-3429.
36. Christensen, B.E., Kjosbakken, J., Smidsrod, O. (1985). Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:837-845.
37. Ciofu, O., Beveridge, T.J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., Hoiby, N. (2000). Chromosomal betalactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:9-13.

38. Cirigliano, M.C., Carman, G.M (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 48(4):747-750.
39. Collic-Jouault, S., Chevolet, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Siquin, C., Roger, O., Fischer, A.M. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. Biochimica et Biophysica Acta 1528:141-151.
40. Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. (1987). Surface -active gents from two *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 53:224-229.
41. Corpe, W.A. (1970). An acid polysaccharide produced by primary film forming bacteria. Dev. Ind. Microbiol. 16:249-255.
42. Costerton, J.W. (1974). Structure and function of the cell envelope of gramnegative bacteria. Bacteriol. Rev. 38:87-110.
43. Costerton, J.W. (1999). The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease (Reprinted from Developments in Industrial Microbiology, vol 26: 249-261, 1985 J. Ind. Microbiol. Biot. 22:551-563.
44. D'Abzac, P., Bordas, F., Joussein, E., van Hullebusch, E., Lens, P.N.L., Guibaud, G. (2010a). Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludge. Environ. Sci. Technol. 44:412-8.
45. D'Abzac, P., Bordas, F., van Hullebusch, E., Lens, P.N.L., Guibaud, G. (2010b). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:1589-99.
46. Deatherage, B.L., Lara, J.C., Bergsbaken, T., Rassouljian Barrett, S.L., Lara, S., Cookson, B.T. (2009). Biogenesis of bacterial membrane vesicles. Mol. Microbiol. 72:1395-407.
47. de Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R., Stal, L.J. (2005). Biogenic stabilization of intertidal sediments: The importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. Microb. Ecol. 49:501-512.
48. Decho, A.W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. In Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. (Eds. Barnes, M.) Aberdeen Univ Press, Aberdeen, 73-153.

49. Decho, A.W., López, G.R. (1993). Exopolymer microenvironments of microbial flora multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnol. Oceanogr.* 38:1633-1645.
50. Decho, A.W., Herndl, G.J. (1995). Microbial activities and the transformation of organic matter within mucilaginous material. *Sci. Total Environ.* 16533-42.
51. Desai, J.D., Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 61:47-64.
52. Deslauriers, M., ni Eidhin, D., Lamonde, L., Mouton, C. (1990). SDS-PAGE analysis of protein and lipopolysaccharide of extracellular vesicles and Sarkosyl-insoluble membranes from *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology* 5: 1-7.
53. Devoe, I.W., Gilchrist, J.E. (1973). Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J. Exp. Med.* 138: 1156-1167.
54. Dickinson, E., Murray, B.S., Stainsby, G. (1988). Protein adsorption at air-water and oil-water interfaces. In: Dickinson E, Stainsby G, editors. *Advances in food emulsions and foams*. London: Elsevier, pp.123-62.
55. Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P. (1998). Chemical description of extracellular polymeric substances: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci. Technol.* 38(8-9):45-53.
56. Dohnalkova, A.C., Marshall, M.J., Arey, B.W., Williams, K.H., Buck, E.C., Fredrickson, J.K. (2011). Imaging hydrated microbial extracellular polymers: comparative analysis by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(4):1254-62.
57. Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* 87: 951- 962.
58. Dorward, D.W., Garon, C.F., Judd, R.C. (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 171:2499–505.
59. Dubern, J.F., Diggle, S.P. (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol. Biosyst.* 4:882-88.
60. Dubochet, J., McDowall, A.W., Menge, B., Schmid, E.N., Lickfeld, K.G. (1983). Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria. *J. Bacteriol.* 155(1):381-390.

61. Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21:129-228.
62. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.
63. Dubreucq, G., Domon, B., Fournet, B. (1996). Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Res.* 290: 175-181.
64. Dudman, W.F. (1977). The role of surface polysaccharides in natural environments. In *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell*, (Ed, Sutherland, I.W.) Academic Press, NY, pp. 357-414.
65. Dutta, S., Iida, K., Takade, A., Meno, Y., Nair, G.B., Yoshida, S. (2004). Release of shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and in vitro effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol. Immunol.* 48: 965-969.
66. Ellis, T.N., Kuehn, M.J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:81-94.
67. Elmroth, I., Fox, A., Larsson, L. (1993). Determination of bacterial muramic acid by gas chromatography-mass spectrometry with negative-ion detection. *J. Chromatogr.* 628:93-102.
68. Fairbanks, G., Sleck, T.L., Wallach, D.M. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* 10:2606-2617.
69. Ferrari, G., Garaguso, I., Adu-Bobie, J., Doro, F., Taddei, A.R. (2006). Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* Δ *gna33* mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics* 6:1856-66.
70. Findlay, R.H., Moriarty, D.J.W., White, D.C. (1983). Improved method of determining muramic acid from environmental-samples. *Geomicrobiology Journal.* 3: 135–150.
71. Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T.L.; Solcia, E. (1999). Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway

- and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J. Pathol.* 188: 220-226.
72. Flemming, H.C., Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 43:1-8.
73. Flemming, H.C., Leis, A. (2002). Sorption properties of biofilms. In: Flemming, H.C., Bitton, G., editors biofilms, vol 5. *Encyclopedia of environmental microbiology*; pp. 2958-67.
74. Fletcher, M., Floodgate, G.D. (1973). An electron-microscope demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 74: 325-334.
75. Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226(1):497-509.
76. Fox, A., Fox, K. (1991). Rapid elimination of a synthetic adjuvant peptide from the circulation after systemic administration and absence of detectable natural muramyl peptides in normal serum at current analytical limits. *Infect. Immun.* 59:1202-1207.
77. Frías, A., Manresa, A., de Oliveira, E., López-Iglesias, C., Mercadé, E. (2010). Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted antarctic bacteria. *Microbial Ecology* 59:476-486.
78. Frolova, G.M., Pavel, K.G., Shparteeva, A.A., Nedashkovskaya, I., Gorshkova, N.M, Ivanova, E.P., Mikhailov, V.V (2005). Lipid composition of novel *Shewanella* species isolated from far eastern seas. *Microbiology* 74 (6): 664-669.
79. Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 30:1749-58.
80. Gounot, A.M. (1999). Microbial life in permanently cold soils. In: Cold adapted organisms. Ecology, physiology, enzymology and molecular biology. Margesin, R., Schinner, F. (Eds.) Springer-Verlag, Berlín Heidelberg pp.3-15.
81. Graham, L.L., Harris, R., Villiger, W., Beveridge, T.J. (1991). Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *J Bacteriol.* 173 (5): 1623-1633.
82. Graham, L.L. (1992). Freeze-substitution studies of bacteria. *Electron Microsc. Rev.* 5(1):77-103.

83. Grenier, D., Mayrand, D. (1987). Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity* 55: 111-117.
84. Guine, V., Spadini, L., Sarret, G., Muris, M., Delolme, C., Gaudet, J.P. (2006). Zinc sorption to three gram-negative bacteria: combined titration, modeling, and EXAFS study. *Environ. Sci. Technol.* 40:1806-13.
85. Gutiérrez, T., Mulloy, B., Black, K., Green, D.H. (2007a). Glycoprotein emulsifiers from two marine *Halomonas* species: chemical and physical characterization. *J. Appl. Microbiol.* 103:1716-27.
86. Gutiérrez, T., Mulloy, B., Bavington, C., Black, K., Green, D.H. (2007b). Partial purification and chemical characterization of a glycoprotein (putative hydrocolloid) emulsifier produced by a marine bacterium *Antarctobacter*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1017-26.
87. Gutiérrez, T., Shimmield, T., Haidon, C., Black, K., Green, D.H. (2008). Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. strain TG12. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (15):4867-76.
88. Gutiérrez, T., Leo, V.V, Walker, G.M., Green, D.H. (2009). Emulsifying properties of a glycoprotein extract produced by a marine *Flexibacter* species strain TG382. *Enz. Microb. Tech.* 45:53-57.
89. Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Infante, M.R., Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2. *Biotechnol. Bioeng.* 81(3):316-22.
90. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2):95-108.
91. Harder, W., Dijkhuizen L. (1983). Physiological responses to nutrient limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:1-23.
92. Hargens, A.R., Shabica, S.V. (1973). Protection against lethal freezing temperatures by mucus in an Antarctic limpet. *Cryobiology* 10: 331-337.
93. Harris, R.H., Mitchell, R. (1973). The role of polymers in microbial aggregation. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 27-50.
94. Harris, J.R. (1997). Negative staining and cryoelectron microscopy: The thin film techniques. *RMS Microscopy Handbook*, No. 35. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.Oxford.

95. Heczko, U., Smith, V.C., Mark Meloche, R., Buchan, A.M., Finlay, B.B. (2000). Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes Infect.* 2(14):1669-76.
96. Henry, T., Pommier, S., Journet, L., Bernadac, A., Gorvel, J.P., Llobes, R. (2004). Improved methods for producing outer membrane vesicles in gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* 155:437-46.
97. Hitchcock, P.J., Brown, T.M. (1983). Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154(1):269-277.
98. Hoekstra, D., van der Laan, J.W., de Leij, L., Witholt, B. (1976). Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 455:889-899.
99. Holmstrom, C., Kjelleberg, S. (1999). Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 285-293.
100. Horstman, A.L., Kuehn, M.J. (2000). Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 275:12489-96.
101. Hu, Z.Q., Jin, J., Abruna, H.D., Houston, P.L., Hay, A.G., Ghiorse, W.C. (2007). Spatial distributions of copper in microbial biofilms by scanning electrochemical microscopy. *Environ. Sci. Technol.* 41:936-41.
102. Hunter, R.C., Beveridge, T.J. (2005). High-resolution visualization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms by freeze-substitution transmission electron microscopy. *J. Bacteriol.* 187(22):7619-30.
103. Inagaki, S., Onishi, S., Kuramitsu, H.K., Sharma, A. (2006). *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*." *Infect. Immun.* 74:5023-28.
104. Jericho, M., Stoica, O., Beveridge, T.J. (2004). Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186:2281-2287.
105. Kachlany, S.C., Lavery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W., Ghiorse, W.C. (2001). Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ. Microbiol.* 3(12):774-84.

106. Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177: 3998-4008.
107. Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J. (1996). Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J. Bacteriol.* 178:2767-74.
108. Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 615-621.
109. Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J. (1999). Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria. *Microbiology* 145: 2051-2060.
110. Kahn, M.E., Maul, G., Goodgal, S.H. (1982). Possible mechanism for donor DNA binding and transport in *Haemophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:6370-6374.
111. Kaplan, H.B., Greenberg, E.P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163:1210-1214.
112. Kaplan, D., Christiaen, D., Arad, S. (1987). Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2953-2956.
113. Kato, S., Kowashi, Y., Demuth, D.R. (2002). Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb. Pathog.* 32:1-13.
114. Kawahara, K., Isshiki, Y., Dejsirilert, S., Ezaki, T., Zähringer, U. (1996). Chemical structure of the core region of the lipopolysaccharide isolated from *Burkholderia cepacia* and *B. pseudomallei*. *J. Endotoxin. Res.* 3 (Suppl. 1), 35.
115. Kawamoto, J.; Kurihara, T.; Kitagawa, M.; Kato, I.; Esaki, N. (2007). Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins. *Extremophiles*, 11 (6): 819-826.
116. Kenne, L., Lindberg, B. (1983). Bacterial polysaccharides. In *The Polysaccharides*, Vol. 2 (Ed, Aspinall, G. O.) Academic Press, NY, pp. 287-363.
117. Kennedy, A.F.D., Sutherland, I.W. (1987). Analysis of bacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9:12-19.

118. Kesty, N.C., Kuehn, M.J. (2004). Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 279: 2069-2076.
119. Kirst, G.O., Wiencke, C. (1995). Ecophysiology of polar algae. *J. Phycol.* 31: 181-19.
120. Knight, C.A., DeVries, A.L. (1994). Effects of polymeric, nonequilibrium 'antifreeze' upon ice growth from water. *J. Crystal Growth.* 143:301-310.
121. Knox, K.W., Vesik, M., Work, E. (1966). Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 92: 1206-1217.
122. Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H., Horikoshi, K. (2000). Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *J. Bacteriol.* 182: 6451-6455.
123. Koebnik, R. (2005). TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol.* 13(8):343-7.
124. Kolling, G.L., Matthews, K.R. (1999). Export of virulence genes and shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1843-48.
125. Korenevsky, A., Vinogradov, E., Gorby, Y.; Beveridge, T.J. (2002). Characterization of the lipopolysaccharides and capsules of *Shewanella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4653-4657.
126. Koukkou, A.I (2011). *Microbial Bioremediation of Non-metals: Current Research.* Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-83-7.
127. Krembs, C., Gradinger, R., Spindler, M., (2000). Implications of brine channel geometry and surface area for the interaction of sympagic organisms in Arctic sea ice. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 243 (1): 55-80.
128. Krembs, C., Engels, A. (2001). Abundance and variability of microorganisms and transparent exopolymer particles across the ice-water interface of melting first-year sea ice in the Laptev Sea (Arctic). *Marine Biology* 138:173-185.
129. Krembs, C., Eicken, H., Junge, K., Deming, J.W. (2002). High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep-Sea Res. Part I* 49:2163-2181.
130. Krembs, C., Deming, J. (2008). The role of exopolymers in microbial adaptation to sea-ice. In: Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.C., Gerday, C. (eds.) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology.* Springer Verlag, Berlin, pp. 247-264.

131. Krembs, C., Eicken, H., Deming, J.W. (2011). Exopolymer alteration of physical properties of sea ice and implications for ice habitability and biogeochemistry in a warmer Arctic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(9): 3653-3658.
132. Kuehn, M.J., Kesty, N.C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genus Dev.* 19: 2645-2655.
133. Kulp, A., Kuehn, M.J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:163-84.
134. Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides-a perception. *J. Basic Microbiol.* 47: 103-117.
135. Kwon, S.O., Gho, Y.S., Lee, J.C., Kim, S.I. (2009). Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 297(2):150-156.
136. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
137. Lapidou, C.S., Rittmann, B.E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* 36:2711-20.
138. Laurienzo, P. (2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar Drugs* 8 (9): 2435-2465.
139. Lecomte du Noüy, P. (1919). A new apparatus for measuring surface tension. *J. Gen. Physiol.* 20,1(5): 521-524.
140. Lee, J.Ch., Lee, K.Y. (2000). Emulsification using environmental compatible emulsifiers and de-emulsification using D.C. field and immobilized *Nocardia amarae* *Biotechnology Letters* 22: 1157-1163.
141. Lee, H.K., Chun, J., Moon, E.Y., Ko, S.H., Lee, D.S., Lee, H.S., Bae, K. S. (2001). *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 661-666.
142. Lee, E.Y., Bang, J.Y., Park, G.W., Choi, D.S., Kang, J.S., Kim, H.J. (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* 7: 3143–3153.
143. Lee, E.Y., Choi, D.S., Kim, K.P., Gho, Y.S. (2008). Proteomics in Gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spec. Rev.* 27:535-555.

144. Lee, J.Ch., Lee, E.J., Lee, J.H, Jun, S.H., Choi, Ch.W., Kim, S.I., Kang, S.S., Hyun, S. (2012). *Klebsiella pneumonia* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. FEMS Microbiol. Lett. 331 (1): 17-24.
145. Li, Z., Clarke, A., Beveridge, T.J. (1996). A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: Subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. J. Bacteriol. 178: 2479-2488.
146. Li, X., Logan, B. (2004). Analysis of bacterial adhesion using a gradient force analysis method and colloid probe atomic force microscopy. Langmuir 20:8817-22.
147. Lin, C.C., Casida Jr, L.E. (1984). Gelrite as a gelling agent in media for growth of thermophilic microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 47:427-29.
148. Liu, H., Fang, H.H.P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. J. Biotechnol 95:249-56.
149. Liu, Y.Q., Liu, Y., Tay, J.H. (2004). The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65:143-8.
150. Llarch, A., Logan, N.A., Castellvi, J., Prieto, M. J., Guinea, J. (1997). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. Microb. Ecol. 34: 58-65.
151. Loaec, M., Olier, R., Guezennec, J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. Water Res. 31:1171-1179.
152. Loeb, M.R., Kilner, J. (1979). Effect of growth medium on the relative polypeptide composition of cellular outer membrane and released outer membrane material in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 137(2):1031-1034.
153. Logan, B.E., Hunt, J.R. (1987). Advantages to microbes of growth in permeable aggregates in marine systems. Limnol. Oceanogr. 32:1034-1048.
154. Lovley, D.R. (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation". Nature Reviews Microbiology. 1 (1): 35-44.
155. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1):265-75.
156. Madsen, B.L. (1974): A note on the food of *Amphinemura sulcicollis*. Hydrobiologia 45: 169-175.

157. Manca, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (1996). Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. Appl. Environ. Microbiol. 62:3265-9.
158. Mancuso Nichols, C.A., Garon, S., Bowman, J. P., Raguénès, G., Guezennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. J. Appl. Microbiol. 96:1057-1066.
159. Mancuso Nichols, C.A., Guezennec, J., Bowman, J.P. (2005). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: A review. Mar. Biotechnol. 7:253-271.
160. Margesin, R., Jud, M., Tschërko, D., Schinner, F. (2009). Microbial communities and activities in alpine and subalpine soils. FEMS Microbiol. Ecol. 67 (2): 208-218.
161. Marshall, K.C. (1985). Mechanisms of bacterial adhesion at solid water interfaces. In: Bacterial adhesion. D.C. Savage and M. Fletcher, ed. Plenum Press, New York, NY. pp.133-161.
162. Mashburn-Warren, L.M., Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. Nature 437:422-25.
163. Mashburn-Warren, L.M., Whiteley, M. (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. Mol. Microbiol. 61: 839-846.
164. Mashburn-Warren, L.M., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F. (2008). Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. Mol. Microbiol. 69:491-502.
165. McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., Kuehn, M.J. (2006). Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. J. Bacteriol. 188 (15): 5385-5392.
166. McBroom, A.J., Kuehn, M.J. (2007). Release of outer membrane vesicles by gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. Mol. Microbiol. 63:545-58.
167. Meiners, K., Gradinger, R., Fehling, J., Civitarese, G., Spindler, M. (2003). Vertical distribution of exopolymer particles in sea ice of the Fram Strait (Arctic) during autumn. Mar. Ecol. Prog. Ser. 248:1-13.

168. Meiners, K., Brinkmeyer, R., Granskog, M.A., Lindfors, A. (2004). Abundance, size distribution and bacterial colonization of exopolymer particles in Antarctic sea ice (Bellingshausen Sea) *Aquat. Microb. Ecol.* 35:283-296.
169. Minnikin, D.E., Collins, M.D., Goodfellow, M. (1979). Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 87-95.
170. Molloy, M. P., Herbert, B. R., Slade, M.B., Rabilloud, T., Nouwens, A.S., Williams, K. L., Gooley, A.A. (2000). Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 267: 2871-2881.
171. Montes, M.J., Belloch, C., Galiana, M., Garcia, M.D., Andrés, C., Ferrer, S., Torres-Rodriguez, J.M., Guinea, J. (1999). Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 22(1):97-105.
172. Montes, M.J., Mercadé, E., Bozal, N., Guinea, J. (2004). *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1521-1526.
173. Montes, M.J., Bozal, N., Mercadé, E. (2008). *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from Antarctic environment *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1346-1349.
174. Morin, A. (1998). Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production and recovery of microbial polysaccharides. S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides-structural diversity and functional versatility*, Marcel Dekker Inc., NY, pp. 275-296.
175. Morris, D. L. (1948). Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107:254-5.
176. Murase, N. (1992). Ice crystallization in biological systems. In: Maeno, N., Hondoh, T. (Eds.). *Physics and Chemistry of ice*. Hokkaido University Press, Sapporo, pp. 245-248.
177. Muryoi, N., Sato, M., Kaneko, S., Kawahara, H., Obata, H. (2004). Cloning and expression of *afpA*, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GF12-2. *J. Bacteriol.* 186: 5661-5671.

178. Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z. Rosenberg, E. (1995). Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbiol. 61 (9): 3240-3244.
179. Nevot, M., Deroncele, V., López-Iglesias, C., Bozal, N., Guinea, J., Mercadé, E. (2006a). Ultrastructural analysis of the extracellular matter secreted from the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T. Microb. Ecol. 51: 501-507.
180. Nevot, M., Deroncelé, V., Messner, P., Guinea, J., Mercadé, E., (2006b). Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T. Environ. Microbiol. 8:1523-1533.
181. Nevot, M., Deroncele, V., Montes, M.J., Mercadé, E. (2008). Effect of incubation temperature on growth parameters of *Pseudoalteromonas antarctica* NF₃^T and its production of extracellular polymeric substances. J. Appl. Microbiol. 105: 255-263.
182. Nielsen, P.H., Jahn, A. (1999). Extraction of EPS. (In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. Eds). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; pp. 49-72. Chapter 3.
183. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(4):593-656.
184. Nowotny, A., Behling, U.H., Hammond, B., Lai, C.H., Listgarten, M., Pham, P.H., Sanavi, F. (1982). Release of toxic microvesicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infection and Immunity 37: 151-154.
185. Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K., Benner, R. (2001). Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. Science. 4; 292(5518):917-20.
186. Omoike, A., Chorover, J. (2004). Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: aqueous chemistry and adsorption effects. Biomacromolecules 5:1219-30.
187. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., Carson, J. (1972). Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. J. Biol. Chem. 25; 247(12):3962-3972.
188. Paerl, H.W. (1975). Microbial attachment to particles in marine and freshwater ecosystems. Microbial Ecology 2 :75-83.

189. Pal, A., Paul, A.K. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48 (1): 49-64.
190. Panikov, N.S., Sizova, M.V. (2007). Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to -35 °C. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59 (2): 500-512.
191. Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8789-8793.
192. Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260:1127-1130.
193. Patrick, S., McKenna, J.P., O'Hagan, S., Dermott, E. (1996). A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb. Pathog.* 20(4):191-202.
194. Pavlova, K., Panchev, I., Krachanova, M., Gocheva, M. (2009). Production of an exopolysaccharide by Antarctic yeast. *Folia Microbiol.* 54 (4): 343-348.
195. Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P. (1995). A second *N*-acyl homoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1490-1494.
196. Pearson, J.P., Van Delden, C., Iglewski, B.H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181:1203-1210.
197. Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., Martín, D., Muriel, E., Antequera, T. (2008). Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry* 110 (4):1025-1029.
198. Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signalling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11229-11234.
199. Pierson, T., Matrakas, D., Taylor, Y.U., Manyam, G., Morozov, V.N., Zhou, W., van Hoek, M.L. (2011). Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 4;10(3):954-67.

200. Posey, J.E., Gherardini, F.C. (2000). Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 288:1651-1653.
201. Post, D.M., Zhang, D., Eastvold, J.S., Teghanemt, A., Gibson, B.W., Weiss, J.P. (2005). Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Biol. Chem.* 280:38383-38394.
202. Puig, M., Fusté, C., Viñas, M. (1993). Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 39:108-111.
203. Raguénès, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P., Barbier, B. (1997). *Vibrio diabolicus* sp.nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:989-995.
204. Ramadan, H.H. (2006). Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 14(3): 183-186.
205. Randall, R.C., Phillips, G.O., Williams, P.A. (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocoll.* 2:131-40.
206. Raunkjær, K., Hvitved-Jacobsen, T., Nielsen, P.H. (1994). Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Res.* 28:251-61.
207. Raymond, J.A., Fritsen, C.H. (2000). Ice-active substances associated with Antarctic freshwater and terrestrial photosynthetic organisms. *Antarct. Sci.* 12: 418-424.
208. Raymond, J.A., Fritsen, C., Shen, K. (2007). An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61:214-221.
209. Raymond, J.A., Christner, B.C., Schuster, S.C. (2008). A bacterial ice-binding protein from the Vostok ice core. *Extremophiles* 12:713-717.
210. Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., Beveridge, T.J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential *Microbiology* 150: 2161-2169.
211. Reyes-Ramirez, F., Sawers, R.G., Richardson, D.J. (2003). Characterization of the transcriptional regulation of *Shewanella frigidimarina* iron-induced flavocytochrome c reveals a novel iron-responsive gene regulation system. *J. Bacteriol.* 185: 4564-4571.
212. Riedel, A., Michel, C., Gosselin, M. (2006). Seasonal study of sea-ice exopolymeric substances on the Mackenzie shelf: Implications for transport of sea-ice bacteria and algae. *Aquat. Microb. Ecol.*, 45: 195-206.

213. Roberson, E.B., Firestone, M.K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1284-1291.
214. Roos, Y.H. (1995). Water and phase transitions. In: *Phase Transitions in Foods* (Edited by Roos, Y.H.). Academic Press, N.Y. pp 73-107.
215. Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., Gutnick, D.L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(3):402-408.
216. Rosenberg, E. (1993). Microbial diversity as a source of useful biopolymers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 11:131-137.
217. Rosenberg, E., Ron, E. Z. (1997). Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:31-36.
218. Rosenberg, E., Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:154-62.
219. Rothfield, L., Pearlman-Kothencz, M. (1969). Synthesis and assembly of bacterial membrane components. A lipopolysaccharide-phospholipid-protein complex excreted by living bacteria. *J. Mol. Biol.* 44: 477-492.
220. Rougeaux, H., Pichon, R., Kervarec, N., Raguénès, G.H.C., Guezennec, J.G. (1996). Novel bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Polym.* 31:237-242.
221. Rounick, J.S., Winterbourn, M.J. (1983). The formation, structure and utilization of stone surface organic layers in two New Zealand streams. *Freshwater Biol.* 13:57-72.
222. Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C., Mosquera, A., Chaves, F., Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55(7):3084-90.
223. Rysgaard, S., Glud, R.N., Sejr, M.K., Bendtsen, J., Christensen, P.B. (2007). Inorganic carbon transport during sea ice growth and decay: A carbon pump in polar seas. *J. Geophys. Res.* 112:C03016.
224. Sanclement, J.A., Webster, P.L., Thomas, J., Ramadan, H.H. (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 115: 578-82.

225. Sanderson, G.R. (1990). The functional properties and application of microbial polysaccharides-a supplier's view. In: Phillips, G.O., Wedlock, D.J., Williams, P.A., editors. Gums and stabilizers for the food industry, (5). Oxford: IRL; pp.333-9.
226. Schooling, S.R., Beveridge, T.J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* 188:5945-57.
227. Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P.(2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185: 2066-2079.
228. Sen, R. (2008). Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6): 714-724.
229. Shah, V., Ray, A., Garg, N., Madamwar, D. (2000). Characterization of the extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions. *Curr. Microbiol.* 40: 274-278.
230. Sheng, G.P., Yu, H.Q., Yu, Z. (2005). Extraction of the extracellular polymeric substances from a photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:125-30.
231. Sheng, G.P., Yu, H.Q. (2006). Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using 3-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Res.* 40:1233-9.
232. Sheng, G.P.; Yu, H.Q., Li, X.Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances* 28: 882-894.
233. Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I.W., Roller, S. (1995). Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.* 40:207-217.
234. Siddiqui, K.S., Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75:403-33.
235. Slater, M., Schaechter, M. (1974). Control of cell division in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38:199-221.
236. Smedes, F., Askland, T.K. (1999). Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin* 38:193-201.

237. Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30 (7): 1190-1206.
238. Spath, R., Flemming, H.C., Wuertz, S. (1998). Sorption properties of biofilms. *Water Sci. Technol.* 37(4-5):207-10.
239. Stukalov, O., Korenevsky, A., Beveridge, T.J., Dutcher, J.R (2008). Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5457-5465.
240. Sullivan, C.W., Palmisano, A.C. (1984). Sea ice microbial communities: Distribution, abundance, and density of ice bacteria in McMurdo Sound, Antarctica, in 1980. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 788-796.
241. Sutherland, I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microbial. Phys.* 8:143-213.
242. Sutherland, I.W. (1977). Microbial exopolysaccharide synthesis. In *Extracellular Microbial Polysaccharides*, Vol. 45 (Eds, Sanford, P.A. and Laskin, A.) American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 40-57.
243. Sutherland, I.W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 12:393-448.
244. Sutherland, I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *TIBTECH*, 16: 41-46.
245. Sutherland, I.W. (1999). Polysaccharases for microbial polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* 38: 319-328.
246. Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology-(UK)* 147:3-9.
247. Talmont, F., Vincent, P., Fontaine, T., Guezennec, J., Prieur, D., Fournet, B. (1991). Structural investigation of an industrial exopolysaccharide from a deep-sea hydrothermal vent marine bacteria. *Food Hydrocolloid* 5:171-172.
248. Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D., Koonin, E.V. (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.*29(1):22-8.

249. Thompson, S.S., Naidu, Y.M., Pestka, J.J. (1985). Ultrastructural localization of an extracellular protease in *Pseudomonas fragi* by using the peroxidase-antiperoxidase reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1038-42.
250. Tindall, B.J. (1990). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 1-3, (1): 199-202.
251. Toffin, L., Bidault, A., Pignet, P., Tindall, B.J., Slobodkin, A., Kato, C., Prieur, D. (2004). *Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deep marine sediment of the Nankai Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (6):1943-9.
252. Toner, B., Manceau, A., Marcus, M. A., Millet, D. B., Sposito, G. (2005). Zinc sorption by a bacterial biofilm. *Environ. Sci. Technol.* 39:8288-94.
253. Toren, A., Orr, E., Paitan, Y., Ron, E.Z., Rosenberg, E. (2002). The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. *J. Bacteriol.* 184:165-170.
254. Tsai, C., Frash, C.E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119:115-119.
255. Umezawa, H.Y., Okami, Y., Kurasawa, S., Ohnuki, T., Ishizuka, M., Takeushi, T. (1983). Marinactin, antitumor polysaccharide produced by marine bacteria. *J. Antibiot.* 5:471-7.
256. van der Aa, B.C., Dufrene, Y.F. (2002). In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloids Surf. B.* 23:173-82.
257. Vasilyeva, N.V., Tsfasman, I.M., Suzina, N.E., Stepnaya, O.A., Kulaev, I.S. (2008). Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *FEBS J.* 275:3827-35.
258. Vincent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., Jeanthon, C., Prieur, D. (1994). Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(11): 4134-4141.
259. Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185: 2080-2095.

260. Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*. 115: 25-35.
261. Walzer, G., Rosenberg, E., Ron, E.Z. (2006). The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. *Environ. Microbiol.* 8(6):1026-32.
262. Wei, J.R., Lai, H.C. (2006). N-acylhomoserine lactone-dependent cell-to-cell communications and social behavior in the genus *Serratia*. *Int. J. Med. Microbiol.* 296:117-24.
263. Weiner, R.M. (1997). Biopolymers from marine prokaryotes. *Mar Biotechnol.* 15:390-394.
264. Welch, T.J., Bartlett, D.H. (1996). Isolation and characterization of the structural gene for OmpL, a pressure-regulated porin-like protein from the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *J. Bacteriol.* 178 (16): 5027-5031.
265. Wensink, J., Witholt, B. (1981). Outer-membrane vesicles released by normally growing *Escherichia coli* contain very little lipoprotein. *Eur. J. Biochem.* 116: 331–335.
266. Wiebe, W.J., Sheldon, W.M., Pomeroy, L.R. (1992). Evidence for enhanced substrate requirement by marine mesophilic bacterial isolates at minimum growth temperature. *Microb. Ecol.* 25:151-159.
267. Wilson, S.L., Kelley, D.L., Walker, V.K. (2006). Ice-active characteristics of soil bacteria selected by ice-affinity. *Environ. Microbiol.* 8: 1816-1824.
268. Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (1999). What are bacterial extracellular polymer substances? In *Microbial Extracellular Polymer Substances*, (Eds., Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C.) Springer, Berlin, pp. 1-19.
269. Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarst, R.D., Caldwell, D.E. (1995). Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:152-158.
270. Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Korber, D.R. (1999). Function of EPS. In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (ed) *Microbial Extracellular Polymeric*

- Substances: Characterization, Structure and Function, Springer-Verlag, New York, NY pp. 171-200.
271. Wu, C.C., Yates III, J.R. (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* 21: 262-267.
272. Xu, C., Lin, X., Ren, H., Zhang, Y., Wang, S., Peng, X. (2006). Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. *Proteomics.* 6: 462- 473.
273. Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., Matthews, K.R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4414-20.
274. Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H. (2009). Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* 9:197.
275. Yoshida, M., Yamamoto, K., Higuchi, K., Iida, H., Ohata, T., Nakamura, T. (1990). First discovery of fossil ice of 1000-1700 year B. P. in Japan. *J. Glaciology* 36: 258-259.
276. Zanchetta, P., Guezenec, J. (2001). Surface thermodynamics of osteoblasts: relation between hydrophobicity and bone active biomaterials. *Colloids and Surfaces* 22:301-307.
277. Zanchetta, P., Lagarde, M., Guezenec, J. (2003). A new bone-healing material: A hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcif. Tissue Int.* 72:74-79.
278. Zhang, X.Q, Bishop, P.L. (2003). Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* 50:63-9.
279. Zhang, J.H., Huang, W.D., Liu, Y.P., Pan, Q.H. (2005). Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. *J. Integrative Plant Biol.* 47 (8): 959-970.
280. Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., Doyle, R.J. (1998). On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 163: 223-228.

VIII.PUBLICACIONES

Membrane Vesicles: A Common Feature in the Extracellular Matter of Cold-Adapted Antarctic Bacteria

Alina Frias · Angeles Manresa · Eliandre de Oliveira ·
Carmen López-Iglesias · Elena Mercade

Received: 23 January 2009 / Accepted: 17 November 2009 / Published online: 2 February 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Many Gram-negative, cold-adapted bacteria from the Antarctic environment produce large amounts of extracellular matter, which has potential biotechnology applications. We examined the ultrastructure of extracellular matter from five Antarctic bacteria (*Shewanella livingstonensis* NF22^T, *Shewanella vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4.2, *Psychrobacter fozii* NF23^T, and *Marinobacter guineae* M3B^T) by transmission electron microscopy after high-pressure freezing and freeze substitution. All analyzed extracellular matter appeared as a netlike mesh composed of a capsular polymer around cells and large numbers of membrane vesicles (MVs), which have not yet been described for members of the genera *Psychrobacter* and *Marinobacter*. MVs showed the typical characteristics described for these structures, and seemed to be surrounded by the same capsular polymer as that found around the cells.

The analysis of MV proteins from Antarctic strains by SDS-PAGE showed different banding profiles in MVs compared to the outer membrane, suggesting some kind of protein sorting during membrane vesicle formation. For the psychrotolerant bacterium, *S. livingstonensis* NF22^T, the growth temperature seemed to influence the amount and morphology of MVs. In an initial attempt to elucidate the functions of MVs for this psychrotolerant bacterium, we conducted a proteomic analysis on membrane vesicles from *S. livingstonensis* NF22^T obtained at 4 and 18°C. At both temperatures, MVs were highly enriched in outer membrane proteins and periplasmic proteins related to nutrient processing and transport in Gram-negative bacteria suggesting that MVs could be related with nutrient sensing and bacterial survival. Differences were observed in the expression of some proteins depending on incubation temperature but further studies will be necessary to define their roles and implications in the survival of bacteria in the extreme Antarctic environment.

A. Frias · A. Manresa
Laboratori de Microbiologia, Facultat de Farmacia,
Universitat de Barcelona,
Av. Joan XIII s/n,
08028 Barcelona, Spain

E. de Oliveira
Plataforma de Proteòmica. Parc Científic de Barcelona,
Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain

C. López-Iglesias
Microscopia Electrònica. Serveis Científic-Tècnics,
Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain

E. Mercade (✉)
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries,
Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona,
Av. Juan XXIII s/n,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: mmercade@ub.edu

Introduction

In recent years cold-adapted microorganisms have received greater attention because of their potential biotechnological applications [11, 14]. Our group has isolated several cold-adapted microorganisms from Antarctic environments that have been characterized as new species in distinct taxonomic groups [6–9, 42]. A predominant feature is the mucous aspect of their colonies, owing to the accumulation of large amounts of extracellular matter. The production of exopolymeric substances by microorganisms enhances their growth and survival in natural systems [13, 52]. Specifically, high concentrations of extracellular polymeric substances (EPS) have been described in Antarctic bacteria of the genus

Pseudoalteromonas [5, 6, 36] and in diatoms from Arctic winter sea ice and other aquatic environments, with important implications for cell locomotion [51], ice crystal adhesion [12], and cryoprotection [32]. For *Pseudoalteromonas* strains, chemical characterization showed that EPS were diverse, despite the taxonomic proximity of these strains [37]. Moreover, an ultrastructural analysis of *Pseudoalteromonas antarctica* NF3^T by transmission electron microscopy (TEM) after high-pressure freezing, freeze substitution (HPF-FS), established the complex nature of the extracellular matter secreted by this bacterium. Two differentiated components were identified: a capsular polymer around cells and large numbers of cell-derived membrane vesicles (MVs) containing proteins [43, 44]. Described more than a decade ago [2, 4], MVs are currently seen as a new form of secretion. Studies that were initially conducted on pathogenic bacteria and the delivery of toxins [16, 18, 22–25, 28, 30, 35] are now mainly focused on the mechanism of vesicle formation and their pathophysiological roles [15, 27, 40, 41, 50]. In natural systems, MVs have been reported as common particulate features of the matrix of *Pseudomonas* biofilms and natural bacterial biofilms [47]. More recently, the production of MVs by *Shewanella* strains was also reported [20]. The presence of MVs in non-pathogenic bacteria is less studied and their role is unclear although multiple functions can be envisaged, such as transfer of proteins between bacterial cells, cell-to-cell signaling, and bacterial survival [20, 39]. Proteomics can be a useful approach to decipher MVs functions. For the Antarctic bacteria *P. antarctica* NF3^T, a proteomic analysis showed that the sequence of proteins in the vesicles matched that of proteins possessing several physiological functions such as proteolytic enzymes, transport receptor and binding proteins, secretion proteins, polysaccharide biosynthesis proteins, enzymes involved in bacterial cell wall degradation, putative porins, proteins that participate in electron transport, adhesins, and proteins involved in protein folding [44].

Here we analyze the ultrastructure and determine the presence of membrane vesicles in the extracellular matter secreted by five cold-adapted Antarctic bacteria: *Shewanella livingstonensis* NF22^T, *Shewanella vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4.2, *Psychrobacter fozii* NF23^T, and *Marinobacter guineae* M3B^T. For this purpose, we conducted transmission electron microscopy, following high-pressure freezing and freeze substitution methods. Isolation and protein profiling via PAGE electrophoresis was carried out to confirm the outer membrane origin of membrane vesicles. The influence of growth temperature on vesicle production was evaluated for the strain *S. livingstonensis* NF22^T. In an initial attempt to elucidate the role of MVs for this strain and their relation with cold adaptation, a proteomic analysis of the main proteins of membrane vesicles produced at different temperatures was performed.

Material and Methods

Bacteria and Growth Conditions

The strains used in this study are described in Table 1. For transmission electron microscopy, *M. guineae* M3B^T was grown on marine agar (Difco) and all other strains were grown on trypticase soy agar (TSA, Oxoid). For outer membrane vesicle isolation, *M. guineae* was grown on marine broth (Difco) and the other strains on trypticase soy broth (Oxoid). Unless otherwise stated, cultures were incubated for 3 days at 15°C. For liquid cultures, an orbital shaker at 120 rpm was used.

Transmission Electron Microscopy

Negative Staining

MVs were visualized by negative-staining electron microscopy. The sample was adsorbed onto carbon-coated copper/palladium grids for 2 min, and then washed twice by floating it face-down on drops of sterilized, deionised water for 10 s. Finally, the sample was negatively stained by floating the grids face-down on a drop of 2% (w/v) uranyl acetate for 1 min.

High-Pressure Freezing and Freeze Substitution

Bacterial colonies were selected randomly under a stereomicroscope, transferred to planchettes (1.5 mm in diameter and 200 µm deep) and immediately cryoimmobilized using a Leica EMPact high-pressure freezer (Leica, Vienna, Austria) in the absence of cryoprotectants or freezing solutions. Planchettes were then stored in liquid nitrogen until further used. Frozen samples were freeze substituted in a Leica EM AFS (automatic freeze substitution system, Leica, Vienna, Austria), where the substitution was performed in pure acetone containing 2% (w/v) osmium tetroxide and 0.1% (w/v) uranyl acetate at –90°C for 72 h. The temperature was gradually increased ($\Delta t=5^\circ\text{C}/\text{h}$) to 4°C and held constant for 2 h, and then finally increased to room temperature and maintained for 1 h. Samples were washed for 1 h in acetone at room temperature and infiltrated in a graded series of Epon-acetone mixtures: 1:3 for 2 h, 2:2 for 2 h, 3:1 for 16 h, and pure Epon 812 (Ted Pella, Inc., USA) for 30 h. Samples were embedded in fresh Epon and polymerized at 60°C for 48 h.

Sectioning and Electron Microscopy Analysis

Ultrathin sections were cut with a Leica UCT ultramicrotome and mounted on Formvar carbon-coated copper grids. Sections were post-stained with 2% (w/v) aqueous uranyl acetate and lead citrate and examined in a Tecnai Spirit

Table 1 Antarctic strains used in this study

| Species/strain designation | Strain no. | Isolation site | Reference |
|--|------------------------|---|--------------------|
| <i>Shewanella livingstonensis</i> NF22 | LMG 19866 ^T | Water, Livingston Island, Antarctica | Bozal et al. [7] |
| <i>Shewanella vesiculosa</i> M7 | LMG 24424 ^T | Marine sediment, Deception Island, Antarctica | Bozal et al. [9] |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. M4.2 | – | Marine sediment, Deception Island, Antarctica | – |
| <i>Psychrobacter fozii</i> NF23 | LMG 21280 ^T | Marine sediment, King George Island, Antarctica | Bozal et al. [8] |
| <i>Marinobacter guineae</i> M3B | LMG 24048 ^T | Marine sediment, Deception Island, Antarctica | Montes et al. [42] |

LMG refers to Belgian coordinated cultures of microorganisms.

electron microscope (FEI Company, Netherlands) at an acceleration voltage of 120 kV. Vesicles size and other cell parameters were determined by the computer program analySIS (Soft Imagine System, Switzerland).

Isolation, Quantification, and Purification of MVs from the Culture Medium

Vesicle Isolation

MVs naturally secreted into the medium were collected and quantified from broth cultures (250 ml) of each bacterium in the late log phase, as described by McBroom and co-workers [40]. The cells were pelleted by centrifugation at 10,000×g for 10 min at 4°C, and the supernatant was filtered through 0.45-µm pore-size filters to remove remaining bacterial cells. MVs were obtained by centrifugation at 38,400×g for 1 h at 4°C in an Avanti® J-20 XP centrifuge (Beckman Coulter, Inc). Pelleted vesicles were resuspended in Dulbecco's phosphate-buffered saline with added salt (0.2 M NaCl) and filter sterilized through 0.45-µm pore-size ultra-free spin filters (Millipore).

Vesicle Quantification

Vesicles were quantified as described by McBroom et al. [40]. A portion of the sterile resuspended vesicles was incubated with FM4-64 (Molecular Probes; 5 µg/ml in phosphate-buffered saline for 20 min at 37°C). Vesicles alone and the FM4-64 probe alone were the negative controls. After excitation at 515 nm, emission at 635 nm was measured with a spectrofluorometer SLM-Aminco 8100 (Urbana, IL, USA). Colony forming units (CFU) were determined by the dilution plating method. Vesicle production was calculated by dividing lipid fluorescence units by CFU.

Vesicle Purification

Vesicles were purified by a method adapted from Horstman and Kuehn [23]. Crude vesicle samples were adjusted to 45% OptiPrep® Density gradient medium (Sigma) in 10 mM HEPES/0.85% NaCl, pH 7.4 (HEPES–NaCl; weight/volume). Optiprep gradients were layered over the 4-ml crude

vesicle samples as follows: 4 ml 40%, 4 ml 35%, 6 ml 30%, 4 ml 25%, and 2 ml 20% Optiprep/HEPES–NaCl by weight. Gradients were centrifuged (100,000×g, 20 h) and fractions of equal volume were removed sequentially from the top. A portion of each fraction was visualized by 12% SDS-PAGE and Coomassie staining. Fractions containing vesicles were pooled, dialyzed with 10 mM HEPES, and concentrated with Amicon® Ultra centrifugal filter devices (Millipore). Purified vesicles were used for proteomic studies.

Vesicle Protein Content

The protein concentration of purified vesicle samples was determined by the Bradford method using standard Bio-Rad Reagent (Bio-Rad Laboratories, München, Germany).

Preparation of Outer Membranes (OMs) from Antarctic Bacteria

Outer membranes were prepared as described previously by Puig and colleagues [46], with some modifications. Cells were harvested (10,000×g 10 min) from a 250-ml culture in the late log phase. The bacterial pellet was washed twice with 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, then resuspended in one-twentieth the original volume with the same buffer and sonicated on ice using 3×1 min pulses at 140 W. The cell lysate was centrifuged to remove unbroken cells as above, and the clear supernatant was subjected to centrifugation at 38,400×g for 60 min in an Avanti® J-20 XP centrifuge (Beckman Coulter, Inc). The crude membrane pellet was resuspended in 2% (w/v) Sarcosyl (*N*-lauroylsarcosine, Sigma) in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4, for 30 min at room temperature to solubilize the inner membrane. The suspension was centrifuged at 40,000×g for 90 min, at 20°C. The pellet was then resuspended in the same buffer.

SDS-PAGE Electrophoresis

Crude vesicles and outer membranes were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis (12% resolving gel), according to the standard procedure [33]. Gels were stained with Coomassie blue. Protein standard was from Bio-Rad.

For proteomics analysis, purified MVs were precipitated overnight using acetone at -20°C . Supernatant was removed and the pellet was dried in a vacuum centrifuge. One-dimensional electrophoresis was performed under denaturing conditions on 12.5% SDS-PAGE. Electrophoresis was run in an Ettan Dalt II system (GE). For the analysis, 100 μg of total protein was loaded per well. After electrophoresis the gel was stained for protein with Coomassie blue.

Proteins were in-gel digested with trypsin (modified sequencing grade, Promega) using the automatic Investigator ProGest robot from Genomic Solutions. Briefly, excised gels spots were washed sequentially with ammonium bicarbonate buffer and acetonitrile. Proteins were reduced and alkylated, respectively, by treatment with 10 mM DTT solution over 30 min, followed by treatment with a 100 mM solution of iodine acetamide. After sequential washings with buffer and acetonitrile, proteins were digested overnight at 37°C with 0.27 nmol of trypsin. Tryptic peptides were extracted from the gel matrix with 10% (v/v) formic acid and acetonitrile, with the extracts then pooled and dried in a vacuum centrifuge.

Mass Spectrometry and Data Analysis

Purified and reconstituted tryptic peptides were injected for chromatographic separation in a reverse-phase capillary C18 column (75 μm of internal diameter and 15 cm length, PepMap column, LC Packings). The eluted peptides were subsequently analyzed on a nano-ESI-QTOF mass spectrometer (Q-TOF Global, Micromass-Waters). A capillary voltage of 2,200 V was applied together with a cone voltage of 80 V. The collision energy in the collision-induced dissociation was 20–35 eV and argon was employed as collision gas. Data were generated in PKL file format, which were submitted for database searching in MASCOT server. For the database search, only tandem mass (MS/MS) spectra of +2 and +3 charged ions were searched against the NCBI nonredundant protein sequence database. The search parameters allowed for one missed cleavage for trypsin. Fixed and variable modifications were carbamidomethyl of cystein and oxidation of methionine, respectively. Peptide tolerance was 100 ppm and 0.25 Da, respectively for MS and MS/MS spectra. Proteins were identified by using the Probability Based Mowse Score and only were considered as significant those scores values over to the calculated score having 95% of probability (p value < 0.05).

Results

Transmission Electron Microscopy

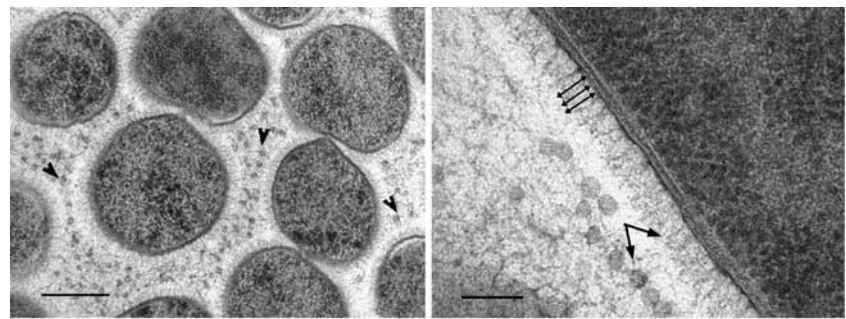
Examination of *S. livingstonensis* NF22^T, *S. vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4.2, *P. fozii* NF23^T and *M. guineae* M3B^T by TEM following HPF-FS revealed

interesting features of the extracellular matter secreted by these cold-adapted Antarctic bacteria. Cell surfaces appeared to be covered by a distinctive halo which consisted of fine fibers standing perpendicular to the cell wall structure in quite an organized manner (Fig. 1, left and right images). The length, arrangement, and distribution of these polymeric fibers varied between strains. In addition, large numbers of spherical structures were observed, resembling membrane vesicles of Gram-negative bacteria. These spherical structures were mainly interspersed among cells (see arrow heads in the images on the left of Fig. 1). *S. livingstonensis* NF22^T and *Pseudoalteromonas* sp. M4.2 showed larger quantities of MVs in all analyzed sections. The surface of these vesicles, with diameters ranging approximately from 20 to 100 nm, consisted of a lipid bilayer. This was clearly visible at higher magnifications (Fig. 1, right images). The same bilayered structure was observed for the bacterial outer membrane and around the vesicle, which suggests that MVs originate in the outer membrane. In addition, protrusions of the outer membrane were observed in many sections (asterisks in the right-handed images of Fig. 1 mark protrusions for *S. vesiculosa* M7^T and *Pseudoalteromonas* sp. M4.2), which may represent different stages in the formation of MVs. A noteworthy feature was the presence of a fringe of fine fibers around MVs, which was very similar to the one detected around cells. Carbohydrate staining of SDS-PAGE gels of MVs showed bands located in the upper regions of the gel that could correspond to capsular polysaccharides around MVs (data not shown). This suggests that polymeric fibers attached to the outer cell membrane are also incorporated into MVs during their formation (Fig. 1, see arrows in right images).

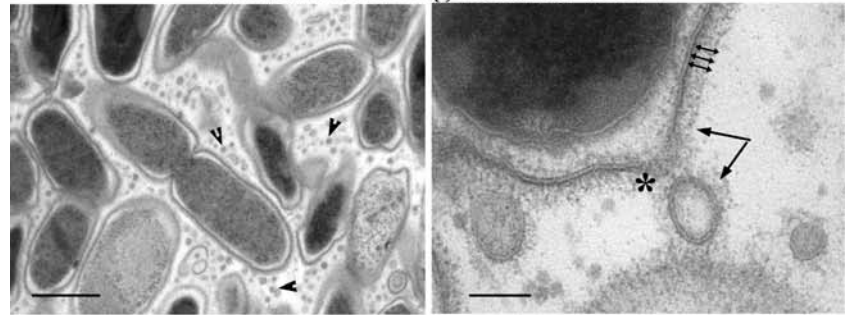
Isolation of MVs and Analysis of MV Protein Content

Membrane vesicles of each strain were isolated from clarified culture supernatants, as described in the “Materials and Methods”. The pellet obtained after centrifugation was resuspended and a small aliquot was negatively stained and examined by TEM. In these preparations, bacterial flagella were observed together with MVs (see arrows in Fig. 2). Membrane vesicles appeared to be generated by budding from the outer membrane of the bacterium, as clearly depicted in Fig. 1. To assess their outer membrane origin, the protein profiles of sedimented vesicles (MV) and the protein profile of outer membrane samples (OM) were compared by SDS-PAGE. Most polypeptides detected in vesicles preparations comigrated with polypeptides that were present in outer membrane preparations (Fig. 2). The outer membrane samples contained additional proteins that were not detected in vesicles (compare the left lanes in Fig. 2 that correspond to OM with the center lanes, which

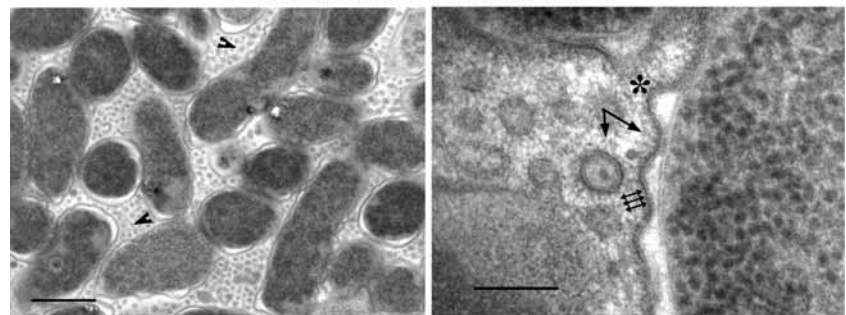
Figure 1 TEM micrographs of ultrathin sections from five cold-adapted Antarctic bacteria prepared by HPF-FS. The *left images* show a general view of cells as well as large amounts of membrane vesicles (*arrow heads*). The *right images* show magnified views of cells surrounded by a halo of oriented fibers (*arrows with double arrowhead*). The *right images* also show the same bilayered structure around the vesicles and the bacterial outer membrane. *Asterisks* mark protrusions in the outer membrane. The oriented fibers can also be observed around vesicles and the outer membrane of cells (*arrows with one arrowhead*). Bars in the *left images* are 200 nm; bars in the *right images* are 100 nm



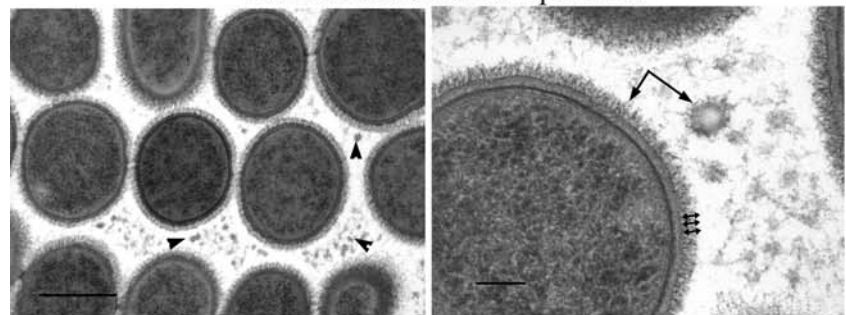
Shewanella livingstonensis NF22



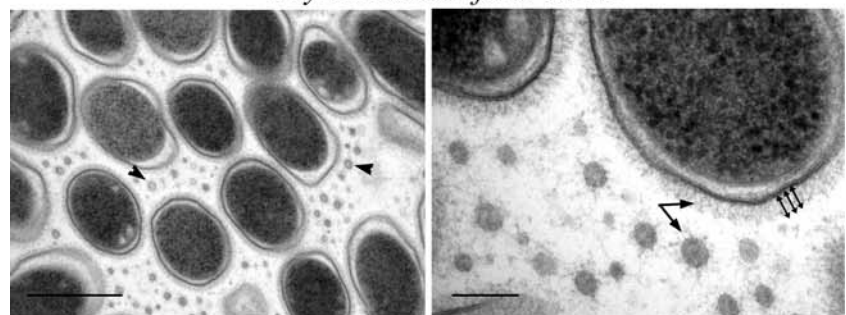
Shewanella vesiculosa M7



Pseudoalteromonas sp. M4.2

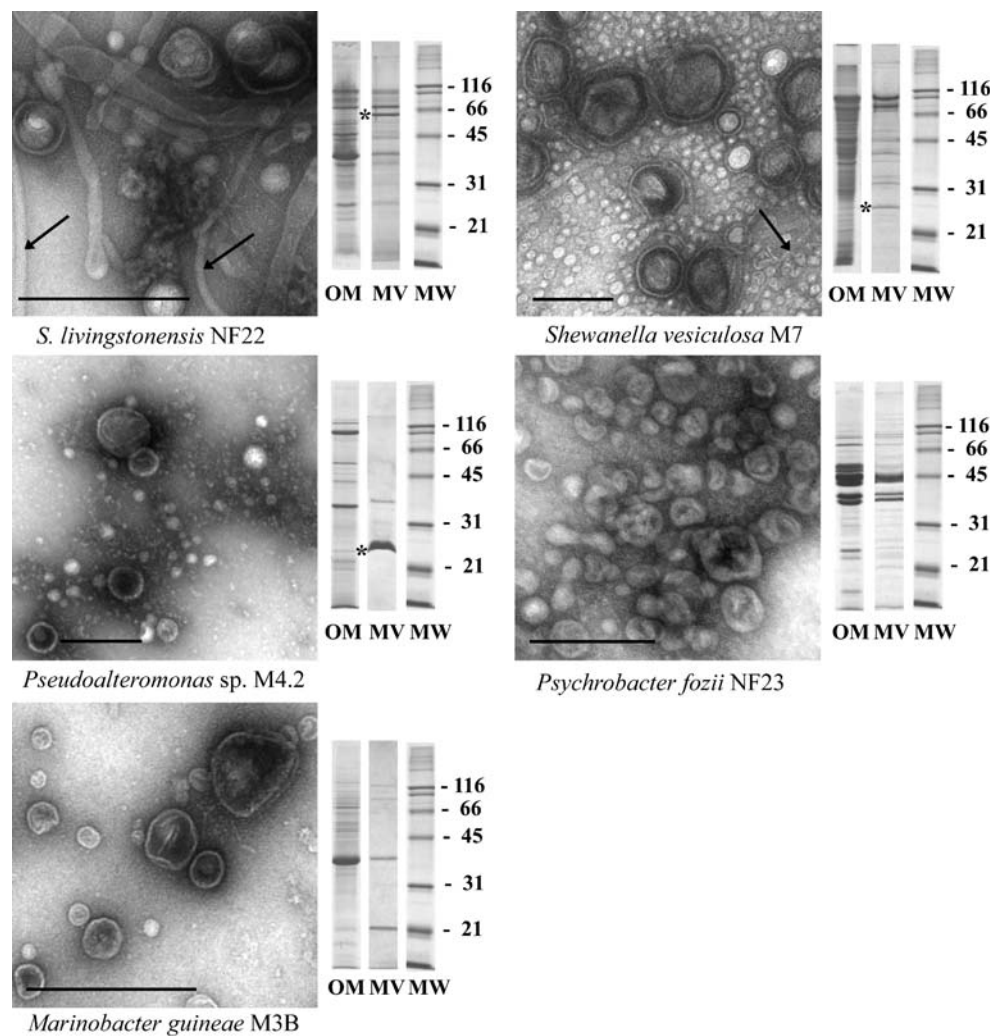


Psychrobacter fozii NF23



Marinobacter guineae M3B

Figure 2 Negative-staining micrographs from membrane vesicles isolated from five Antarctic bacteria cultures, and Coomassie blue-stained SDS-PAGE (12%) protein profiles of outer membrane fractions (*OM*) and membrane vesicles (*MV*) from each strain. The molecular mass marker (*MW*) is expressed in kilodaltons. Asterisks indicate polypeptides that were overexpressed in membrane vesicle preparations. Arrows indicate flagella. Bar 200 nm



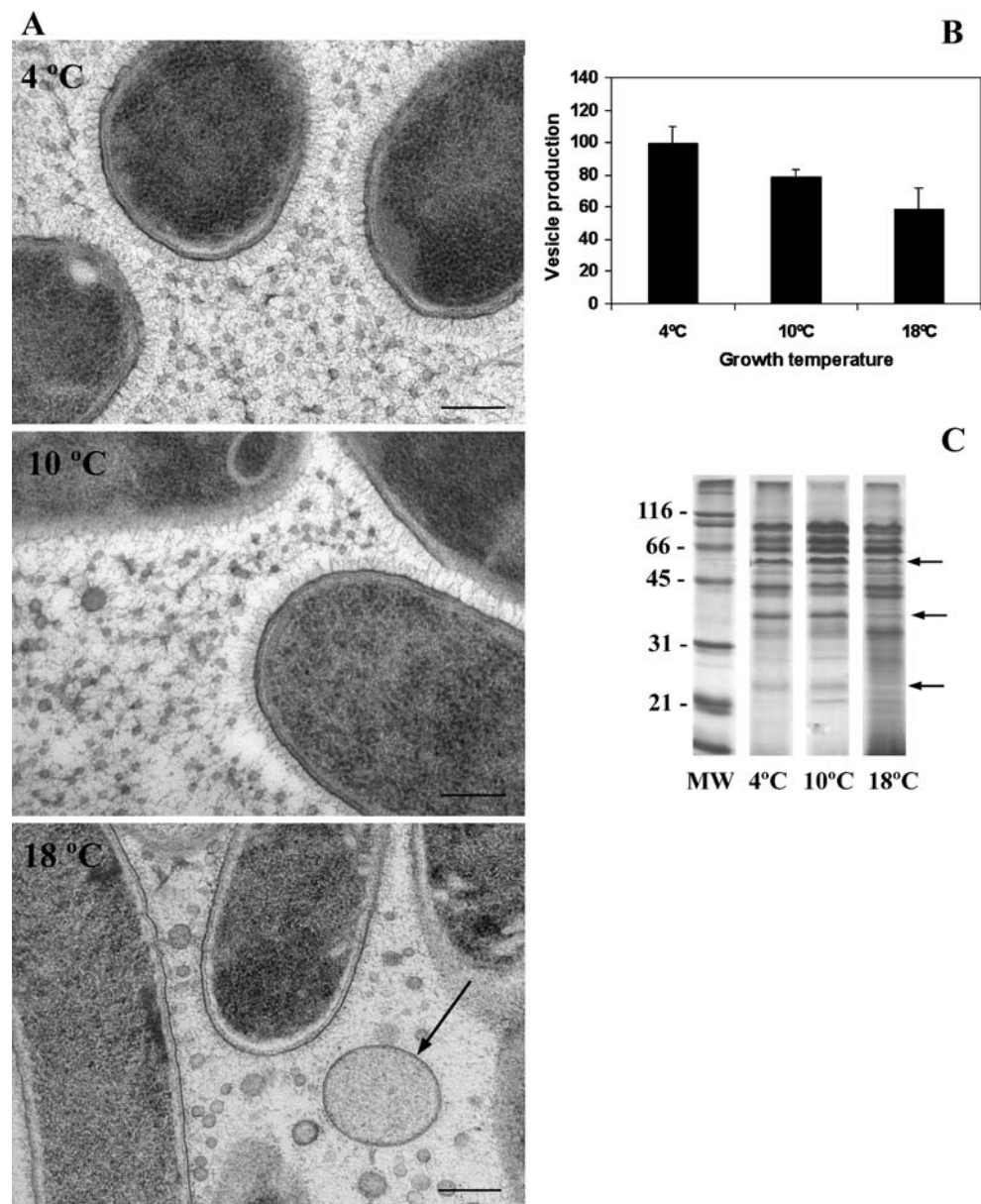
correspond to MV in SDS-PAGE images). We observed that several bands were overexpressed in MV samples compared with OM preparations (see the bands marked with arrows for *S. livingstonensis* NF22^T, *S. vesiculosa* M7^T, and *Pseudoalteromonas* sp. M4.2 in Fig. 2).

Influence of Incubation Temperature on Vesicle Production

To determine whether vesiculation was affected by incubation temperature, overnight cultures of *S. livingstonensis* NF22^T grown at 15°C were inoculated into fresh medium (tryptic soy broth (TSB)) and grown at 4, 10, and 18°C until they reached the end of the exponential phase. Membrane vesicles were isolated and quantified as described in the “Materials and Methods”. *S. livingstonensis* NF22^T is a psychrotolerant bacterium with a temperature range of growth between 0 and 20°C. Membrane vesicles accumulated in the growth medium during the exponential growth phase (data not shown). Vesicle production was higher at low temperatures

(Fig. 3b). An ultrastructure examination by TEM of *S. livingstonensis* NF22^T grown on TSA agar at different temperatures, confirmed that more MVs were detected at low temperatures (4 and 10°C). Vesicles produced at 4°C were very regular in size (with a mean diameter of 26.6 nm) and were uniformly distributed between cells. At this temperature, a layer of approximately 56.2 nm in length composed of fine fibers around the cells was clearly observed (Fig. 3a, 4°C). Slight differences were noticed in sections of *S. livingstonensis* NF22^T grown at 10°C, but major changes were detected when the incubation temperature was 18°C. At this temperature, there were less MVs. MVs were larger and more irregular in size (with a mean diameter of 40.25 nm), and the halo of fine fibers around cells, although detectable, was more diffuse and thinner (22.46 nm) (Fig. 3a, 18°C). These measurements are summarized in Table 2. Cells growing at 18°C were elongated (not shown) and structures resembling spheroplasts (500 nm diameter approximately) were also observed either adjacent to or

Figure 3 Effect of incubation temperature on membrane vesicle release from *S. livingstonensis* NF22^T. **a** TEM micrographs of sections from *S. livingstonensis* NF22^T grown on TSA agar at different temperatures, prepared by HPF-FS. Bar 200 nm. **b** Vesicle production of *S. livingstonensis* NF22^T at different temperatures. Vesicle production was calculated by dividing lipid fluorescence by CFU (shown as relative fluorescence units 10^8 CFU⁻¹; $n=2$). **c** Coomassie blue-stained SDS-PAGE of membrane vesicles from cultures of *S. livingstonensis* NF22^T grown on TSB at different temperatures. Molecular weight protein standard (*MW*) is expressed in kilodaltons. Polypeptides overexpressed at cold temperatures are labeled with arrows



independent from filamentous cells (see arrow in Fig. 3a, 18°C). The SDS-PAGE analysis of MV proteins from cells grown at different temperatures revealed that at least three bands were overexpressed at 4 and 10°C, compared with bands at 18°C (see the arrows in Fig. 3c). The upper band corresponded to flagella and was eliminated after MVs were purified by ultracentrifugation.

Table 2 Membrane vesicle size (diameter in nm) and length of fibers fringe (nm) of *S. livingstonensis* NF22 grown at different incubation temperatures

SD standard deviation, *VAR* variance

| Temperature | Membrane vesicles | | | Fibers fringe | |
|-------------|-------------------|------|-------|-----------------|-----|
| | Mean ($n=150$) | SD | VAR | Mean ($n=60$) | SD |
| 4°C | 26.6 | 3.4 | 12.1 | 56.2 | 5.1 |
| 10°C | 27.6 | 3.9 | 15.4 | 53.0 | 7.2 |
| 18°C | 40.2 | 14.5 | 211.4 | 22.4 | 4.3 |

Proteomic Analysis of MVs from *S. livingstonensis* NF22

A proteomic analysis of *S. livingstonensis* NF22 membrane vesicles obtained at different incubation temperatures was performed to characterize the main proteins present in MVs. For proteomic analysis, isolated MVs at 4 and 18°C were further purified on an Optiprep® density gradient to

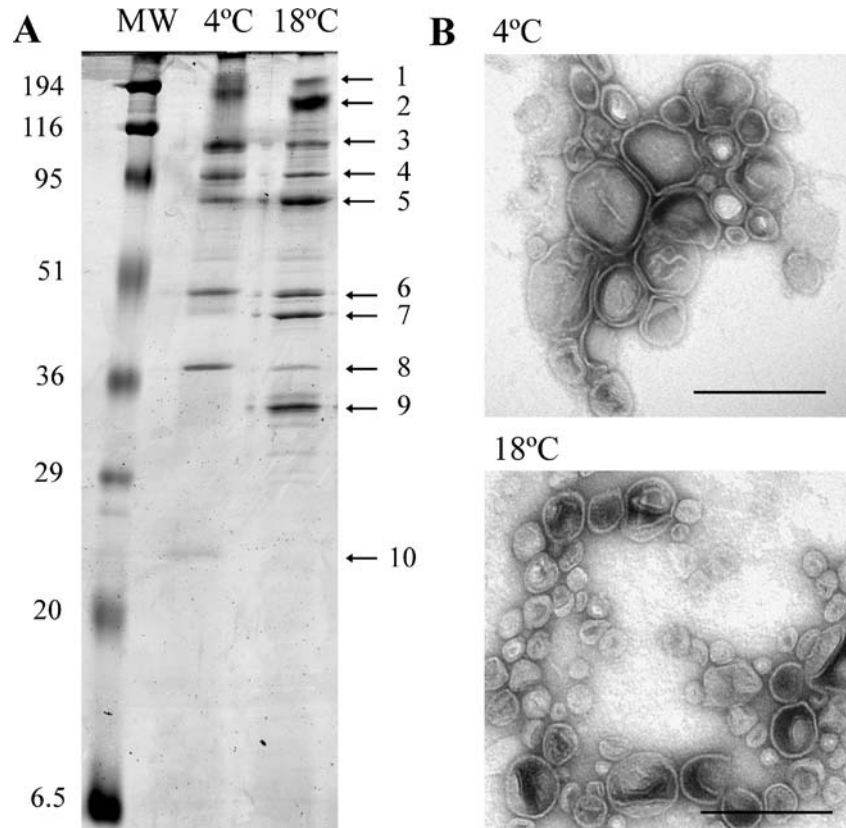
remove contaminants including flagella. At least ten prominent bands were visible by Coomassie blue staining of MVs obtained at 4 and 18°C (Fig. 4). Protein profiles were similar but abundance of some proteins changed with temperature. At 4°C expression of protein bands marked with numbers 3, 8, and 10 in Fig. 4 increased slightly, while expression of protein bands marked with numbers 2, 5, 7, and 9 increased at 18°C. Each band was excised from the gel and digested with trypsin. Peptides were separated by liquid chromatography and subsequently analyzed on a nano-ESI-QTOF mass spectrometer. Data were submitted for database searching in MASCOT server, and were searched against the NCBI nonredundant protein sequence database. Proteins putatively identified from *S. livingstonensis* NF22-derived MVs are shown in Table 2. Vesicular proteins were mainly outer membrane proteins involved in cellular processes, most of them being TonB-dependent receptors, followed by porins, type I secretion proteins and lipoproteins. Outer membrane proteins involved in metabolism, such as a membrane protein involved in aromatic hydrocarbon degradation and a long-chain fatty acid transport protein were also identified in membrane vesicles obtained at higher temperatures. Periplasmic proteins were also abundant, including bifunctional UDP-sugar hydrolase/5'-nucleotidase periplasmic precursors and phosphate-binding periplasmic protein precursor. The only cytoplasmic protein identified corresponded to a

GTPase-translation elongation factor. A few poorly characterized proteins were also present. Bands slightly overexpressed at 4°C included protein homologues of TonB-dependent receptors, porins, phosphate-binding periplasmic protein precursors, a peptidase M16 domain-containing protein, a major outer membrane lipoprotein I, and one poorly characterized protein homologue of a hypothetical protein from *Shewanella frigidimarina* (Sfri_3402).

Discussion

The strains used in this study belong to various genera of class *Gammaproteobacteria*. They were isolated during a taxonomic investigation of cold-adapted bacteria from water and marine sediments collected in the Antarctic area of the South Shetland Islands. The strains were selected for their mucous colony morphology, in order to analyze the ultrastructure of the extracellular matter they produce. The most abundant components of the extracellular matter of many bacteria from extreme environments have been found to be polysaccharides [19, 38]. However, Nevot and co-workers have recently described the presence of a large number of outer membrane vesicles as important components of the extracellular matter for the Antarctic bacterium *P. antarctica* NF3 [43]. High-pressure freezing and freeze substitution

Figure 4 **a** Protein profile of *S. livingstonensis* NF22 purified MVs using 12.5% 1D SDS-PAGE. Molecular mass markers (*MW*) in kDa are indicated at the left of the gel. *Numbers at the right* of the gel indicate excised bands for proteomic analysis. **b** Negative-staining micrographs from *S. livingstonensis* NF22 purified MVs obtained at different temperatures. Bars are 200 nm



techniques have greatly improved ultrastructural preservation of bacterial surface structures such as capsules or extracellular polymeric substances [21, 43, 49], and have contributed to elucidate the complexity of the extracellular matter of *P. antarctica* NF3. For the five analyzed Antarctic strains, TEM analysis after HPF-FS also revealed the complex composition of their extracellular matter, with the presence of ordered fibrous material external to the outer membrane and large amounts of cell-derived membrane vesicles. This fibrous fringe around cells was also reported for other encapsulated bacteria, such as pathogenic *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Proteus mirabilis* [21], or bacteria from natural habitats such as *Shewanella* strains [31, 49], and more recently for the Antarctic strain *P. antarctica* NF₃ [43]. For the five analyzed strains, the structure and thickness of the fibrous layers means that they can be considered capsules.

Large amounts of MVs released from cells were found in the extracellular matter of all analyzed bacteria. However, the highest amounts of MVs were observed for *Shewanella* and *Pseudoalteromonas* strains. This general production of MVs by cold-adapted Antarctic bacteria had not previously been reported. Specifically, to our knowledge it is the first time MVs have been described in *Marinobacter* and *Psychrobacter* strains.

The membrane vesicles of *S. livingstonensis* NF22^T, *S. vesiculosa* M7^T, *Pseudoalteromonas* sp. M4.2, *P. fozii* NF23^T, and *M. guineae* M3B^T showed the typical characteristics described for these structures. They were spherical bilayered lipid vesicles extruded from regions of the bacterial outer membrane. They ranged in size from 20 to 100 nm and contained outer membrane proteins. As described for other bacteria [23, 34], the analysis of MV proteins from Antarctic strains by SDS-PAGE showed different banding profiles in MVs compared to the outer membrane, suggesting some kind of protein sorting during membrane vesicle formation.

The ultrastructural analysis of cold-adapted Antarctic strains also revealed that MVs seemed covered with the same capsular polymeric fibers as those found around cells. Components of Gram-negative bacterial membrane vesicles consist mainly of proteins and lipids from the outer membrane. Currently, it is accepted that virulence factors such as LPS, cytoplasmic proteins, and genetic material can also be components of MVs [17, 30, 34, 45]. However, to our knowledge, the presence of this polymeric fringe around membrane vesicles has not yet been visualized. The length of fibers, and carbohydrate staining of SDS-PAGE gels of MVs with bands located in the upper regions of the gel make it reasonable to consider that there are capsular polysaccharides around MVs, retained from the outer cell membrane. For our strains, this could facilitate the formation of a netlike mesh, which would allow MVs to

be retained near cells and also to adhere to surfaces or to other cells. For pathogenic strains such as *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, or *Pseudomonas aeruginosa*, the demonstration of capsular material in their MVs would be interesting and could contribute to the antigenic profile of MVs, with implications in some uses of membrane vesicles such as vaccine preparation [3].

We analyzed the influence of temperature on MV production for *S. livingstonensis* NF22^T. This strain is a psychrophilic bacterium with an optimal growth temperature close to 15°C and a maximum growth temperature of 20°C. Quantification pointed out that MVs were produced in higher quantities at low temperatures. This was confirmed by TEM images. Not only were higher numbers of MVs produced under low temperature conditions (4°C), but morphological changes were also observed both in the size of secreted MVs at different temperatures, and in the morphology of *S. livingstonensis* NF22^T cells grown at different temperatures. At low temperatures, MVs were regular in size. However, at temperatures above the optimal, MVs presented greater size variability. In addition, spheroplast-like structures and elongated cells were observed. The presence of filamentous cells and spheroplast-like structures was also reported in *Shewanella oneidensis* MR-1 strain [1], but for this mesophilic strain these structures appeared at low growth temperature, and no MVs were described. The explanation for these events is still not clear, although some bacteria make filaments under stress factors [10, 48]. Increased release of MVs was reported by McBroom and Kuehn as an envelope stress response [41, 45]. In this study, we did not check for stress markers, but for the psychrotolerant *S. livingstonensis* NF22^T strain, which cannot grow over 20°C, a growth temperature of 18°C may be stressful. If so, fewer MVs would be produced in this temperature stress condition. No mechanisms are available explaining the changes occurring in MV production and size in relation to growth temperature.

Protein profiles of crude MVs from *S. livingstonensis* NF22^T grown at different temperatures showed changes in the expression of some bands depending on growth temperature. A proteomic analysis of purified MVs from *S. livingstonensis* NF22^T was conducted to identify the protein components of these vesicles, as an approach to define their physiological role. As described for other Gram-negative bacteria [34], proteins putatively identified from *S. livingstonensis* NF22^T derived MVs are mainly outer membrane and periplasmic proteins involved in several physiological functions. The most abundant proteins detected are putative TonB-dependent receptors. This family of beta-barrel proteins from the outer membrane are mainly involved in the uptake of molecules that are too large to diffuse through the outer membrane porins, mainly iron siderophores and vitamin B12 [29]. For our Antarctic

bacteria, *S. livingstonensis* NF22^T, the overexpression of these proteins could be a mechanism for survival in nutrient-limited systems, as also proposed by Nevot and co-workers [44] for *P. antarctica* NF3. This nutrient-limited situation could also explain the presence of abundant proteins putatively identified as bifunctional UDP-sugar hydrolase/5'-nucleotidase periplasmic precursors, phosphate-binding periplasmic protein precursors, and phosphate-selective porins O and P. Phosphorous is an essential component of macromolecules and bacteria need an optimal supply of phosphorous from the environment. These precursors and porins may play roles in nucleotide salvage and in phosphorous metabolism. Other putative proteins found in MVs from *S. livingstonensis* NF22^T that could also be involved in bacterial survival in the Antarctic environment were porins, type I secretion outer membrane protein (ToIC) and proteolytic degradative enzymes (peptidase M16 domain-containing protein). The overexpressed proteins in MVs detected at low temperatures (mostly homologues of TonB-dependent receptors, porins, and phosphate-binding periplasmic protein precursors), were basically related with membrane transport. Cold induction of these proteins may counteract the low diffusion rate of solutes at low temperatures. It is remarkable that proteins involved in membrane transport were also found overexpressed by Kawamoto and co-workers in a global identification of cold-inducible proteins from cells of another cold-adapted *S. livingstonensis* strain [26]. These authors also reported the overexpression at cold temperatures of GTPase-translation elongation factor, a protein involved in protein synthesis, which we have also found in MVs of *S. livingstonensis*, suggesting that this cytoplasmic protein is secreted in membrane vesicles.

At this stage, it is difficult to infer a function for MVs of this cold-adapted bacterium, mainly because in the laboratory we are not able to reproduce the growing conditions the bacterium has in the Antarctic environment and this implies that some of the identified proteins and their concentrations could vary in natural environments. Probably more than one function could be envisaged for the complex extracellular matter observed in these Antarctic bacteria. The net-like mesh surrounding the cells composed of polymers and protein-charged MVs most likely can modify the physico-chemical properties around the cells building a micro-environment that could help in their survival. For instance, capsular polymer could have a cryoprotectant role, could help in cell adhesion, and the polymeric fibers around vesicles could preserve the net-like mesh structure. On the other hand, MVs entrapped in this mesh could be a source of degradative enzymes and could help to concentrate nutrients around the cells.

In summary, we have revealed that extracellular matter from five cold-adapted Antarctic bacteria is complex, and is composed of a capsular polymer and large quantities of MVs derived from the bacterial outer membrane. These

MVs appeared to be surrounded by the same capsular polymer forming a net-like-mesh around cells. Temperature seemed to influence the quantity and morphology of MVs produced by *S. livingstonensis* NF22^T. Proteins identified in MVs in a first proteomic approach were mainly outer membrane and periplasmic proteins involved in nutrient sensing and bacterial survival but more studies are needed to clearly define the physiological role of MVs with regard to cold adaptation.

Acknowledgements We gratefully acknowledge the assistance of Gemma Martínez, Sonia Riuz and Elisenda Coll for TEM support (*Serveis Científics Tècnics de la Universitat de Barcelona*). This research was supported by the Government of Spain (CICYT project CTQ 2007-60749/PPQ) and by the Autonomous Government of Catalonia (grants 2009SGR1212 and 2005SGR00143). Alina Frias was the recipient of a fellowship MAEC-AECI from the Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación from Spain. We also thank the ProteoRed network.

References

1. Abboud R, Popa R, Souza-Egipsy V, Giometti CS, Tollaksen S, Mosher JJ, Findlay RH, Nealson KH (2005) Low-temperature growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol* 71:811–816
2. Bayer ME, Anderson TF (1965) The surface structure of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54:1592–1599
3. Bethell D, Pollard AJ (2002) Meningococcal vaccines. *Exp Rev Vac* 1:75–84
4. Beveridge TJ (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 181:4725–4733
5. Bozal N, Manresa A, Castellví J, Guinea J (1994) A new bacterial strain of Antarctica, *Alteromonas* sp. that produces a heteropolymer slime. *Polar Biol* 14:561–567
6. Bozal N, Tudela E, Rossello-Mora R, Lalucat J, Guinea J (1997) *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an Antarctic coastal environment. *Int J Syst Bacteriol* 47:345–351
7. Bozal N, Montes MJ, Tudela E, Jiménez F, Guinea J (2002) *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:195–205
8. Bozal N, Montes MJ, Tudela E, Guinea J (2003) Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1093–1100
9. Bozal de Febrer N, Montes MJ, Miñana-Galbis D, Manresa A, Mercadé E (2009) A new psychrotolerant bacterium isolated from Antarctic coastal area: *Shewanella vesiculosa* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:336–340
10. Burdett IDJ, Murray RGE (1974) Septum Formation in *E. coli*. *J Bacteriol* 119:303–324
11. Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotech* 13:253–261
12. Cooksey KE, Wigglesworth-Cooksey B (1995) Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aquat Microb Ecol* 9:87–96
13. Costerton JW (1999) The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *J Ind Microbiol Biot* 22:551–563 (Reprinted from *Developments in Industrial Microbiology*, vol 26, pg 249–261, 1985)

14. D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* 7:385–389
15. Deatherage BL, Cano Lara J, Bergsbaken T, Rassoulian Barret SL, Lara S, Cookson BT (2009) Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* 72(6):1395–1407
16. Devoe IW, Gilchrist JE (1973) Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 138:1156–1167
17. Dorward DV, Garon CF, Judd RC (1989) Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 171:2499–2505
18. Fiocca R, Necchi V, Sommi P, Ricci V, Telford J, Cover TL, Solcia E (1999) Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* 188:220–226
19. Fleming H-C, Wingender J (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-part I: structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* 43:1–8
20. Gorby Y, McLean J, Korenevsky A, Rosso K, El-Naggar MY, Beveridge TJ (2008) Redox-reactive membrane vesicles produced by *Shewanella*. *Geobiology* 6:232–241
21. Graham LL, Harris R, Villiger W, Beveridge TJ (1991) Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *J Bacteriol* 173:1623–1633
22. Grenier D, Mayrand D (1995) Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 55:111–117
23. Horstman AL, Kuehn MJ (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secrete active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* 275:12489–12496
24. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ (1995) Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* 177:3998–4008
25. Kato S, Kowashi Y, Demuth DR (2002) Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* 32:1–13
26. Kawamoto J, Kurihara T, Kitagawa M, Kato I, Esaki N (2007) Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins. *Extremophiles* 11:819–826
27. Kesty NC, Kuehn MJ (2004) Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *J Biol Chem* 279:2069–2076
28. Khandelwal P, Banerjee-Bhatnagar N (2003) Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl Environ Microbiol* 69:2032–2037
29. Koebnik R (2005) TonB-dependent trans-envelope signaling: the exception or the rule? *Trends Microbiol* 13(8):343–347
30. Kolling GL, Matthews KR (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 65:1843–1848
31. Korenevsky AA, Vinogradov E, Gorby Y, Beveridge TJ (2002) Characterization of the lipopolysaccharides and capsules of *Shewanella* spp. *Appl Environ Microbiol* 68:4653–4657
32. Krembs C, Eicken H, Junge K, Deming JW (2002) High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep-Sea Res Part I* 49:2163–2181
33. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680–685
34. Lee E-Y, Choi D-S, Kim K-P, Gho YS (2008) Proteomics in Gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spec Rev* 27:535–555
35. Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ (1998) Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J Bacteriol* 180:5478–5483
36. Mancuso Nichols CA, Garon S, Bowman JP, Raguénè G, Guézennec J (2004) Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J Appl Microbiol* 96:1057–1066
37. Mancuso Nichols C, Garon Lardière S, Bowman JP, Nichols PD, Gibson JAE, Guézennec J (2005) Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb Ecol* 49:578–589
38. Mancuso Nichols CA, Guézennec J, Bowman JP (2005) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Marine Biotechnol* 7:253–271
39. Mashburn LM, Whiteley M (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437:422–425
40. McBroom AJ, Johnson AP, Vemulapalli S, Kuehn MJ (2006) Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol* 188:5385–5392
41. McBroom AJ, Kuehn MJ (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* 63:545–558
42. Montes MJ, Bozal N, Mercadé E (2008) *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1346–1349
43. Nevot M, Deroncelé V, López-Iglesias C, Bozal N, Guinea J, Mercadé E (2006) Ultrastructural analysis of the extracellular matter secreted from the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Microb Ecol* 51:501–507
44. Nevot M, Deroncelé V, Messner P, Guinea J, Mercadé E (2006) Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Environ Microbiol* 8:1523–1533
45. Post D, Zhang D, Eastvold J, Teghanemt A, Gibson BW, Weiss PW (2005) Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Biol Chem* 280:38383–38394
46. Puig M, Fusté C, Viñas M (1993) Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* 39:108–111
47. Schooling SR, Beveridge TJ (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 188:5945–5957
48. Slater M, Schaechter M (1974) Control of cell division in bacteria. *Bacteriol Rev* 38:199–221
49. Stukalov O, Korenevsky A, Beveridge TJ, Dutcher JR (2008) Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. *Appl Environ Microbiol* 74:5457–5465
50. Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermark M, Oscarsson J, Jass J, Richter-Dahlfors A, Mizunoe Y, Uhlin BE (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* 115:25–35
51. Wetherbee R, Lind JL, Burke J, Quatrano RS (1998) The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *J Phycol* 34:9–15
52. Wolfardt GM, Lawrence JR, Korber DR (1999) Function of EPS. In: Wingender J, Neu TR, Flemming HC (eds) *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Springer, New York, pp 171–200

Erratum to: Membrane Vesicles: A Common Feature in the Extracellular Matter of Cold-Adapted Antarctic Bacteria

Alina Frias · Angeles Manresa · Eliandre de Oliveira ·
Carmen López-Iglesias · Elena Mercade

Erratum to: Microb Ecol DOI 10.1007/s00248-009-9622-9

In the last part of the results before the chapter of Discussion the following number of Table 2 should be changed

“Proteins putatively identified from *S. livingstonensis* NF22-derived MVs are shown in Table 3”.

And Table 3 has to be introduced because it is not present in the article on-line.

Table 3. Proteins identified by 1D SDS-PAGE from *Shewanella livingstonensis* NF22

| *Band no. | Protein annotation | Protein Accesión no. | Mowse score | Coverage (%) | Peptides Matches | Species | |
|-------------------------|--|-------------------------|--------------|--------------|------------------|---|---|
| 1 | TonB-dependent receptor | gi 114563586 | 207>53 | 5 | 8 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 | |
| | TonB-dependent receptor | gi 1120598453 | 185>53 | 3 | 4 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 | |
| | TonB-dependent receptor | gi 114563641 | 176>53 | 3 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 | |
| | TonB-dependent receptor | gi 114561796 | 135>53 | 4 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 | |
| | Bifunctional UDP-sugar hydrolase/ 5'-nucleotidase periplasmic precursor | gi 91793491 | 112>53 | 4 | 2 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 | |
| | Hypothetical protein Sfri_2571 | gi 114563737 | 101>53 | 3 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 | |
| | Bifunctional UDP-sugar hydrolase/ 5'-nucleotidase periplasmic precursor | gi 15642173 | 94>53 | 3 | 2 | <i>Vibrio cholerae</i> N16961 | |
| | Bifunctional UDP-sugar hydrolase/ 5'-nucleotidase periplasmic precursor | gi 149192364 | 94>53 | 3 | 2 | <i>Vibrio shilonii</i> AK1 | |
| | TonB-dependent receptor | gi 170726911 | 66>53 | 2 | 2 | <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908 | |
| | Hypothetical protein Sputw3181_1613 | gi 120598430 | 53>53 | 2 | 2 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 | |
| 2 | Bifunctional UDP-sugar hydrolase/ 5'-nucleotidase periplasmic precursor | gi 91793491 | 230>53 | 7 | 8 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 | |
| | Bifunctional UDP-sugar hydrolase/ 5'-nucleotidase periplasmic precursor | gi 114563480 | 193>53 | 8 | 5 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 | |
| | Bifunctional UDP-sugar hydrolase/ 5'-nucleotidase periplasmic precursor | gi 15642173 | 148>53 | 3 | 3 | <i>Vibrio cholerae</i> N16961 | |
| | Bifunctional UDP-sugar hydrolase/ 5'-nucleotidase periplasmic precursor | gi 149192364 | 148>53 | 3 | 3 | <i>Vibrio shilonii</i> AK1 | |
| | MscS mechanosensitive ion channel | gi 92115219 | 54>53 | 1 | 1 | <i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043 | |
| | UDP-sugar hydrolase | gi 119468684 | 54>53 | 1 | 1 | <i>Alteromonadales bacterium</i> TW-7 | |
| | Transporter, putative | gi 26989506 | 53>53 | 1 | 2 | <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | |
| | 3 | TonB-dependent receptor | gi 114563586 | 334>52 | 10 | 9 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | | TonB-dependent receptor | gi 114563641 | 297>52 | 5 | 6 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | | TonB-dependent receptor | gi 109899987 | 133>52 | 2 | 2 | <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c |
| TonB-dependent receptor | | gi 114561796 | 132>52 | 2 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 | |
| | TonB-dependent receptor | gi 120598453 | 120>52 | 2 | 4 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 | |

| | | | | | | |
|----|---|------------------------------|--------|----|----|---|
| | TonB-dependent receptor | gi 114563610 | 89>52 | 1 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Peptidase M16 domain-containing protein | gi 114562249 | 68>52 | 1 | 1 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Outer membrane receptor protein | gi 229240126 | 61>52 | 1 | 1 | <i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588 |
| 4 | TonB-dependent siderophore receptor | gi 114565192 | 392>52 | 15 | 7 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | TonB-dependent siderophore receptor | gi 20600832 | 348>52 | 12 | 8 | <i>Shewanella</i> sp. W3-18-1 |
| | TonB-dependent siderophore receptor | gi 114564869 | 254>52 | 7 | 4 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | TonB-dependent siderophore receptor | gi 117922558 | 234>52 | 11 | 7 | <i>Shewanella</i> sp. ANA-3 |
| | TonB-dependent siderophore receptor | gi 114564386 | 147>52 | 3 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | GTPase-translation elongation factor | gi 149773203 | 57>52 | 4 | 1 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| 6 | Phosphate-selective porin O and P | gi 114565185 | 421>53 | 24 | 11 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Phosphate-selective porin O and P | gi 91792000 | 198>53 | 16 | 6 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | TolB domain-containing protein | gi 114562639 | 95>53 | 7 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | TolB-like protein | gi 91792752 | 69>53 | 7 | 3 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | 7-cyano-7-deazaguanine reductase | gi 119899798 | 65>53 | 2 | 1 | <i>Azoarcus</i> sp. BH72 |
| 7 | Long-chain fatty acid transport protein | gi 149675710 | 185>53 | 14 | 5 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Type I secretion outer membrane protein, TolC family protein | gi 219806612 | 159>53 | 12 | 5 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Phosphate-selective porin O and P | gi 114565185 | 136>53 | 6 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Iron regulated protein | gi 164454447 | 124>53 | 6 | 2 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Outer membrane channel protein | gi 164454447 | 121>53 | 9 | 4 | <i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3 |
| | Type I secretion outer membrane protein, TolC | gi 164454447 | 121>53 | 10 | 4 | <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 |
| | Phosphate-selective porin O and P | gi 91792000 | 70>53 | 2 | 1 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Hypothetical protein | gi 149773199 | 63>53 | 5 | 2 | <i>Shewanella livingstonensis</i> |
| | Putative lipoprotein | gi 91792084 | 52>53 | 2 | 1 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| | Type IV pilus assembly PilZ | gi 91792394 | 51>53 | 1 | 1 | <i>Shewanella denitrificans</i> OS217 |
| 8 | Porin | gi 114561689 | 690>52 | 40 | 23 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| | Phosphate-binding periplasmic protein precursor | gi 33592211 | 124>52 | 15 | 5 | <i>Bordetella pertussis</i> Tohama I |
| | Phosphate-binding periplasmic protein precursor | gi 163857838 | 121>52 | 14 | 5 | <i>Bordetella petrii</i> DSM 12804 |
| | Major outer membrane lipoprotein I | gi 3201826 | 52>52 | 13 | 1 | <i>Pseudomonas oleovorans</i> |
| 9 | Membrane protein involved in aromatic hydrocarbon degradation | gi 114564966 | 90>62 | 5 | 2 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |
| 10 | Hypothetical protein Sfri_3402 | gi 114564563 | 129>53 | 18 | 3 | <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 |

Individual scores >n indicate identity or extensive homology (p<0.05)

* Band numbers are as indicated in Fig. 4

Shewanella vesiculosa sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area

Núria Bozal, M^a Jesús Montes, David Miñana-Galbis, Angeles Manresa and Elena Mercadé

Correspondence

Elena Mercadé
mmercade@ub.edu

Laboratori de Microbiologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

Two strains of psychrotolerant bacteria, designated M7^T and M5, isolated from Antarctic coastal marine environments were studied to determine their taxonomic position. The organisms comprised Gram-negative, rod-shaped, facultatively anaerobic cells that were motile by means of single polar flagella. Neither of the bacterial isolates had a requirement for Na⁺. These two psychrotolerant strains grew at temperatures ranging from –4 to 30 °C. Both strains were capable of producing H₂S from thiosulfate and were able to use sodium nitrate and trimethylamine *N*-oxide as terminal electron acceptors during anaerobic growth. 16S rRNA gene sequence analysis placed M7^T and M5 within the genus *Shewanella*; the strains showed the highest similarity (99.9 and 99.2% respectively) with respect to the type strains of *Shewanella livingstonensis* and *Shewanella frigidimarina*. However the levels of *gyrB* sequence similarity between strain M7^T and the type strains of *S. livingstonensis* and *S. frigidimarina* were 87.6 and 87.4%, respectively. DNA–DNA hybridization experiments performed between the Antarctic isolate M7^T and *S. livingstonensis* LMG 19866^T and *S. frigidimarina* LMG 19475^T revealed levels of relatedness of 32 and 35%, respectively. Strain M5 showed 100% DNA relatedness with respect to strain M7^T. The DNA G + C content of these bacteria was 42 mol%. Several phenotypic characteristics, the cellular fatty acid compositions and the quinone content of strains M7^T and M5 served to differentiate them from related shewanellae. On the basis of the data from this polyphasic taxonomic study, M7^T and M5 constitute a single genospecies. They represent a novel species of the genus *Shewanella*, for which the name *Shewanella vesiculosa* sp. nov. is proposed. The type strain is M7^T (=LMG 24424^T =CECT 7339^T).

The genus *Shewanella* was first described by MacDonell & Colwell (1985). The definition was based almost entirely on rRNA structure and included only the description ‘straight or curved rods, Gram-negative, non-pigmented, motile by polar flagella, chemo-organotrophic, oxidase-positive, generally associated with aquatic or marine habitats. G + C mol% 44–47’. Although the taxonomy of this group has been developed in the last decade, *Shewanella putrefaciens* has been studied since its first description as *Achromobacter putrefaciens* by Derby & Hammer (1931), because of its special importance in the areas of applied and environmental microbiology.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of strains M7^T and M5 are AM980877 and AM980878, respectively, and those for the *gyrB* gene sequences of strains M7^T and *S. livingstonensis* NF22^T are EU702750 and EU702751, respectively.

Transmission electron micrographs of ultrathin sections of cells of strain M7^T and details of the cellular fatty acid compositions for strains M7^T and M5 are presented as supplementary material available with the online version of this paper.

Currently, more than 40 species are assigned to the genus *Shewanella* on the basis of genetic and phenotypic analyses (<http://www.bacterio.cict.fr/s/shewanella.html>). The shewanellae constitute a diverse group of facultatively anaerobic bacteria. Their ability to utilize a variety of final electron acceptors in the absence of oxygen and their capacity to grow at low temperatures and various salt concentrations and barometric pressures allow them to survive in extreme environments, such as those of Antarctica (Bowman *et al.*, 1997; Bozal *et al.*, 2002). Because of their potential uses in bioremediation and energy-generating biocatalysis, shewanellae are being studied intensively, not only taxonomically, but also in terms of genomics, ecology and biotechnology (Venkateswaran *et al.*, 1999; Hau & Galnick, 2007).

During the characterization of psychrotolerant organisms isolated from Antarctica, strains M7^T and M5 were recovered from marine sediments collected at Deception Island (South Shetland Islands). Sample aliquots were removed with a platinum loop and were diluted in Ringer solution (Oxoid). Marine agar (Difco) and tryptic soy agar

(TSA; Oxoid) plates were inoculated with loopfuls of several sample dilutions by using the streak-plate method to obtain isolated colonies. Plates were incubated for 7 days at 15 °C. Growth was observed on both media. Isolates were maintained aerobically on TSA slopes at 4 °C and also at -80 °C on cryo-beads (AES Laboratoire).

The morphology, size and shape of cells grown on TSA at 15 °C were determined by means of negative staining (uranyl acetate at 2%, w/v) and transmission electron microscopy (JEOL 1010) of ultrathin sections after freeze fixation and freeze-substitution (Nevot *et al.*, 2006). Motility was investigated by means of phase-contrast microscopy. Oxidase, catalase and urease activities, nitrate reduction and hydrolysis of casein, lecithin, gelatin, DNA, starch and Tween 80 were determined according to Barrow & Feltham (1993). Utilization of carbohydrates, enzyme production and additional characteristics were determined by using API 50 CH, API ZYM and API 20NE strips (bioMérieux). NaCl tolerance was measured on nutrient agar (Cultimed) containing 0–10% (w/v) NaCl; plates were incubated at 15 °C for 14 days. The temperature range for growth was determined on TSA incubated for 14 days at temperatures from -4 to 37 °C. The pH range for growth was established in tryptic soy broth (TSB; Difco) at pH 4.0–10.0 (using increments of 0.5 pH units) at 15 °C for 10 days. Anaerobic growth tests were performed in a modified YP liquid medium prepared according to Toffin *et al.* (2004). Trimethylamine *N*-oxide (10 mM) and sodium nitrate (3 mM) were tested as electron acceptors, with 10 mM lactate as the electron donor and carbon source. Anaerobic conditions were generated in anaerobic chambers (Oxoid) with AnaeroGen (Oxoid) and an anaerobic indicator (Oxoid) and plates were incubated at 15 °C for 10 days. Before storage at 15 °C, anaerobic jars were kept overnight at -4 °C to ensure that anoxic conditions had developed before strain growth could occur. Growth on the plates was compared with growth on control plates containing the same medium but without an organic carbon substrate.

The Antarctic bacterial isolates M7^T and M5 comprised Gram-negative, rod-shaped, non-spore-forming cells. On TSA incubated at 15 °C for 2 days, colonies were circular, smooth, convex, slightly mucous and 1–2 mm in diameter. After 1 week, colonies became more mucous and brownish-coloured. On marine agar, colonies were similar but orange in colour. Diffusible pigments and bioluminescence were not observed. Transmission electron microscopy of ultrathin sections of cells of strain M7^T showed that large numbers of outer-membrane vesicles were released (see Supplementary Fig. S1, available in IJSEM Online). Cells were motile by means of single polar flagella. Neither isolate required Na⁺ for growth. The strains were chemo-organotrophic and capable of respiratory and fermentative metabolism. Both strains were positive for cytochrome oxidase and catalase. They reduced nitrate to nitrite, and nitrogen gas was not formed from nitrite. M7^T and M5 were able to grow anaerobically by reducing trimethyla-

mine *N*-oxide or sodium nitrate while using DL-lactate as the electron donor.

The results of the morphological and phenotypic investigations are given in the species description and in Table 1. Phenotypic studies showed that the isolates displayed characteristics consistent with those for the genus *Shewanella*, but strain M7^T differed significantly from related species (*Shewanella livingstonensis*, *S. frigidimarina*, *S. hafniensis*, *S. putrefaciens*, *S. gaetbuli* and *S. morhuae*) in terms of several phenotypic properties, such as temperature requirements, NaCl requirements, enzyme activities and metabolism of certain sugars.

Cellular fatty acid and isoprenoid quinone compositions were determined for cell mass grown on TSB agar (30 g TSB, 15 g agar; Oxoid) for 4 days at 20 °C, as described previously (Bozal *et al.*, 2002). The most abundant fatty acids were summed feature 3 (C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH; 25.41% in strain M7^T), iso-C_{13:0} (13.20%), iso-C_{15:0} (9.70%), C_{16:0} (9.73%), C_{17:1}ω8c (7.84%) and C_{15:0} (5.73%) (see Supplementary Table S1). The isolates had cellular fatty acid profiles that were similar to those of phylogenetically closely related type strains of *S. livingstonensis* and *S. frigidimarina*; however, strains M7^T and M5 had lower levels of monounsaturated fatty acids and increased levels of terminally branched saturated fatty acids and, unlike *S. frigidimarina*, strain M7^T did not produce eicosapentaenoic acid (C_{20:5}ω3) (Nichols *et al.*, 1994; Bowman *et al.*, 1997; Venkateswaran *et al.*, 1999; Bozal *et al.*, 2002). Strains M7^T and M5 contained ubiquinones (Q-7, Q-8) and menaquinones (MK-7 and MMK-7) that are commonly found in *Shewanella* species (Bozal *et al.*, 2002; Bowman, 2005).

Total DNA for complete 16S rRNA gene sequence analysis was prepared according to the protocol of Niemann *et al.* (1997). A total of 1495 nt from the 16S rRNA gene were sequenced, as described previously by Bozal *et al.* (2002). A phylogenetic analysis was performed using the software package BioNumerics (Applied Maths). Distance analysis and clustering was done using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987). For strain M7^T and *S. livingstonensis* LMG 19866^T, the *gyrB* gene was PCR-amplified with universal primer sets, as described by Yamamoto & Harayama (1995), and subsequently sequenced. The identity of a given PCR product was verified by means of bidirectional sequencing analysis. Multiple alignment, distance matrix analysis and phylogenetic analysis of *gyrB* sequences obtained in this study and others available in the public databases were performed using MEGA, version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method (with Kimura's two-parameter model and the pairwise deletion option) and its topological robustness was evaluated by means of a bootstrap analysis of 1000 replicates. For DNA–DNA hybridizations and determination of G+C content, total DNA was prepared according to a modification of the procedure of Wilson (1987). The

G+C content was determined by using the HPLC technique, as described by Mesbah *et al.* (1989). DNA–DNA hybridizations were performed at 47 °C according to a modification (Goris *et al.*, 1998; Cleenwerck *et al.*, 2002) of the method described by Ezaki *et al.* (1989).

The 16S rRNA gene phylogenetic studies confirmed that the Antarctic isolates (strains M7^T and M5) were members of the genus *Shewanella*. The highest levels of 16S rRNA gene sequence similarity were found with *S. livingstonensis* LMG 19866^T (99.9%) and *S. frigidimarina* ACAM 591^T (99.2%); lower levels of similarity (97.0–97.5%) occurred with strains of other *Shewanella* species with validly published names (Fig. 1). Strain M5 showed 100.0% 16S rRNA gene sequence similarity with respect to M7^T, indicating that these strains probably belong to the same species. On the basis of *gyrB* gene sequences, the nearest neighbours of strain M7^T were again the type strains of *S. livingstonensis* and *S. frigidimarina* (Fig. 2), but with

sequence similarities of 87.6 and 87.4%, respectively. These similarity values are lower than the 90% species cut-off value proposed for *Shewanella* by Venkateswaran *et al.* (1999), and the *gyrB* sequence of strain M7^T formed a monophyletic branch in the tree shown in Fig. 2, suggesting that this strain represents a novel *Shewanella* species. To verify the taxonomic position of strain M7^T, DNA–DNA hybridizations were performed with *S. livingstonensis* LMG 19866^T and *S. frigidimarina* LMG 19475^T. The low DNA–DNA reassociation values (32 and 35% with respect to *S. livingstonensis* LMG 19866^T and *S. frigidimarina* LMG 19475^T, respectively) and the results of the 16S rRNA and *gyrB* gene sequence analyses indeed demonstrated the distinct position of strain M7^T within the genus *Shewanella* (Wayne *et al.*, 1987). Strain M5 showed 100% DNA relatedness with respect to M7^T and it can be concluded that M5 and M7^T belong to the same genospecies. Their DNA G+C content (42 mol%) lies

Table 1. Differential characteristics for strains M7^T and M5 and their closest phylogenetic neighbours

Strains/species: 1, M7^T (strain M5 showed identical results with the exception that it did not grow with 7% NaCl); 2, *S. livingstonensis* (data from Bozal *et al.*, 2002); 3, *S. frigidimarina* (Bowman *et al.*, 1997); 4, *S. hafniensis* (Satomi *et al.*, 2006); 5, *S. putrefaciens* (Venkateswaran *et al.*, 1999); 6, *S. gaetbuli* (Yoon *et al.*, 2004); 7, *S. morhuae* (Satomi *et al.*, 2006). All species are Gram-negative rods that are motile by means of single polar flagella and all are positive for growth at 4 °C at 3% NaCl and for catalase and oxidase activities. +, Positive; –, negative; ND, no data available; v–, 11–89% of strains negative, type strain negative.

| Characteristic | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------------------|-------|-----|---------|---------|-------|---------|---------|
| Cell length (µm) | 1.5–3 | 1–3 | 1.0–2.5 | 1.0–1.2 | ND | 1.5–3.0 | 1.0–1.2 |
| Cell diameter (µm) | 0.5 | 0.4 | 0.5–0.8 | 0.5–0.7 | ND | 0.5–0.7 | 0.5–0.7 |
| Growth at/with: | | | | | | | |
| 30 °C | + | – | – | + | + | + | + |
| 37 °C | – | – | – | – | + | + | – |
| 0% NaCl | + | + | + | + | + | – | ND |
| 7% NaCl | + | – | + | – | – | + | – |
| Reduction of nitrate to nitrite | + | + | + | + | + | – | + |
| Production of H ₂ S | + | + | + | + | + | – | + |
| Enzyme activities | | | | | | | |
| Lipase (C14) | + | – | ND | ND | ND | – | ND |
| α-Chymotrypsin | + | – | ND | ND | + | + | ND |
| β-Galactosidase (ONPG) | + | + | v– | ND | ND | – | ND |
| N-Acetyl-β-glucosaminidase | + | – | ND | ND | – | + | ND |
| Cystine arylamidase | – | + | ND | ND | ND | – | ND |
| DNase | + | – | + | + | + | ND | + |
| Lecithinase | + | – | + | ND | ND | ND | ND |
| Gelatinase | + | + | + | + | – | + | + |
| Utilization of: | | | | | | | |
| D-Galactose | + | + | v– | ND | + | – | ND |
| Glucose | + | + | + | + | – | ND | – |
| Sucrose | + | + | + | – | – | – | – |
| D-Xylose | – | + | v– | ND | ND | ND | ND |
| N-Acetylglucosamine | + | + | – | + | + | ND | + |
| Trehalose | – | + | + | ND | ND | ND | ND |
| Malate | + | – | + | + | + | – | + |
| D-Ribose | – | + | ND | ND | ND | ND | ND |
| DNA G+C content (mol%) | 42 | 41 | 40–43 | 47 | 43–47 | 42 | 44 |

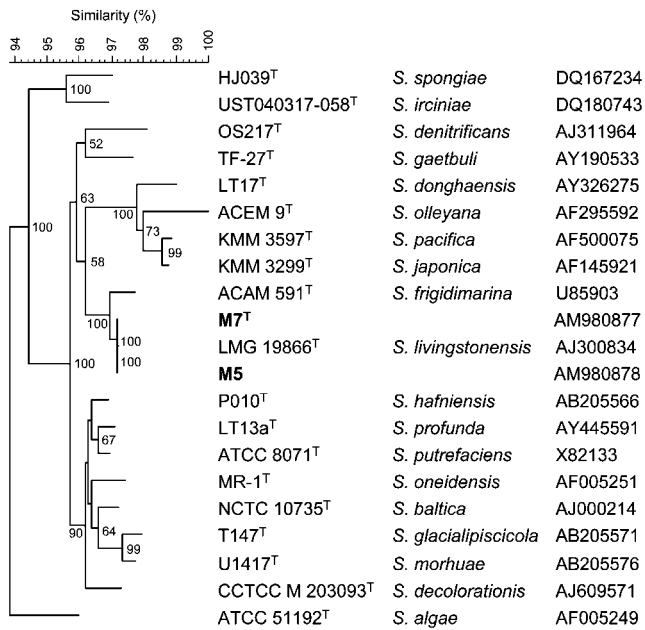


Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the position of Antarctic isolates M7^T and M5 among neighbouring species of the genus *Shewanella*. Bootstrap percentages >50% (based on 1000 replications) are shown at branch points.

within the range described for members of the genus *Shewanella*.

Description of *Shewanella vesiculosa* sp. nov.

Shewanella vesiculosa (ve.si.cu.lo'sa. L. fem. adj. *vesiculosa* full of blisters, vesiculosus).

Cells are rod-shaped (0.5 µm wide and 1.5–3 µm long), Gram-negative, facultatively anaerobic and non-spore-forming. Cells are motile by means of single polar flagella. After 48 h incubation at 15 °C on TSA, colonies are 1–2 mm in diameter, smooth, round with regular edges, slightly mucous and slightly brownish. The growth temperature ranges from –4 to 30 °C (optimum 15–20 °C), the pH range for growth is 6.0–8.5 (optimum approx. pH 7.5) and sodium ions are not required for growth. Optimal growth occurs in the presence of 2% NaCl (w/v); no growth in the presence of >7% NaCl. Positive for oxidase, catalase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, α-chymotrypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α-glucosidase, β-glucosidase, β-galactosidase and *N*-acetyl-β-glucosaminidase, but negative for cystine arylamidase, trypsin, α-galactosidase, β-glucuronidase, α-mannosidase and α-fucosidase. Positive for hydrolysis of aesculin, Tween 80, gelatin, casein and lecithin, but negative for hydrolysis of urea and starch. Hydrogen sulfide is produced from thiosulfate. Cells are able to grow anaerobically by reducing trimethylamine *N*-oxide and sodium nitrate with lactate as the electron donor. With the API 50 CH test, growth is positive for *D*-glucose, *D*-galactose, *D*-mannitol, *N*-acetylglucosamine, cellobiose, maltose, melibiose, malate and sucrose. The most abundant fatty acids are summed feature

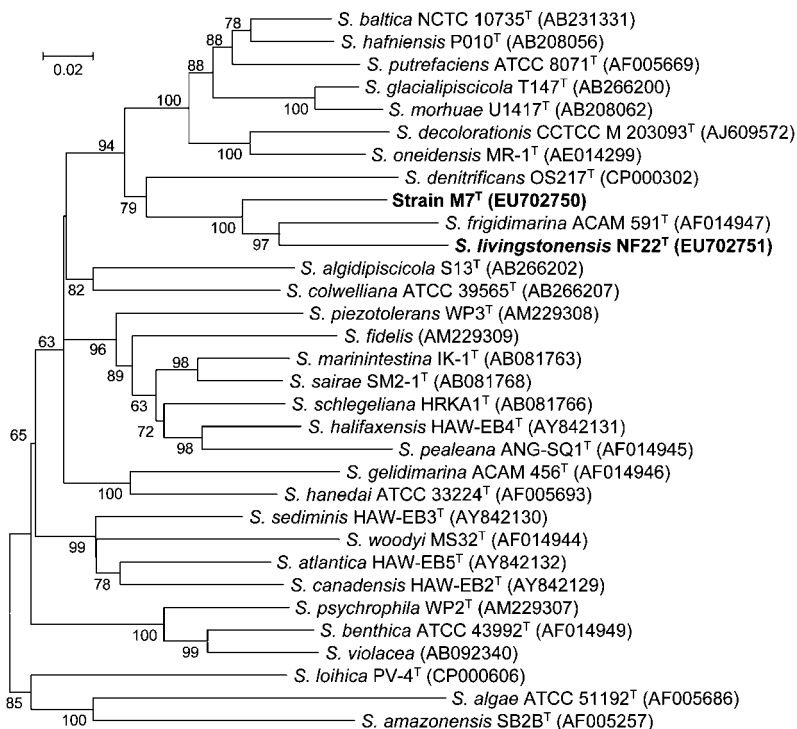


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on *gyrB* sequences of strains M7^T and *S. livingstonensis* NF22^T (determined in this study) and strains of the genus *Shewanella*. Bootstrap percentages >50% (based on 1000 replicates) are shown. Bar, 2% sequence divergence.

3 (C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH), iso-C_{13:0}, iso-C_{15:0}, C_{16:0}, C_{17:1}ω8c and C_{15:0}. The quinone composition of the type strain is Q-7 (50.5%), Q-8 (25.3%), MK-7 (14.4%) and MMK-7 (9.8%). The DNA G+C content of the type strain is 42 mol%.

The type strain, M7^T (=LMG 24424^T =CECT 7339^T), was isolated from marine sediments collected from Deception Island (South Shetland Islands, Antarctica).

Acknowledgements

This paper is dedicated to the memory of Jesús Guinea Sánchez, who isolated these Antarctic strains. We would like to thank Josefina Castellví for providing Antarctic samples. We gratefully acknowledge the assistance of F. García (Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca, Generalitat de Catalunya, Spain) with the fatty acid analysis. We are grateful to I. Casals for help with quinone identification and to C. López-Iglesias for transmission electron microscopy support (Serveis Científic Tècnics de la Universitat de Barcelona). We acknowledge the BCCM/LMG Identification Service (Universiteit Gent, Ghent, Belgium) for performing hybridization analyses and 16S rRNA gene sequence analysis. This research was supported by the Government of Spain (CICYT project CTQ 2007-60749/PPQ) and by the Autonomous Government of Catalonia (grant 2005SGR00066).

References

- Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bowman, J. P. (2005). Genus XIII. *Shewanella* MacDonell and Colwell 1986, 355^{VP}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 480–491. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Nichols, D. S., Skerratt, J. H., Rea, S. M., Nichols, P. D. & McMeekin, T. A. (1997). *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5ω3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1040–1047.
- Bozal, N., Montes, M. J., Tudela, E., Jiménez, F. & Guinea, J. (2002). *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 195–205.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D. & Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1551–1588.
- Derby, H. A. & Hammer, B. W. (1931). Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies on surface taint butter. *Iowa Agric Exp Stn Res Bull* 145, 389–416.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in micro-dilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 39, 224–229.
- Goris, J., Suzuki, K., De Vos, P., Nakase, T. & Kersters, K. (1998). Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can J Microbiol* 44, 1148–1153.
- Hau, H. H. & Gralnick, A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol* 61, 237–258.
- MacDonell, M. T. & Colwell, R. R. (1985). Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* 6, 171–182.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159–167.
- Nevot, M., Deroncele, V., López-Iglesias, C., Bozal, N., Guinea, J. & Mercade, E. (2006). Ultrastructural analysis of the extracellular matter secreted from the psychrotolerant bacterium *Pseudomonas antarctica* NF₃. *Microb Ecol* 51, 501–507.
- Nichols, D. S., McMeekin, T. A. & Nichols, P. D. (1994). Manipulation of polyunsaturated, branched-chain and *trans*-fatty acid production in *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342. *Microbiology* 140, 577–584.
- Niemann, S., Puehler, A., Tichi, H. V., Simon, R. & Selbitschka, W. (1997). Evaluation of the resolving power of the three different fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J Appl Microbiol* 82, 477–484.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425.
- Satomi, M., Fønnesbech Vogel, B., Gram, L. & Venkateswaran, K. (2006). *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 243–249.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596–1599.
- Toffin, L., Bidault, A., Pignet, P., Tindall, B. J., Slobodkin, A., Kato, C. & Prieur, D. (2004). *Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deep marine sediment of the Nankai Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1943–1949.
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., Ringelberg, D. B., White, D. C., Nishijima, M. & other authors (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 705–724.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463–464.
- Wilson, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 2.4.1–2.4.5. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. New York: Green Publishing & Wiley-Interscience.
- Yamamoto, S. & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* 61, 1104–1109.
- Yoon, J. H., Kang, K. H., Oh, T. K. & Park, Y. H. (2004). *Shewanella gaetbuli* sp. nov., a slight halophile isolated from a tidal flat in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 487–491.