



**Universitat de les
Illes Balears**

**Caracterización genómica y fisiológica de la
capacidad degradadora de hidrocarburos
aromáticos de *Citreicella aestuarii* 357**

TESIS DOCTORAL

Lady Yesenia Suárez Suárez

Directores:

Rafael Bosch Zaragoza

Balbina Nogales Fernández

Departamento de Biología.

Universitat de les Illes Balears

Palma de Mallorca. Junio 2013



Universitat de les
Illes Balears

**Caracterización genómica y fisiológica de la
capacidad degradadora de hidrocarburos
aromáticos de *Citricella aestuarii* 357**

Tesis doctoral presentada por Lady Yesenia Suárez Suárez para optar al título de Doctora en el programa Microbiología Ambiental y Biotecnología, bajo la dirección de los Drs. Rafael Bosch Zaragoza y Balbina Nogales Fernández.

Vº Bº Directores Tesis

La doctoranda

Dra. Balbina Nogales

Dr. Rafael Bosch

Lady Yesenia Suárez

Palma de Mallorca. Junio 2013

A MI FAMILIA...

La vida es una sinfonía compuesta de tres movimientos distintos: "muchas personas", "algunas personas" y "casi nadie". Cada uno de ellos dura aproximadamente cuatro meses por año, se mezclan con frecuencia durante el mismo mes, pero no se confunde (Paulo Coelho).

Mi primer agradecimiento va al ser supremo y a mi familia. Gracias mami por el apoyo moral y económico al finalizar esta etapa, no es fácil, mil gracias, el tiempo vendrá con su respectiva recompensa.

Para desarrollar tanto el programa del Máster en Microbiología avanzada y el programa de Doctorado en Microbiología Ambiental y Biotecnología hay varias personas involucradas, lo cual, durante este tiempo he tenido la oportunidad de agradecer personalmente pero que es necesario dejarlo por escrito para no olvidarlo.

Todo inició por el reto de la movilidad de estudiantes iberoamericanos a la Universitat de les Illes Balears (UIB), en este caso con la financiación del Grupo Banco de Santander, un componente deseable en la formación universitaria de éstos y un medio para mejorar la calidad de vida a través de la enseñanza y el incentivo por la investigación, constituyendo un elemento generador de beneficio para los estudiantes como para la institución. Al mismo tiempo un factor importante que contribuye a la integración y a una mayor cohesión de los países al favorecer el contacto a una diversidad cultural y lingüística.

Gracias a la Doctora Montserrat Casas (Q.E.P.D) rectora de la Universidad durante este tiempo y a su grupo de colaboradores, entre ellos al Doctor Jaume Carot que tengo la oportunidad de conocer y que desde un principio mostraron su interés y colaboración a cada uno de los estudiantes y a los que no conozco personalmente, muchas gracias por su trabajo y que continúan con este reto a pesar de las circunstancias. También al Doctor Gaspar Piza que desde Colombia y hasta el momento su gestión ha permitido mi estancia en España, como también la de otros estudiantes. Doctor Gaspar, tiene varias invitaciones, a recorrer el mundo, que lo esperamos.

Cuando llegue al programa de Microbiología, fueron muchas las expectativas y me siento agradecida por formar parte del grupo, es por eso que doy mil gracias al doctor Rafael Boch Zaragoza (El jefe) y a la doctora Balbina Nogales por tener el desafío de aceptarme en su grupo de investigación y tener la

paciencia de enseñarme a explorar este mundo científico, que muy pocos tenemos esta oportunidad. Gracias Jefe por sus constantes consejos tanto a nivel personal como profesional, lo admiro por mantener siempre la alegría en el desarrollo de sus múltiples actividades. Mil gracias por su apoyo desde el primer día que pise su oficina (muy desubicada me encontraba) y durante todo este tiempo y hasta el momento (creo que ya estoy ubicada). Doctora Balbina, apoyo lo que siempre desea en los estudiantes: constancia y disciplina en el trabajo y en la vida para lograr los objetivos. Gracias por su apoyo durante este tiempo.

Al doctor Jorge Lalucat, que a través de la respuesta a un e-mail a inicios del año 2008, me animó a participar en la primera convocatoria y para este propósito tuve la oportunidad de conocer los diversos e interesantes proyectos que tenían en desarrollo y fue un motivo para aplicar.

A la doctora Elena García gracias por sus palabras de ánimo, por compartir sus ideas y aspectos personales.

Al doctor Antonio Bennasar gracias por estar atento y disponible a cualquier duda científica que tenía.

De acuerdo al psicoanalista suizo Carl G Jung en su frase célebre “Conozca todas las teorías. Domine todas las técnicas, pero al tocar un alma humana sea apenas otra alma humana” me hace recordar a mis compañeros de laboratorio: Juana, Josep, Mariana, Claudia Scotta, Margarita, Antonio Busquet, Magda, Cristina, Claudia Prince, David, Bell, Maria, Katie, Aratxa y Sebastian que durante este tiempo compartieron sus cosas personales, conocimientos y técnicas científicas. Les deseo buena energía en cada cosa que deseen. Gracias por su compañía en el laboratorio.

A las personas que han pasado por el laboratorio durante este tiempo: Monika, Carlos Andrés, Hassi, Farid, Fredy, Denny, Ana, Daniel, Elizabeth, Alfaniris y Glenys. Cada vez aprendo a ver la vida en diferentes perspectivas, cada uno aportó pensamientos nuevos, todos hemos llegado con expectativas y que

bueno es saber que es posible hacer realidad los proyectos personales. Hay que desaprender para aprender es lo que siempre concluimos.

Gracias al equipo científico técnico por su colaboración entre ellos a Ferrat Hierro de microscopia electrónica, el objetivo principal “poder medir lo que es inmedible”, gracias por su tiempo. También a Josep Pablo Cànaves (Pau), Maribel Cabra y Maribel Gil Cardona, gracias por su tiempo, colaboración y servicio durante mi trabajo en HPLC, ser mis profesores en este tema y compartir aquellos trucos que no están revelados en los libros, no olvidaré las discusiones filosófica, sociológica y teorías de la vida al compartir las horas que amablemente tenían disponible, a pesar de sus obligaciones profesionales y personales. Mil gracias chicos, les recordare siempre.

Al personal del laboratorio, Angel, Xisco, gracias por hacerme los días alegres, con sus ocurrencias siempre lograron sacarme una sonrisa y a Guillem con sus interpretaciones corales daban un toque especial a los viernes. Su servicio y amabilidad también contribuyeron a este logro.

Por último, a cada una de las personas que tuve la oportunidad de conocer y que en su respectivo tiempo fueron un apoyo en los malos momentos y en los buenísimos que pasamos: Ceci, Gustavo, Jakie, Hector, Laura, Angelica, Edwim, Carol, Jessika, Rafa, Oscar, Dominik, Alan, Hilda, Jesús, Victor, Jazmin, Stefania, Fatima, Anand, Lamiae, Susana (inmensa lista) y al grupo de química analítica (conocida como la ONU), con el tiempo fuimos formando un grupo de amigos muy particular, aceptando y aprendiendo de cada uno su cultura, alguna palabra de su idioma, comida y hasta sus propias locuras, nuestro fin fue compartir la vida en Mallorca, sólo nos queda el recuerdo y el deseo de vernos pronto en algún lugar con previo aviso sin necesidad del Skype.

Finalmente agradecer a los proyectos CTM2008-02574, CTM2011-24886 y a una ayuda de la Conselleria d'Educació, cultura i Universitats a grupos competitivos (los dos últimos con co-financiación fondos FEDER) que han aportado los fondos necesarios para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Índice	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	V
Resumen y palabras clave	VII
Abstract and keywords	VIII
Introducción	1
1. Generalidades del grupo <i>Roseobacter</i> .	2
2. Degradación de hidrocarburos en el grupo <i>Roseobacter</i> .	5
3. Degradación de hidrocarburos poliaromáticos (PAHs): el naftaleno como modelo.	9
Objetivos	15
Materiales y métodos	17
1. Caracterización taxonómica y fisiológica de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	18
1.1. Medios y condiciones de cultivo.	18
1.2. Caracterización fenotípica.	18
1.3. Hibridación ADN-ADN.	19
1.4. Microscopia electrónica.	19
1.5. Análisis filogenético del ADNr 16S.	19
2. Análisis genómico.	20
2.1. Secuenciación, ensamblaje, anotación y análisis genómico funcional.	20
2.2. Análisis filogenómico.	21
3. Identificación de metabolitos intermediarios de degradación.	22
3.1. Obtención de muestras.	22
3.2. Análisis químico.	23
Resultados y Discusión	25
1. Caracterización taxonómica de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	26
1.1. Análisis filogenético de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	26
1.2. Caracterización fenotípica de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	26
1.2.1. Morfología macroscópica y microscópica.	26
1.2.2. Caracterización fisiológica.	31
1.2.3. Caracterización bioquímica.	31
2. Caracterización genómica de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	33
2.1. Características genómicas globales de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	33
2.2. Adscripción filogenómica de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	35
2.3. Afiliación filogenómica de las CDSs de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	37
2.4. Análisis genómico funcional de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	42
2.4.1. Elementos genéticos móviles: transposasas y GTAs (Agentes de transferencia de genes).	42
2.4.2. Oxidación del H ₂ .	44
2.4.3. Oxidación de CO.	46
2.4.4. Transformación de compuestos de azufre.	48
2.4.5. Metabolismo del nitrógeno y el fósforo.	49
2.4.6. Síntesis de vitaminas.	53
2.4.7. Producción de metabolitos secundarios: antibióticos, NRP y AHL.	55
2.4.8. Motilidad y adhesión a superficies.	57
2.4.9. Estrategia trófica: fotoheterotrofia, autotrofia y heterotrofia.	62

3. Degradación de hidrocarburos aromáticos por <i>Citricella aestuarii</i> 357.	64
3.1. Potencial degradador de hidrocarburos de <i>Citricella aestuarii</i> 357.	64
3.1.1. Vías centrales de degradación: gentisato y homogentisato.	64
3.1.2. Vías periféricas de degradación: naftaleno y dibenzotiofeno.	67
3.1.3. Otras capacidades catabólicas: ¿una nueva salicilato 1,2-hidroxilasa?	73
3.2. Caracterización fisiológica de la degradación de hidrocarburos.	78
3.3. Caracterización química de las vías degradativas.	84
3.3.1. Degradación de naftaleno, salicilato y gentisato.	84
3.3.2. Degradación de dibenzotiofeno.	90
Conclusiones	93
Bibliografía	97
Anexos.	111
Anexo I. Figuras suplementarias	111
Anexo II. Tablas suplementarias	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis filogenómico realizado por Newton y colaboradores (2010).	3
Figura 2. Organización de los genes del metabolismo del protocatecuato en diferentes bacterias, incluyendo los aislados E-37 y Y3F del grupo <i>Roseobacter</i> .	6
Figura 3. Representación esquemática de las seis rutas diferentes de metabolismo aeróbico de compuestos monoaromáticos presentes en tres genomas del grupo <i>Roseobacter</i> .	7
Figura 4. Vía de degradación de naftaleno a salicilato de <i>P. stutzeri</i> AN10 y <i>Pseudomonas</i> sp. ND6 (genes <i>nah</i>), <i>Ralstonia</i> sp. U2 (genes <i>nag</i>) y <i>Pseudomonas</i> sp. C18 (genes <i>dox</i>).	10
Figura 5. Posibles estrategias de ataque del salicilato por <i>P. stutzeri</i> AN10, <i>P. putida</i> ND6, <i>Ralstonia</i> sp. U2 y <i>Pseudoaminobacter salicylatoxidans</i> BN12.	11
Figura 6. Vía Kodama de degradación de dibenzotiofeno en <i>Pseudomonas</i> sp. C18.	13
Figura 7. Crecimiento de <i>Citricella aestuarii</i> 357 en placas de MMY suplementadas con hidrocarburos aromáticos como fuentes únicas de carbono y energía.	26
Figura 8. Análisis filogenético basado en el gen ADNr 16S de la cepa 357 y diversas cepas tipo de especies relacionadas.	28
Figura 9. Morfología colonial de <i>C. aestuarii</i> 357 en agar marino.	29
Figura 10. Morfología celular de <i>C. aestuarii</i> 357 por microscopía electrónica de transmisión.	30
Figura 11. Análisis filogenético basado en un concatenado de proteínas conservadas de la cepa 357 y otras 39 cepas del grupo <i>Roseobacter</i> con genomas secuenciados.	36
Figura 12. Distribución en COGs de las proteínas exclusivas de <i>C. aestuarii</i> 357.	38
Figura 13. Transposasas en el genoma de <i>C. aestuarii</i> 357.	44
Figura 14. Sintenia entre las agrupaciones génicas que codifican para las proteínas involucradas en la síntesis de las hidrogenasas NiFe-dependiente de <i>C. aestuarii</i> 357 y <i>S. stellata</i> E-37.	45
Figura 15. Sintenia entre las agrupaciones génicas que codifican para las proteínas involucradas en la síntesis de la CO deshidrogenasa de tipo II de <i>C. aestuarii</i> 357 y <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.	47
Figura 16. Maquinaria flagelar de <i>C. aestuarii</i> 357.	58
Figura 17. Maquinaria quimiotáctica de <i>C. aestuarii</i> 357.	59
Figura 18. Sistemas de secreción de <i>C. aestuarii</i> 357.	60

Figura 19. Predicción de las vías de degradación de homogentisato y gentisato en <i>C. aestuarii</i> 357.	64
Figura 20. Comparación genómica entre el <i>contig</i> C357_151 de <i>C. aestuarii</i> 357 y la región genómica de <i>P. gilvum</i> SL003B-26A1 ^T .	67
Figura 21. Comparación genómica entre el <i>contig</i> C357_151 de <i>C. aestuarii</i> 357 y las regiones genómicas de <i>X. polyaromaticivorans</i> 127W (AB121977) y <i>Ralstonia</i> sp. U2 (AF036940) implicadas en la degradación de dibenzotiofeno y naftaleno, respectivamente.	69
Figura 22. Vía de degradación de dibenzotiofeno de <i>C. aestuarii</i> 357.	70
Figura 23. Vía de degradación de naftaleno a salicilato de <i>Citreicella aestuarii</i> 357.	72
Figura 24. Grado de identidad de secuencia aminoacídica entre ZP_10018797.1 de <i>C. aestuarii</i> 357 y las 100 proteínas mas parecidas a ella presentes en la base de datos NR del NCBI.	74
Figura 25. Análisis filogenético de posibles salicilato 1,2-hidroxilasas del grupo <i>Roseobacter</i> .	75
Figura 26. Posibles estrategias de ataque del salicilato por <i>C. aestuarii</i> 357.	77
Figura 27. Acumulación de metabolitos en <i>Citreicella aestuarii</i> 357 crecida a expensas de naftaleno y dibenzotiofeno como fuentes únicas de carbono y energía.	81
Figura 28. Desulfurización de dibenzotiofeno.	83
Figura 29. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermediarios de la degradación de gentisato por <i>C. aestuarii</i> 357.	85
Figura 30. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermediarios de la degradación de salicilato por <i>C. aestuarii</i> 357.	85
Figura 31. Acumulación de metabolitos por <i>Citreicella aestuarii</i> 357 tras incubación con salicilato (3 mM).	86
Figura 32. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermediarios de la degradación de naftaleno por <i>C. aestuarii</i> 357.	88
Figura 33. Acumulación de metabolitos por <i>Citreicella aestuarii</i> 357 tras inducción con naftaleno (0,1% p/v).	89
Figura 34. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermediarios de la degradación de dibenzotiofeno por <i>C. aestuarii</i> 357.	90
Figura 35. Acumulación de metabolitos por <i>Citreicella aestuarii</i> 357 tras inducción con dibenzotiofeno (0,1% p/v).	91
Figura 36. Cuantificación de metabolitos intermediarios acumulados durante la desulfurización de dibenzotiofeno por <i>C. aestuarii</i> 357.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vías de degradación de compuestos aromáticos identificadas por Newton y colaboradores (2010) en genomas secuenciados del grupo <i>Roseobacter</i> .	8
Tabla 2. Resultado hibridación ADN-ADN.	27
Tabla 3. Propiedades fisiológicas de <i>C. aestuarii</i> 357.	31
Tabla 4. <i>C. aestuarii</i> 357 en bases de datos de información genómica.	33
Tabla 5. Características genómicas globales de <i>C. aestuarii</i> 357.	34
Tabla 6. Adscripción filogenética de las CDSs de <i>C. aestuarii</i> 357 atendiendo a la mejor homología con las CDSs de la base de datos RefSeq del NCBI.	39
Tabla 7. Adscripción filogenética de las CDSs de <i>C. aestuarii</i> 357 que presentaron la mejor homología con CDSs de la familia <i>Rhodobacteraceae</i> de la base de datos RefSeq del NCBI.	41
Tabla 8. Comparativa de las CDSs que codifican para una hidrogenasa NiFe-dependiente de <i>C. aestuarii</i> 357 con las de <i>S. stellata</i> E-37.	45
Tabla 9. Comparativa de las CDSs que codifican para la CO deshidrogenasa de <i>C. aestuarii</i> 357 con las de <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.	47
Tabla 10. Comparativa de las CDSs codificadas por los genes <i>sox</i> de <i>C. aestuarii</i> 357 con las de <i>R. pomeroyi</i> DSS-3.	48
Tabla 11. Comparativa de las CDSs que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo y transporte de fosfatos y fosfonatos de <i>C. aestuarii</i> 357 con las de <i>P. bermudensis</i> HTCC 2601.	52
Tabla 12. Comparativa de las CDSs que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis de vitaminas (cobalamina y tiamina) de <i>Citricella aestuarii</i> 357 con las de <i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC 2601.	54
Tabla 13. Comparativa de las CDSs que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis péptidos no ribosomales de <i>C. aestuarii</i> 357 con las de <i>P. bermudensis</i> HTCC 2601.	57
Tabla 14. Evaluación del crecimiento a expensas de diferentes fuentes de carbono y energía (0,2% p/v) para <i>C. aestuarii</i> 357 y predicción de la utilización de dichos compuestos a partir del análisis genómico realizado.	63
Tabla 15. Análisis de semejanza con BlastP entre las posibles enzimas de la vía degradativa del homogentisato de <i>C. aestuarii</i> 357 y las presentes en las cepas de referencia.	65
Tabla 16. Análisis de semejanza con BlastP entre las posibles enzimas de la vía degradativa del gentisato de <i>C. aestuarii</i> 357 y las presentes en las cepas de referencia.	66

Tabla 17. Comparativa de las CDSs que codifican para degradación de dibenzotiofeno de <i>C. aestuarii</i> 357 con las de <i>X. polyaromaticivorans</i> 127W.	68
Tabla 18. Comparativa de las CDSs que codifican para la degradación de naftaleno via gentisato de <i>C. aestuarii</i> 357 con las de <i>Ralstonia sp.</i> U2.	71
Tabla 19. Crecimiento de <i>C. aestuarii</i> 357 con diferentes sustratos como fuente única de carbono y energía.	78
Tabla 20. Crecimiento de <i>C. aestuarii</i> 357 con salicilato y gentisato a diferentes concentraciones como fuentes únicas de carbono y energía.	80
Tabla 21. Crecimiento de <i>C. aestuarii</i> 357 en diferentes condiciones de cultivo en presencia de dibenzotiofeno.	82

RESUMEN

La cepa 357 fué aislada en el año 2002 de una muestra de arena (Praia da Seda, Galicia, España) contaminada con petróleo del Prestige. Esta cepa, presuntamente afiliada al grupo *Roseobacter*, fue capaz de crecer utilizando naftaleno como única fuente de carbono y energía. Ante la falta de información genética y bioquímica sobre degradación de naftaleno en el grupo *Roseobacter*, decidimos abordar el trabajo presentado en esta tesis. Así, se ha confirmado taxonómicamente la afiliación de la cepa 357 a la especie *Citricella aestuarii*. A continuación, utilizando técnicas genómicas, fisiológicas y analíticas, se ha caracterizado el potencial metabólico de la cepa 357 en el contexto del grupo *Roseobacter*. Además, se ha definido fisiológica, genética y bioquímicamente la vía catabólica del naftaleno. Así, *C. aestuarii* 357 es capaz de metabolizar el naftaleno vía salicilato y gentisato. Adicionalmente, hemos demostrado la capacidad de la cepa 357 de crecer con dibenzotiofeno como fuente única de carbono, energía y azufre.

Palabras clave

Citricella aestuarii, *Roseobacter*, *Bacteria*, microorganismo, degradación de hidrocarburos, PAHs, naftaleno, salicilato, gentisato, dibenzotiofeno, vía Kodama, desulfurización, genómica, genes degradativos, HPLC, catabolismo.

ABSTRACT

Strain 357 was isolated in 2002 from an oil-polluted sand sample from Praia da Seda (Galicia, Spain). This strain, a plausible member of the *Roseobacter* clade, was able to grow using naphthalene as sole carbon and energy source. Due to the lack of genetic and biochemical information about naphthalene degradation in *Roseobacter*, the work presented in this PhD Thesis was started. Thus, it has been taxonomically demonstrated that strain 357 is a member of the *Citricella aestuarii* species. Using physiology, genomic and analytical techniques the metabolic potential of strain 357 in the context of the *Roseobacter* clade has been characterized. Furthermore, it has been demonstrated that *C. aestuarii* 357 is able to metabolize naphthalene via salicylate and gentisate. Finally, it has been proven that strain 357 is able to use dibenzothiophene as unique carbon, energy and sulfur source.

Keywords.

Citricella aestuarii, *Roseobacter*, *Bacteria*, microorganism, hydrocarbon degradation, PAHs, naphthalene, salicylate, gentisate, dibenzothiophene, Kodama pathway, desulfurization, genomics, degradation genes, HPLC, catabolism

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del grupo *Roseobacter*.

El grupo *Roseobacter* es un grupo filogenéticamente coherente que pertenece a la familia *Rhodobacteraceae* de la clase *Alphaproteobacteria*. El grupo *Roseobacter* puede considerarse ubicuo en el ecosistema marino. Así, su presencia se ha detectado por métodos moleculares en prácticamente todos los ambientes marinos estudiados (columna de agua, sedimentos, hielo marino, biofilms, nieve marina, etc.), representando más del 20% de la comunidad de bacterioplancton en zonas costeras y hasta un 15% en zonas oceánicas (Buchan *et al.* 2005; Wagner-Döbler y Biebl, 2006).

Este grupo es muy heterogéneo y versátil desde el punto de vista metabólico. Así, la mayor parte de sus miembros son bacterias heterótrofas, aunque también tienen capacidad para obtener energía por lithoheterotrofia, e incluso hay bacterias del grupo capaces de realizar fototrofia anoxigénica aeróbica (Buchan *et al.*, 2005; Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Moran y Miller, 2007; Newton *et al.*, 2010). Además, los miembros del grupo *Roseobacter* tienen un estilo de vida generalista (Moran *et al.*, 2004; 2007; Newton *et al.*, 2010) que, junto a su versatilidad metabólica, les permite utilizar recursos variados y responder a incrementos en la concentración de nutrientes. Estas características explican su abundancia en las zonas costeras (Buchan *et al.* 2005).

A diferencia de otras alfafroteobacterias marinas (p.e. SAR11), los miembros del grupo *Roseobacter* son fácilmente cultivables, lo que los convierte en modelos excelentes para el estudio de la ecología y fisiología de bacterias marinas generalistas. Gracias a esto se dispone de mucha información procedente de la secuenciación de genomas que ayuda a entender el metabolismo de las bacterias de este grupo y su relevancia para el funcionamiento del ecosistema marino. Así, el trabajo más completo de análisis genómico del grupo *Roseobacter* realizado hasta la fecha abarca un total de 32 genomas (Newton *et al.*, 2010). En este trabajo, un análisis filogenético basado en el concatenado de 70 genes conservados en copia única permitió agrupar a los miembros del grupo *Roseobacter* en cinco clados filogenéticamente robustos (Figura 1). Adicionalmente, Newton y colaboradores (2010) describieron, desde el punto de vista genómico, la gran versatilidad de mecanismos para la obtención de energía y carbono que tienen los miembros

de este grupo, así como otras capacidades fisiológicas de alto interés ecológico (Figura 1). Es interesante mencionar que el esfuerzo de secuenciación ha continuado y, a fecha de enero de 2013, la comunidad científica dispone de un total de 40 genomas secuenciados depositados en bases de datos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

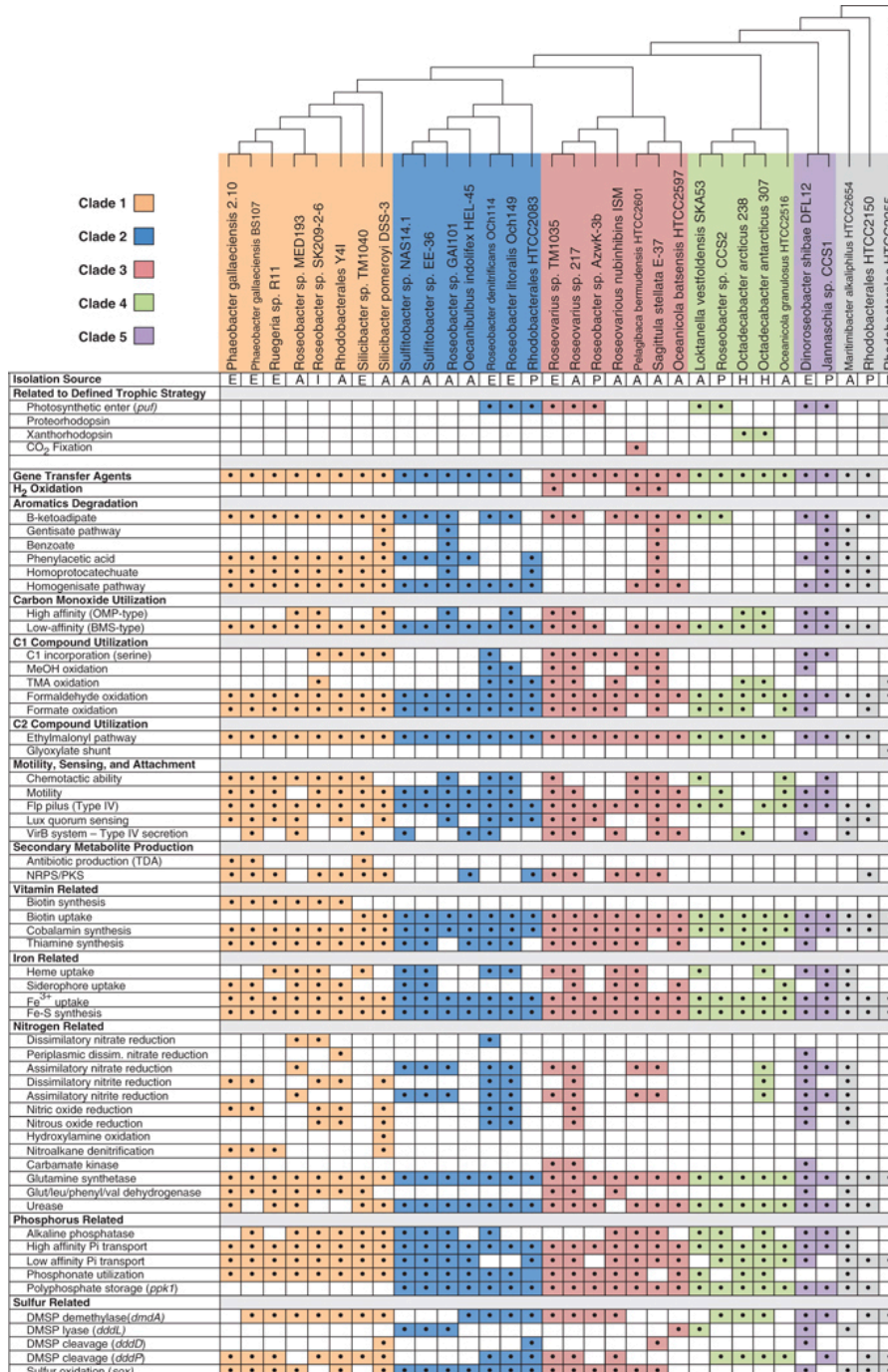


Figura 1. Análisis filogenómico realizado por Newton y colaboradores (2010). Origen aislamientos: A, Océano Atlántico; E, asociación con eucariotas; H, océanos polares; I, Océano Índico; P, Océano Pacífico.

A continuación se describen con más detalle algunas características fisiológicas relevantes del grupo *Roseobacter*.

Algunos miembros del grupo *Roseobacter* presentan bacterioclorofila a, lo que les permite obtener energía por fototrofia anoxigénica aeróbica (AAnP) (Buchan *et al.*, 2005; Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Brinkhoff *et al.*, 2008). Este proceso no parece estar ligado directamente a la fijación de CO₂ ya que, con excepción de *Pelagibaca bermudensis*, no se ha detectado la presencia de genes para el ciclo del Calvin, ni de su enzima clave, la RuBisCO, en los genomas de miembros del grupo *Roseobacter* estudiados hasta el momento (Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Newton *et al.*, 2010). Otra característica metabólica presente en la mayor parte de los miembros del grupo *Roseobacter* es la capacidad de oxidación de monóxido de carbono (Newton *et al.*, 2010). Ambos procesos (quimiolitotrofia –oxidación de CO– y fotoheterotrofia –AAnP–) son dos mecanismos que han sido identificados como importantes en la adaptación al ecosistema marino, considerado en general como oligotrófico (Wagner-Döbler y Biebl, 2006).

Otra característica interesante presente en la mayor parte de los miembros del grupo *Roseobacter* es su capacidad para utilizar dimetil sulfoniopropionato (DMSP) (Moran *et al.*, 2003; Newton *et al.*, 2010), compuesto osmoprotector producido en grandes cantidades por parte de micro y macroalgas, y plantas halófitas, y que probablemente constituye la mayor fuente de azufre y carbono para las bacterias marinas.

Algunos miembros del grupo *Roseobacter* establecen relaciones simbióticas con organismos marinos eucariotas. Así, *Dinoroseobacter shibae* DFL 12 se aisló del dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Biebl *et al.*, 2005), con el que puede mantener una relación de simbiosis: la cepa DFL12 proporciona tiamina (vitamina B1) y cobalamina (vitamina B12) al dinoflagelado, y este último proporciona productos de la fotosíntesis a la bacteria (Wagner-Döbler *et al.*, 2010).

Otra característica interesante de las bacterias de este grupo es que pueden producir antibióticos o metabolitos secundarios bioactivos, que pueden estar involucrados en efectos patogénicos o probióticos (Wagner-Döbler y Biebl, 2006; Seyedsayamdost *et al.*, 2011).

Sin embargo, la capacidad metabólica del grupo *Roseobacter* más relevante para la presente tesis es su capacidad de degradación de hidrocarburos, tal como se comenta a continuación.

2. Degradación de hidrocarburos en el grupo *Roseobacter*.

Las evidencias que relacionan el grupo *Roseobacter* con la capacidad degradadora de hidrocarburos son varias. Las más claras están relacionadas con el aislamiento de miembros de este grupo degradadores de hidrocarburos. Así, Buchan y colaboradores (2000) aislaron seis cepas afiliadas al grupo *Roseobacter* procedentes de enriquecimientos en lignina que eran capaces de crecer en al menos dos de los hidrocarburos aromáticos analizados (antranilato, benzoato, salicilato, vanillato, ferulato, protocatecuato, coumarato y 4-hidroxibenzoato). Más adelante, Brito y colaboradores (2006) aislaron ocho cepas afiliadas al grupo *Roseobacter* capaces de crecer en cultivo puro a expensas de pireno, naftaleno o fluoranteno como fuentes únicas de carbono y energía. Mayor esfuerzo realizaron Hawarti y colaboradores (2007, 2009), demostrando la capacidad de 40 nuevos aislados afiliados al grupo *Roseobacter* para degradar diferentes hidrocarburos, tanto lineales como aromáticos. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se han descrito, genética o bioquímicamente, las rutas de degradación de hidrocarburos.

Por otra parte, en varios estudios de diversidad microbiana se ha detectado la presencia de miembros del grupo *Roseobacter* en ambientes contaminados con hidrocarburos, como son Puerto Adriano, en la isla de Mallorca (Nogales *et al.*, 2007); Puerto Victoria, en Hong Kong (Zhang *et al.*, 2007; 2009); y Puerto Xiamen, en Singapur (Ma *et al.*, 2009). También se ha visto que *Roseobacter* es uno de los grupos que prolifera ante la presencia de hidrocarburos en experimentos de contaminación controlada (Brakstad *et al.*, 2005; Coulon *et al.*, 2007; McKew *et al.*, 2007; Lanfranconi *et al.*, 2010).

Por lo que respecta a las posibles rutas de degradación de hidrocarburos en *Roseobacter*, la primera, y hasta el momento única, vía de degradación de hidrocarburos aromáticos descrita es la vía del beta-cetoadipato (Buchan *et al.*, 2000). En este trabajo se detectó la presencia del gen *pcaH* y de su producto génico activo, la protocatecuato 3,4-dioxigenasa, en cuatro de los seis aislados analizados. Los dos aislados restantes, a pesar de poseer el gen *pcaH*, no

presentaron actividad enzimática asociada al ser crecidas en 4-hidroxibenzoato. Adicionalmente, Buchan y colaboradores (2000) identificaron la vía completa de degradación del protocatecuato vía beta-cetoadipato en el genoma de dos de las cepas estudiadas: *Sagittula stellata* E-37 y la cepa Y3F (Figura 2).

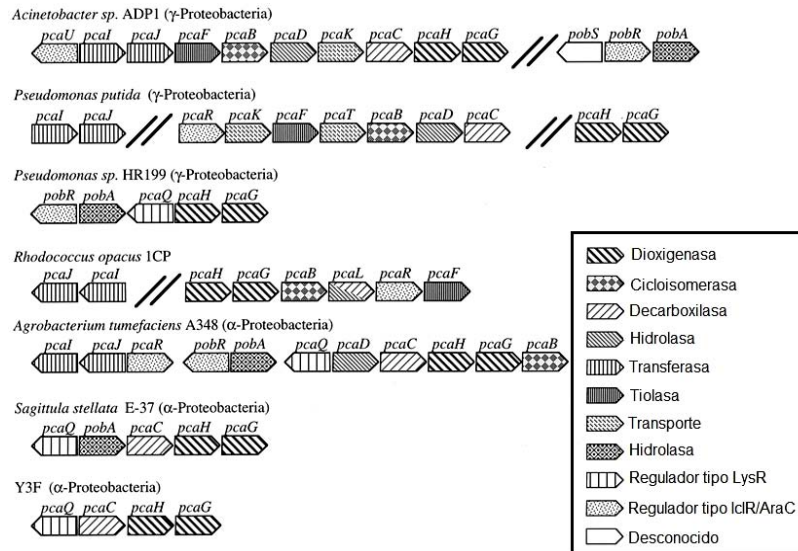


Figura 2. Organización de los genes del metabolismo del protocatecuato en diferentes bacterias, incluyendo los aislados E-37 y Y3F del grupo *Roseobacter*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Las líneas dobles en negrita indican genes separados por <10 kb. (Modificado de Buchan *et al.*, 2000).

Posteriormente, Moran y colaboradores (2007), al analizar en detalle el genoma de tres miembros del grupo *Roseobacter* (*Ruegeria* sp. TM1040, *Jannashia* sp. CCS1 y *Ruegeria pomeroyi* DSS-3) describieron la presencia, basándose en la comparación con secuencias homólogas de las bases de datos, de hasta seis rutas catabólicas para la degradación aeróbica de compuestos monoaromáticos (benzoato, fenilacetato, homoprotocatecuato, homogentisato, gentisato y protocatecuato) (Figura 3).

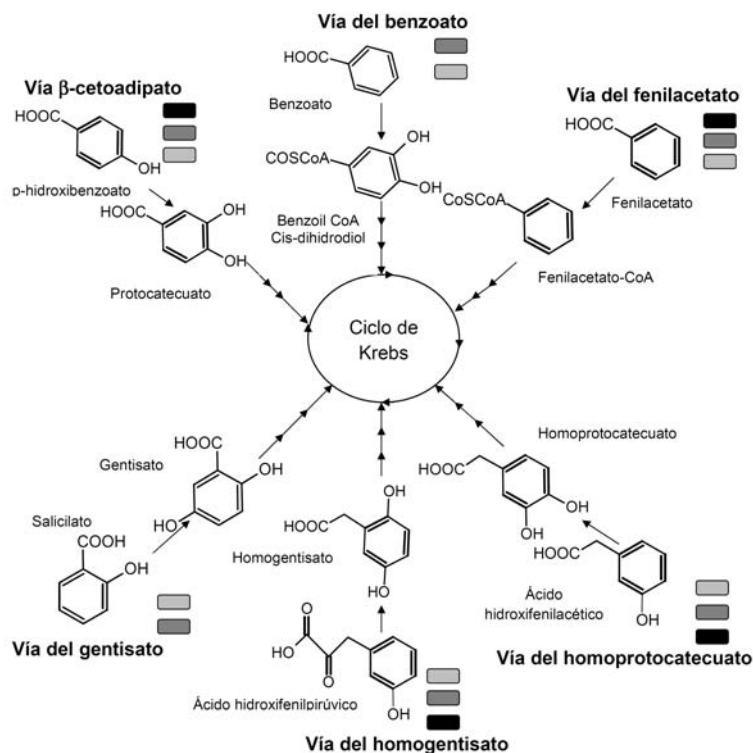


Figura 3. Representación esquemática de las seis rutas diferentes de metabolismo aeróbico de compuestos monoaromáticos presentes en tres genomas del grupo *Roseobacter*: *Ruegeria* sp. TM1040 (rectángulo negro), *Jannashia* sp. CCS1 (rectángulo gris oscuro) y *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (rectángulo gris claro) (Modificado de Moran *et al.*, 2007.).

Finalmente, Newton y colaboradores (2010) extendieron el análisis a un total de 32 genomas del grupo *Roseobacter*. La Tabla 1 resume las vías de degradación encontradas en genomas de *Roseobacter* secuenciados, en base a la detección de secuencias de genes clave de cada una de ellas. De los 32 genomas analizados, tan sólo 5 carecieron de potencial degradador de hidrocarburos monoaromáticos. Así, la rama del protocatecuato de la vía del beta-cetoadipato se detectó en la mayoría de los genomas del grupo *Roseobacter* (77%), al igual que la del homogentisato (71%). La ruta del homoprotocatecuato se detectó en el 45% de los genomas, la del ácido fenilacético en el 58%, y la del gentisato y benzoato en el 16%. Además, cuatro de las cepas analizadas (*Sagittula stellata* E-37, *Jannaschia* sp. CCS1, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 y *Roseobacter* sp. GAI101) presentaron todas las vías de degradación estudiadas.

Tabla 1. Vías de degradación de compuestos aromáticos identificadas por Newton y colaboradores (2010) en genomas secuenciados del grupo *Roseobacter*.

Cepas	Vías identificadas ^a					
	Pro	Gen	Ben	Hpr	Fen	Hge
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107	+	-	-	+	+	+
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 2.10	+	-	-	+	+	+
<i>Roseobacter</i> sp. MED193	+	-	-	+	+	+
<i>Roseobacter</i> sp. SK209-2-6	+	-	-	+	+	+
<i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3	+	+	+	+	+	+
<i>Silicibacter</i> sp. TM1040	+	-	-	+	+	+
<i>Ruegeria</i> sp. R11	+	-	-	+	+	+
Rhodobacterales Y41	+	-	-	+	+	+
<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	+	-	-	-	+	+
<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1	+	-	-	-	+	+
<i>Roseobacter</i> sp. GAI101	+	+	+	+	+	+
<i>Oceanibulbus indoliflex</i> HEL-45	-	-	-	-	+	+
<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114 b	+	-	-	-	-	+
<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149 ^b	+	-	-	-	-	+
Rhodobacterales HTCC 2083 ^b	-	-	-	+	+	+
<i>Roseovarius</i> sp. TM1035 ^b	+	-	-	-	-	-
<i>Roseovarius</i> sp. 217 ^b	+	-	-	-	-	-
<i>Roseobacter</i> sp. Azwk-3b ^b	-	-	-	-	-	-
<i>Roseovarius nubinihibens</i> ISM	+	-	-	-	-	-
<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC 2601	+	-	-	-	-	+
<i>Sagittula stellata</i> E-37	+	+	+	+	+	+
<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC 2597	+	-	-	-	-	+
<i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53 ^b	+	-	-	-	-	-
<i>Roseobacter</i> sp. CCS2 ^b	+	-	-	-	-	-
<i>Octadecabacter articus</i> 238	-	-	-	-	-	-
<i>Octadecabacter antarcticus</i> 307	-	-	-	-	-	-
<i>Oceanicola granulosus</i> HTCC 2516	-	-	-	-	-	-
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12 ^b	+	-	-	-	+	+
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1 ^b	+	+	+	+	+	+
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC 2654	-	+	+	+	+	+
Rhodobacterales bacterium HTCC 2150	+	-	-	+	+	+
Rhodobacterales bacterium HTCC 2255	-	-	-	-	-	-

^a Abreviaciones de los compuestos: Pro: Protocatecuato; Gen: gentisato; Ben: Benzoato; Hpr: homoprotocatecuato; Fen: fenilacetato; Hge: Homogentisato.

^b Presentan genes para AANP.

A pesar de este gran potencial catabólico, no se ha encontrado en los 32 genomas estudiados ninguna dioxigenasa, de las ampliamente caracterizadas hasta el momento, involucradas en la metabolización de hidrocarburos poliaromáticos (p.e. naftaleno, fenantreno, bifenilo, dibenzotiofeno, etc.), aunque sí se han encontrado regiones codificantes (CDSs) cuyos productos génicos presentan dominios característicos de dichas dioxigenasas. Esto indicaría que las bacterias de este grupo podrían utilizar vías nuevas o poco estudiadas para la degradación de compuestos poliaromáticos (Buchan y González, 2010). En este sentido, y a pesar de que se dispone de algunos aislados descritos capaces de degradar hidrocarburos poliaromáticos (Brito et

al., 2006; Hawarti *et al.*, 2007; 2009), no se dispone de información sobre la secuencia de sus genomas. Por tanto, es necesario realizar un esfuerzo experimental mayor para clarificar que rutas de degradación de hidrocarburos poliaromáticos presenta el grupo *Roseobacter* y, con ello, comprender mejor el papel de este grupo en ambientes contaminados por hidrocarburos.

3. Degradación de hidrocarburos poliaromáticos (PAHs): el naftaleno como modelo.

A pesar de la carencia de datos genéticos y bioquímicos en la degradación de PAHs por miembros del grupo *Roseobacter*, la degradación de estos compuestos ha sido profusamente estudiada en otros grupos de microorganismos. Así, y de forma general, se ha descrito la presencia de una serie de vías periféricas de degradación, en las que están involucradas reacciones de oxigenación llevadas a cabo por monooxigenasas y/o dioxigenasas hidroxilantes, que generarían compuestos monoaromáticos dihidroxilados (catecol, protocatecuato, gentisato, homoprotocatecuato, homogentisato, etc.) a partir de los hidrocarburos poliaromáticos. Estos compuestos intermedios serían finalmente atacados por las enzimas de las vías mencionadas en el apartado anterior y, por tanto, serían canalizados al metabolismo central (Peng *et al.*, 2008).

Tal vez, uno de los modelos más estudiados de degradación de PAHs es el naftaleno. En este sentido, son muchas las cepas bacterianas degradadoras de naftaleno cuyas vías metabólicas han sido caracterizadas, tanto genética como bioquímicamente. Ejemplo de ellas son *Pseudomonas stutzeri* AN10 (Bosch *et al.*, 1999a; 1999b; 2000; Lanfranconi *et al.*, 2009; Brunet-Galmés *et al.*, 2012), *Pseudomonas putida* ND6 (Jiang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004; 2011; 2012; 2013) y *Ralstonia* sp. U2 (Fuenmayor *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001; 2002; Jones *et al.*, 2003; Tøndervik *et al.*, 2012). Todas ellas presentan una vía periférica de degradación (*P. stutzeri* AN10, *nahABFCED*; *P. putida* ND6, *nahABFCQED*; y *Ralstonia* sp. U2, *nagABFCQED*) que codifica, tal como se puede observar en la Figura 4, para las enzimas involucradas en la transformación del naftaleno a salicilato (Bosch *et al.*, 1999a; Fuenmayor *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004; 2013).

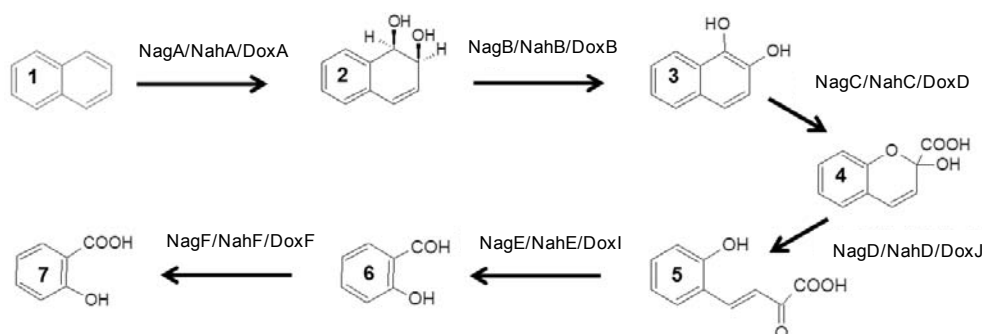


Figura 4. Vía de degradación de n aftaleno a s alicilato de *P. stutzeri* AN10 y *Pseudomonas* sp. ND6 (genes *nah*), *Ralstonia* sp. U2 (genes *nag*) y *Pseudomonas* sp. C18 (genes *dox*). Enzimas: NagA/NahA/DoxA, naftaleno 1,2-dioxigenasa; NagB/NahB/DoxB, cis-naftaleno dihidrodiol deshidrogenasa; NagC/NahC/DoxD, 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa; NagD/NahD/DoxJ, 2-hidroxicromeno-2-carboxilato deshidrogenasa; NagE/NahE/DoxI, trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato hidratasa-aldolasa; NagF/NahF/DoxF, salicilaldehído deshidrogenasa. Compuestos: 1, naftaleno; 2, cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno; 3, 1,2-dihidroxi-naftaleno; 4, 2-hidroxicromeno-2-carboxilato; 5, trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato; 6, salicilaldehído; 7, salicilato.

Así, el naftaleno es dioxigenado por una naftaleno 1,2-dioxigenasa (NahA) y el producto generado, el cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno, es estabilizado a 1,2-dihidroxi-naftaleno por la acción de una deshidrogenasa (NahB). A continuación, una meta-pirocatecasa, la 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa (NahC), inicia el ataque del anillo dioxigenado para rendir 2-hidroxicromeno-2-carboxilato, que es definitivamente linealizado por otra deshidrogenasa (NahD), generándose trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato. Finalmente, y por la acción consecutiva de una hidratasa/aldolasa (NahE) y de una deshidrogenasa (NahF), este último compuesto pasa primero a salicilaldehído y luego a salicilato.

Hasta este punto, la estrategia seguida por los tres modelos mencionados es exactamente la misma. Sin embargo, la canalización del salicilato hacia el ciclo de Krebs sigue estrategias totalmente diferentes en los tres modelos (Figura 5). Así, *P. stutzeri* AN10 y *P. putida* ND6 decarboxilan y monooxigenan el salicilato mediante dos salicilato 1,2-hidroxilasas distintas, NahG y NahW, generando catecol (Bosch *et al.*, 1999b; 2000; Lanfranconi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2004; 2013; Zhao *et al.*, 2005). El catecol, en *P. stutzeri* AN10, es atacado por otra meta-pirocatecasa distinta a NahC, la catecol 2,3-dioxigenasa (NahH), que linealiza el catecol extradiólicamente generando hidroximucónico semialdehído

(Bosch *et al.*, 2000). En cambio, *P. putida* ND6, además de disponer una catecol 2,3-dioxigenasa funcional (Jiang *et al.*, 2004), presenta una orto-pirocatecasa, la catecol 1,2-dioxigenasa (CatA) (Li *et al.*, 2004; 2013), que es capaz de linealizar el catecol intradiólicamente generando cis-cis-hidroxiacetonato. Ambos productos resultantes de la acción de las pirocatecasas son finalmente canalizados hacia el ciclo de Krebs por sistemas enzimáticos distintos (productos génicos de *nahINLOMKJ* para el hidroxiacetonato semialdehído y *catABC* para el cis-cis-hidroxiacetonato).

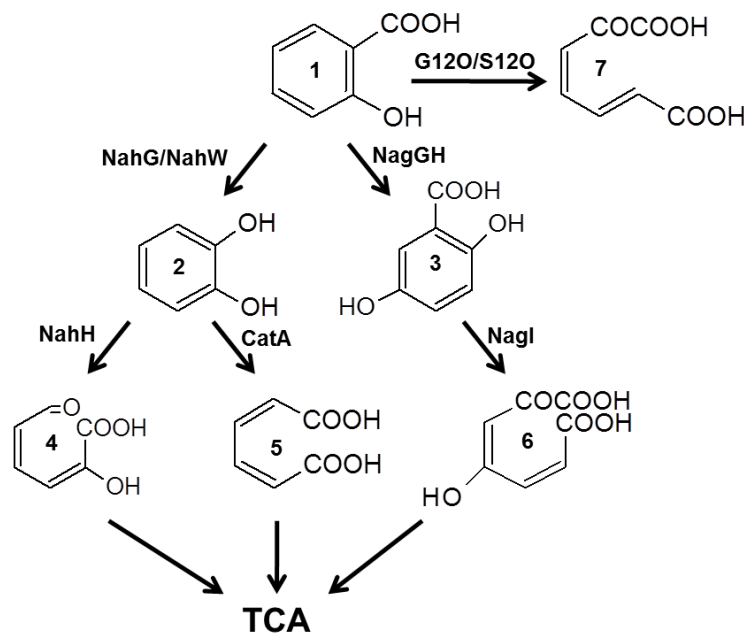


Figura 5. Posibles estrategias de ataque del salicilato por *P. stutzeri* AN10, *P. putida* ND6, *Ralstonia* sp. U2 y *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12. Enzimas: NahG y NahW, salicilato 1,2-hidroxilasa, AN10 y ND6; NahH, catecol 2,3-dioxigenasa, AN10 y ND6; CatA, catecol 1,2-dioxigenasa, ND6; NahGH, salicilato 1,5-hidroxilasa, U2; NagI, gentisato 1,2-dioxigenasa, U2; G12O/S12O, gentisato 1,2-dioxigenasa actuando como salicilato 1,2-dioxigenasa, BN12. Compuestos: 1, salicilato; 2, catecol; 3, gentisato; 4, hidroxiacetonato semialdehído; 5, cis-cis-hidroxiacetonato; 6, 3-maleilpiruvato; 7, 2-oxohepta-3,5-dienedioato.

En el caso de *Ralstonia* sp. U2, la rotura del salicilato la inicia una salicilato 1,5-hidroxilasa (NahGH), que hidroxila el salicilato en posición 5 generando gentisato (Zhou *et al.*, 2002). Este último es linealizado por una gentisato 1,2-dioxigenasa (NagI) rindiendo 3-maleilpiruvato, que es canalizado al ciclo de Krebs por sistemas enzimáticos distintos (productos génicos de *nagKL*) a los

de la canalización del hidroximucónico semialdehído y el cis-cis-hidroximuconato (Zhou *et al.*, 2001).

Es interesante mencionar que todos los determinantes génicos que codifican para la canalización del salicilato a intermediarios del ciclo de Krebs en estos modelos de degradación de naftaleno están perfectamente organizados y regulados. Así, la maquinaria enzimática de metabolización de salicilato de las cepas AN10 y ND6 está codificada por tan sólo dos operones, *nahW* y *nahGTHINLOMKJ*, y ambos están regulados por una sola proteína activadora, NahR, un regulador transcripcional de la familia LysR que activa la transcripción de ambos operones catabólicos en respuesta a la presencia de salicilato (Bosch *et al.*, 1999b; Li *et al.*, 2004; 2013). En ambas cepas, la proteína NahR también se encarga de activar la transcripción del operón *nahAaAbAcAdBFCED*, que codifica para los enzimas degradadores de naftaleno a salicilato. Una estructura semejante presenta la cepa U2, en la que la expresión del único operón catabólico que contiene la vía completa de degradación de naftaleno a intermediarios del ciclo de Krebs, *nagAaGHAbAcAdBFCQEDJIKLMN*, está regulado por un único activador transcripcional de la familia LysR, la proteína NagR (Jones *et al.*, 2003).

Además, y en el contexto de la canalización de salicilato al metabolismo central, se ha descubierto en *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12 la posibilidad de rotura directa del anillo del salicilato en posición 1-2 (Figura 5) (Hintner *et al.*, 2001; 2004). En este caso, la propia gentisato 1,2-dioxigenasa de la cepa actúa sobre el salicilato a modo de una salicilato 1,2-dioxigenasa, rindiendo 2-oxohepta-3,5-dienedioato, que podría ser canalizado hacia el metabolismo central. Sin embargo, se desconocen en este caso los enzimas involucrados en este proceso.

Finalmente, es de destacar el hecho de que todas las enzimas, a pesar de estar descritos como herramientas de ataque a un sustrato (ej. genes *nah* y *nag* sobre naftaleno), pueden actuar sobre otros sustratos secundarios. Un ejemplo de ellos sería *Pseudomonas* sp. C18, una cepa que se aisló como degradadora de dibenzotiofeno (Krawiec, 1990) utilizando la vía metabólica de Kodama (Figura 6) (Kodama, 1973). Cuando se identificaron los genes degradadores de dibenzotiofeno de la cepa C18 (*doxABDEFGHIJ*) se observó que sus enzimas, involucrados en la transformación del dibenzotiofeno a 3-

hidroxi-2-formil-benzotiofeno (Figura 6), presentaban un elevado grado de homología con los enzimas Nah descritos anteriormente (Denome *et al.*, 1993). El análisis fenotípico de la cepa C18 reveló su capacidad de crecer eficientemente con naftaleno y permitió la elucidación de su vía metabólica. La equivalencia entre los enzimas Nah y los Dox relacionado con la degradación de naftaleno se puede observar en la Figura 4.

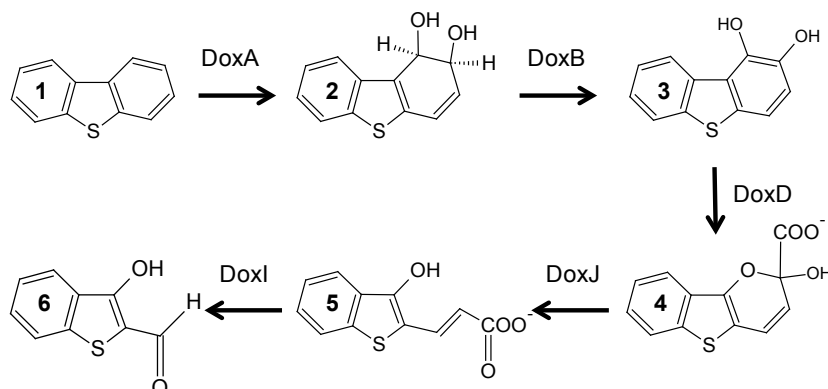


Figura 6. Vía Kodama de degradación de dibenzotiofeno en *Pseudomonas* sp. C18. Enzimas: DoxA, dibenzotiofeno/naftaleno 1,2-dioxigenasa; DoxB, cis-dibenzotiofeno/naftaleno dihidrodiol deshidrogenasa; DoxD, 1,2-dibenzotiofeno/dihidroxi-naftaleno dioxigenasa; DoxJ, 2-hidroxicromeno-2-carboxilato deshidrogenasa; DoxI, trans-o-hidroxi-benzilidenopiruvato hidratasa-aldolasa. Compuestos: 1, dibenzotiofeno; 2, cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidrodibenzotiofeno; 3, 1,2-dihidroxi-1,2-dihidrodibenzotiofeno; 4, cis-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato; 5, trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato; 6, 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (HFBT).

Recapitulando, a pesar de que se han identificado y caracterizado la presencia de vías metabólicas de hidrocarburos monoaromáticos en varios miembros del grupo *Roseobacter*, y que se han descrito algunos aislados capaces de crecer a expensas de hidrocarburos poliaromáticos, las vías periféricas de transformación de estos PAHs a hidrocarburos monoaromáticos no han sido caracterizadas, ni bioquímica ni genéticamente. En este sentido, en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares se han aislado sin presión xenobiótica varias cepas pertenecientes al grupo *Roseobacter*. Una de ellas, la cepa 357, aislada en el año 2002 por siembra directa en Agar Marino (Sigma-Aldrich) a partir de una muestra de arena contaminada con petróleo procedente del Prestige procedente de Praia da Seda (Galicia, España), fue capaz de crecer a expensas de naftaleno como

fuelle única de carbono y energía. Ante la falta de información genética y bioquímica sobre la degradación de naftaleno en el grupo *Roseobacter* decidimos abordar el trabajo presentado en esta tesis. Así, en el primer capítulo del apartado “Resultados y discusión”, se presenta la confirmación taxonómica de su afiliación al grupo *Roseobacter* para, a continuación y mediante análisis genómico, caracterizar el potencial metabólico de la cepa 357 en el contexto del grupo *Roseobacter* (capítulo 2 de “Resultados y discusión”) y definir genéticamente la vía catabólica del naftaleno (capítulo 3 de “Resultados y discusión”). Finalmente, se caracterizará fisiológicamente la capacidad degradadora de naftaleno y metabolitos relacionados de la cepa 357 y, mediante técnicas químicas analíticas, se confirmará la vía catabólica propuesta a partir de los datos genómicos (capítulo 3 de “Resultados y discusión”).

OBJETIVOS

Los objetivos que se plantearon para el desarrollo de esta tesis doctoral son:

1. Confirmar la adscripción taxonómica de la cepa 357 al grupo *Roseobacter* y definir el género y especie al que pertenece.
2. Caracterizar a nivel genómico el potencial metabólico de la cepa 357, especialmente el relacionado con la degradación de hidrocarburos aromáticos, y establecer similitudes y diferencias genómicas en el contexto del grupo *Roseobacter*.
3. Caracterizar fisiológica y bioquímicamente la capacidad degradadora de naftaleno y metabolitos relacionados de la cepa 357.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización taxonómica y fisiológica de *Citricella aestuarii* 357

1.1. Medios y condiciones de cultivo.

Citricella aestuarii 357 fue mantenida rutinariamente en Caldo Marino (Sigma-Aldrich) (CM) o Medio Mineral Marino (Lanfranconi *et al.*, 2010) suplementado con extracto de levadura (0,05% p/v) (MMMY). Salvo que se indique lo contrario, las diversas fuentes de carbono y energía evaluadas se usaron a una concentración de 0,2% (p/v). Excepciones a esta norma fueron los siguientes hidrocarburos aromáticos: antranilato, benzoato, bifenilo, dibenzotiofeno, fenantreno, fenol, 4-hidroxibenzoato, naftaleno y tolueno (todos ellos a 0,1%, p/v); y 2,3-dihidroxibenzoato, gentisato, 3-hidroxifenilacetato, 4-hidroxifenilacetato, homogentisato, homoprotocatecuato, protocatecuato y salicilato (todos ellos a 3 mM). Para la elaboración de medios sólidos se utilizó agar-agar (Scharlau) (1,5% p/v) previamente lavado. Los cultivos se mantuvieron rutinariamente a 30 °C. Los cultivos líquidos se realizaron en matraces “Erlenmeyer” al 20% de su capacidad máxima (Ej. Matraz de 100 ml con 20 ml de MMY) y se incubaron en agitación constante (180 rpm) en un agitador orbital Certomat (Braun).

La capacidad de utilizar dibenzotiofeno como fuente única de azufre se evaluó con MMY libre de azufre y sin suplementación con extracto de levadura (MMF). La composición química basal del medio MMF es la siguiente: FeCl₃ x 6H₂O (0,001 g/l), NaCl (19,45 g/l), MgCl₂ x 6H₂O (5,9 g/l), KCl (0,55 g/l), CaCl₂ (1,102 g/l), Na₂CO₃ (0,16 g/l), NH₄Cl (0,27 g/l) y Na₂HPO₄ (89 mg/l). El medio MMF se suplementó con 1 ml/l de una solución de elementos traza constituida por: ZnSO₄ x 7H₂O (100 mg/l), MnCl₂ x 4H₂O (30mg/l), H₃BO₃ (300 mg/l), CoCl₂ x 6H₂O (200 mg/l), CuCl₂ x 2H₂O (10mg/l), NiCl₂ x 6H₂O (20 mg/l) y Na₂MoO₄ x 2H₂O (30 mg/l).

1.2. Caracterización fenotípica.

La caracterización bioquímica de la cepa 357 se realizó con el sistema API 20NE (bioMérieux), tal como se ha realizado para las descripciones de las especies del género *Citricella* (Sorokin *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011). Los resultados dudosos se corroboraron y complementaron con crecimiento en placas de MMY suplementadas con diferentes fuentes de carbono y energía.

Los rangos óptimos de crecimiento de *C. aestuarii* 357 para temperatura, pH y salinidad se evaluaron por siembra en agotamiento sobre placas de CM. Los rangos evaluados fueron los siguientes: temperatura: 5, 15, 20, 25, 30, 37 y 42 °C; pH: 4, 5, 6, 9, 10, 11 y 12; y salinidad: 2,8 a 14.3% de NaCl (p/v), en intervalos de 0,5%.

1.3. Hibridación ADN–ADN.

El ADN genómico de *Citricella aestuarii* 357 y el de las cepas utilizadas como referencia (*C. thiooxidans* DMS10146^T, *C. marina* LMG25230^T y *C. aestuarii* DMS22011^T) se aisló siguiendo el método de Marmur (1961). Las hibridaciones ADN–ADN se desarrollaron por duplicado usando el método no radioactivo descrito por Ziemke y colaboradores (1998). Las cadenas sencillas de ADN de referencia (*C. aestuarii* 357 y *C. aestuarii* DMS 22011^T) fueron marcadas con DIG-11-dUTP y biotina-16-dUTP usando el kit *Nick Translation* (Roche).

1.4. Microscopia electrónica.

El tamaño y morfología celular de *C. aestuarii* 357, así como la presencia de flagelación se determinó por MET (microscopía electrónica de transmisión) en un microscopio Hitachi modelo H600 a 75 kV. Para la preparación de las muestras por tinción negativa (Lalucat, 1988) se depositó una gota del cultivo en medio CM en fase exponencial sobre una rejilla de cobre cubierta con una película de Formvar, y tras secarse, se cubrió con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo, ambos al 1% (p/v).

1.5. Análisis filogenético del ADNr 16S.

A partir de ADN genómico de *C. aestuarii* 357 se amplificó por PCR el gen ADNr 16S utilizando los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). El producto de PCR se purificó con el kit *Montage Purification* (Millipore) y se secuenció a partir de los mismos cebadores usados en la amplificación con el kit *BigDye terminator cycle sequencing kit v. 3.1* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La resolución electroforética se realizó en el analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems) de los Servicios Científico-Técnicos de la UIB. La secuencia obtenida se comparó con la base de datos

del National Center of Biological Information (NCBI) utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Tras este análisis se seleccionaron las secuencias de cepas tipo, principalmente de origen marino, de especies pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae*, en las que se incluyeron las cepas tipo de las tres especies del género *Citricella* descritas hasta el momento. Los nombres de las cepas así como los números de acceso de sus secuencias aparecen en el árbol filogenético resultante mostrado en la sección “Resultados y discusión” (Figura 8). Estas secuencias se alinearon usando el programa SINA (Pruesse *et al.*, 2012) implementado en la base de datos de secuencias de ARNr SILVA (Pruesse *et al.*, 2007). Para limitar el posterior análisis filogenético a aquellas posiciones conservadas en al menos el 50% de las secuencias se eliminaron las posiciones no conservadas utilizando el programa GBLOCKS (Castresana, 2000). El análisis filogenético se realizó con el programa DNADIST del paquete bioinformático PHYLIP (Felsenstein, 1989). La matriz de distancia fue calculada acorde al modelo evolutivo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) y el árbol filogenético fue reconstruido usando el método de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). La robustez del análisis se realizó por *Bootstrap* a partir de 100 réplicas generadas por el programa SEQBOOT del paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1989).

2. Análisis genómico

2.1. Secuenciación, ensamblaje, anotación y análisis genómico funcional.

El ADN genómico de *C. aestuarii* 357 se extrajo utilizando el kit comercial *Wizard genomic DNA purification kit* (Promega). La pirosecuenciación la realizó la empresa GATC-Biotech (Konstanz, Alemania) (<http://www.gatc-biotech.com/en/home/>) con la plataforma Titanium GS FLX 454, siguiendo las especificaciones del fabricante (454 Life Science Roche). El ensamblaje de las secuencias se realizó con el programa Newbler v. 2.3 con las condiciones definidas de serie, aunque modificando la longitud del solapamiento entre secuencias a 100 pb y el porcentaje de identidad entre ellas al 98%. La anotación del genoma se realizó con el sistema automático de anotación de genomas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>), y el análisis funcional se refinó mediante búsqueda de proteínas homólogas utilizando BLAST contra la base de datos de proteínas no redundantes del

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), la base de datos de secuencias de inserción IS-Finder (<https://www-is.biotoul.fr/>) (Siguier *et al.*, 2006), así como con genomas específicos. En este último caso, la búsqueda se realizó localmente utilizando el programa BIOEDIT vs. 7.2. (Hall, 1999). La búsqueda de parálogos se realizó con la aplicación web CD-HIT (http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/) (Huang *et al.*, 2010). La comparación con otros genomas secuenciados se realizó utilizando el sistema de anotación automática KAAS de la base de datos de genes y genomas de Kioto (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/kaas/>) (Moriya *et al.*, 2007) y el sistema automático de análisis IMG (Integrated Microbial Genomes) del DOE's Joint Genome Institute (<http://img.jgi.doe.gov/>) (Markowitz *et al.*, 2012). En todos los casos se utilizaron los parámetros por defecto.

2.2. Análisis filogenómico.

El genoma de la cepa 357 se comparó con los de los 39 genomas secuenciados del grupo *Roseobacter* listados en la Tabla suplementaria S1. El genoma de *Escherichia coli* K12 (Bioproject NCBI PRJNA57779) se utilizó como referencia externa. El análisis consistió en dos aproximaciones. La primera supuso el cálculo del índice de semejanza genómica ANIb y el porcentaje de ADN conservado entre ellos, parámetros recientemente propuestos como sustitutos de la hibridación ADN-ADN en la comparación filogenómica de especies bacterianas (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Goris *et al.*, 2007). Para realizar estos cálculos se utilizó el programa JSPECIES (Richter y Rosselló-Mora, 2009) con los parámetros definidos de serie. La segunda aproximación consistió en realizar un análisis filogenómico de un concatenado de las 70 proteínas ortólogas presentes en copia única en todos los genomas de *Roseobacter* (Newton *et al.*, 2010). La búsqueda de las proteínas se realizó mediante BLAST utilizando como referencia las descritas por Newton y colaboradores (2010). Las proteínas se alinearon individualmente con CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) utilizando los parámetros por defecto del programa. Los alineamientos se juntaron para formar un solo concatenado. Para limitar el posterior análisis filogenético del concatenado a aquellas posiciones conservadas en al menos el 50% de las secuencias se eliminaron las posiciones no conservadas utilizando el programa GBLOCKS (Castresana,

2000). El análisis filogenético se realizó con el programa PROTDIST del paquete bioinformático Phylip (Felsenstein, 1989). La matriz de distancia fue calculada acorde al modelo evolutivo Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992) y el árbol filogenético fue reconstruido usando el método de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). La robustez del análisis se realizó por *Bootstrap* a partir de 100 réplicas generadas por el programa SEQBOOT del paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1989). Idéntico análisis se realizó utilizando Parsimonia y Máxima Verosimilitud, mediante los programas PROTPARS del paquete informático Phylip (Felsenstein, 1989) y PHYML (Guindon *et al.*, 2009), respectivamente.

3. Identificación de metabolitos intermediarios de degradación.

3.1. Obtención de muestras.

La identificación de metabolitos intermediarios de degradación de hidrocarburos aromáticos se hizo en base a dos estrategias: i) crecimiento de la cepa 357 en hidrocarburos aromáticos como fuente única de carbono y energía, y ii) inducción de biomasa celular por hidrocarburos aromáticos. Para la primera estrategia se realizaron curvas de crecimiento con los hidrocarburos aromáticos seleccionados tal como se ha mencionado anteriormente, inoculando los medios de cultivo con una dilución 1/100 de un cultivo de la cepa 357 crecida en MMMY suplementado con succinato (0,5% p/v) en fase exponencial tardía ($A_{600} \approx 0,7-0,8$). Desde el momento del inóculo y hasta la entrada del cultivo en fase estacionaria se fueron recogiendo periódicamente muestras de cultivo en paralelo a la determinación de la densidad celular por espectrofotometría. Los cultivos se centrifugaron (5 min, 13000 xg) para descartar las células y, finalmente, los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22 μM de tamaño de poro (Nalgene) y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis. Para los experimentos de incubación, se creció la cepa 357 en MMMY suplementado con gentisato (3 mM) o succinato (0,5% p/v) hasta fase exponencial tardía ($A_{600} \approx 0,7-0,8$). Las células se cosecharon por centrifugación (20 min, 10000 xg), se lavaron dos veces con MMMY sin fuente de carbono y energía, y finalmente se resuspendieron en MMMY libre de fuente de carbono y energía ajustando la densidad celular a $A_{600} \approx 0,6$. A partir de este momento se introdujo en el medio

el hidrocarburo aromático a evaluar (t_0) a las mismas concentraciones mencionadas para el crecimiento, y se recogieron muestras de cultivo de forma periódica. Las muestras del cultivo se trataron tal como se ha mencionado anteriormente.

3.2. Análisis químico.

La resolución y posterior identificación de los metabolitos de degradación de los diferentes hidrocarburos aromáticos se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en los Servicios Científico-Técnicos de la UIB, utilizando un equipo HPLC Waters 600E acoplado a un inyector Waters 717 y equipado con un detector UV Waters 2996. En todos los casos se inyectó 10 μ l de muestra, se utilizó un flujo de eluyente de 1 ml/min, y se resolvió en una columna Ultrasphere C8 (5 μ m; 125 x 4,6 mm) (Beckman) atemperada a 25 °C. Las condiciones de elución de los metabolitos variaron atendiendo a las características físico-químicas de los hidrocarburos aromáticos analizados y sus posibles metabolitos de degradación. Así, para los experimentos con naftaleno, salicilato y gentisato se utilizó un gradiente lineal de la fase móvil metanol:agua:H₃PO₄ (22,5:77,4:0,1 a 45:55:0,1 en 10 min), seguido de 5 min de elución a 45:55:0,1; y para los experimentos con dibenzotiofeno se utilizó rutinariamente la fase móvil metanol:agua:H₃PO₄ (22,5:77,4:0,1) durante 20 min por muestra, aunque para la identificación del 2-hidroxibifenilo se utilizó como fase móvil acetonitrilo:agua (60:40).

El análisis cromatográfico se realizó utilizando el programa EMPOWER (Waters) en un rango entre 215 y 600 nm. La identificación de los distintos metabolitos se realizó, cuando se disponía de un estándar del mismo (catecol, gentisato, 2-hidroxibifenilo, salicilaldehído y salicilato), en base al tiempo de retención cromatográfico (t_R) y a su espectro de absorción. En caso de no disponer de un estándar comercial (2-hidroxicromeno-2-carboxilato, 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno, 3-maleilpiruvato, 3-mercaptofenilgloxilato, trans-3-hidroxibenzilideno piruvato y trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenato), la identificación se realizó por comparación con el espectro de absorción del compuesto descrito en la bibliografía (Bressler y Fedorak, 2001a; 2001b; Eaton y Chapman, 1992; Eaton y Nitterauer, 1994; Zhou *et al.*, 2001). La cuantificación de los metabolitos detectados se realizó en base a la

resolución cromatográfica de diferentes concentraciones de los estándares disponibles y, en ausencia de los mismos, atendiendo a los coeficientes de extinción molar de los compuestos descritos en la literatura: 2-hidroxicromeno-2-carboxilato, $\epsilon_{340} = 280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Eaton y Chapman, 1992); 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno, $\epsilon_{390} = 12400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bressler y Fedorak, 2001a); 3-maleilpiruvato, $\epsilon_{334} = 10800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Crawford *et al.*, 1975); trans-*o*-hidroxibenzilideno piruvato, $\epsilon_{296} = 12080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Eaton y Chapman, 1992); y trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenato, $\epsilon_{472} = 31300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Adebusuyi *et al.*, 2012).

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces. En todos ellos se detectaron los mismos compuestos, aunque las concentraciones de los mismos fueron variables. En la presente tesis sólo se muestra el que se ha considerado como más representativo de cada uno de ellos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION TAXONOMICA DE *Citricella aestuarii* 357

1.1. Análisis filogenético de *Citricella aestuarii* 357

La cepa 357 fue obtenida en el año 2002 por plaqueo directo en Agar Marino (Cultimed) a partir de una muestra de arena contaminada con petróleo procedente del Prestige procedente de Praia da Seda (Galicia, España). Esta cepa fue seleccionada de entre otras representantes del grupo *Roseobacter* de la colección de la UIB por su capacidad para crecer en placas de MMY suplementadas con naftaleno o con salicilato como fuentes únicas de carbono y energía (Figura 7).

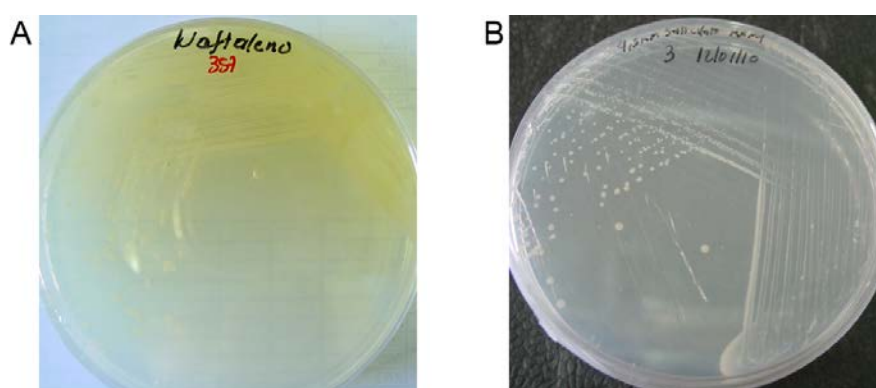


Figura 7. Crecimiento de *Citricella aestuarii* 357 en placas de MMY suplementadas con hidrocarburos aromáticos como fuentes únicas de carbono y energía. A. Naftaleno suplementado en forma de vapor. B. Salicilato 4.5 mM.

A partir del ADN genómico de la cepa 357 se amplificó por PCR el gen ADNr 16S empleando los cebadores universales 27f y el 1492r (Lane, 1991). Tras la purificación del amplificado y su posterior secuenciación, un fragmento de 1.320 pb del gen ADNr 16S se comparó utilizando el programa BLASTN con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank. La máxima identidad (99.1 %) se obtuvo con el gen ADNr 16S del aislado de origen marino *Citricella aestuarii* AD8^T (Park *et al.*, 2011), lo que sugería su afiliación a dicha especie de la familia *Rhodobacteraceae*. Los valores de identidad con las cepas tipo de las otras dos especies del género *Citricella* (*C. thiooxidans* CHLG1^T, 95.8 %; *C. marina* CK-13-6^T, 96.97 %), ambas de origen marino (Sorokin *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2011), parecían confirmar la pertenencia de la cepa 357 a dicho género.

Para clarificar la afiliación filogenética de la cepa 357 se seleccionaron de las bases de datos GenBank, además de las tres cepas tipo del género *Citricella*, las secuencias del gen ADNr 16S de otras 33 cepas tipo, principalmente de origen marino, de especies pertenecientes a la familia *Rhodobacteraceae*. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó usando el programa de alineamiento SINA (Pruesse *et al.*, 2012) implementado en la base de datos de secuencias de ARNr SILVA (Pruesse *et al.*, 2007). El análisis filogenético que se muestra en la Figura 8 demuestra que la secuencia del gen ADNr 16S de la cepa 357 se afilia con las de las cepas tipo de las especies del género *Citricella*, formando una agrupación independiente del resto de cepas tipo incluidas en el análisis, confirmando así la pertenencia de la cepa 357 al género *Citricella*.

El análisis de robustez mostrado en la Figura 8 demuestra la solidez de la agrupación de la cepa 357 con la cepa tipo de la especie *C. aestuarii*, lo que sugiere su afiliación a dicha especie. Para clarificar dicha afiliación se realizó un experimento de hibridación ADN-ADN utilizando ADN genómicos de la cepa 357 y de cada una de las cepas tipo de las tres especies del género *Citricella*. Se marcaron los ADN genómicos de la cepa 357 y de la cepa tipo de la especie *C. aestuarii*. Tal como se muestra en la Tabla 2, la semejanza genómica entre la cepa 357 y la cepa tipo de la especie *C. aestuarii* fue superior al 70 %, independientemente de la cepa utilizada como sonda. Los valores de semejanza genómica de ambas cepas con las cepas tipo de las otras dos especies del género *Citricella* fueron siempre inferiores al 30 %. Atendiendo a estos resultados podemos concluir que, filogenética y genómicamente, la cepa 357 es un aislado perteneciente a la especie *C. aestuarii*.

Tabla 2. Resultado hibridación ADN-ADN.

Cepas ^a	<i>C. aestuarii</i> 357	<i>C. aestuarii</i> DMS 22011 ^T
<i>C. aestuarii</i> 357	100	76,6
<i>C. aestuarii</i> DMS 22011 ^T	78,2	100
<i>C. marina</i> LMG 25230 ^T	3,6	9,7
<i>C. thioxidans</i> DSM 10146 ^T	27,5	25,9

^a Los ADNs marcados se indican en negrita. La desviación estándar promedio del experimento fue del 1.1 %

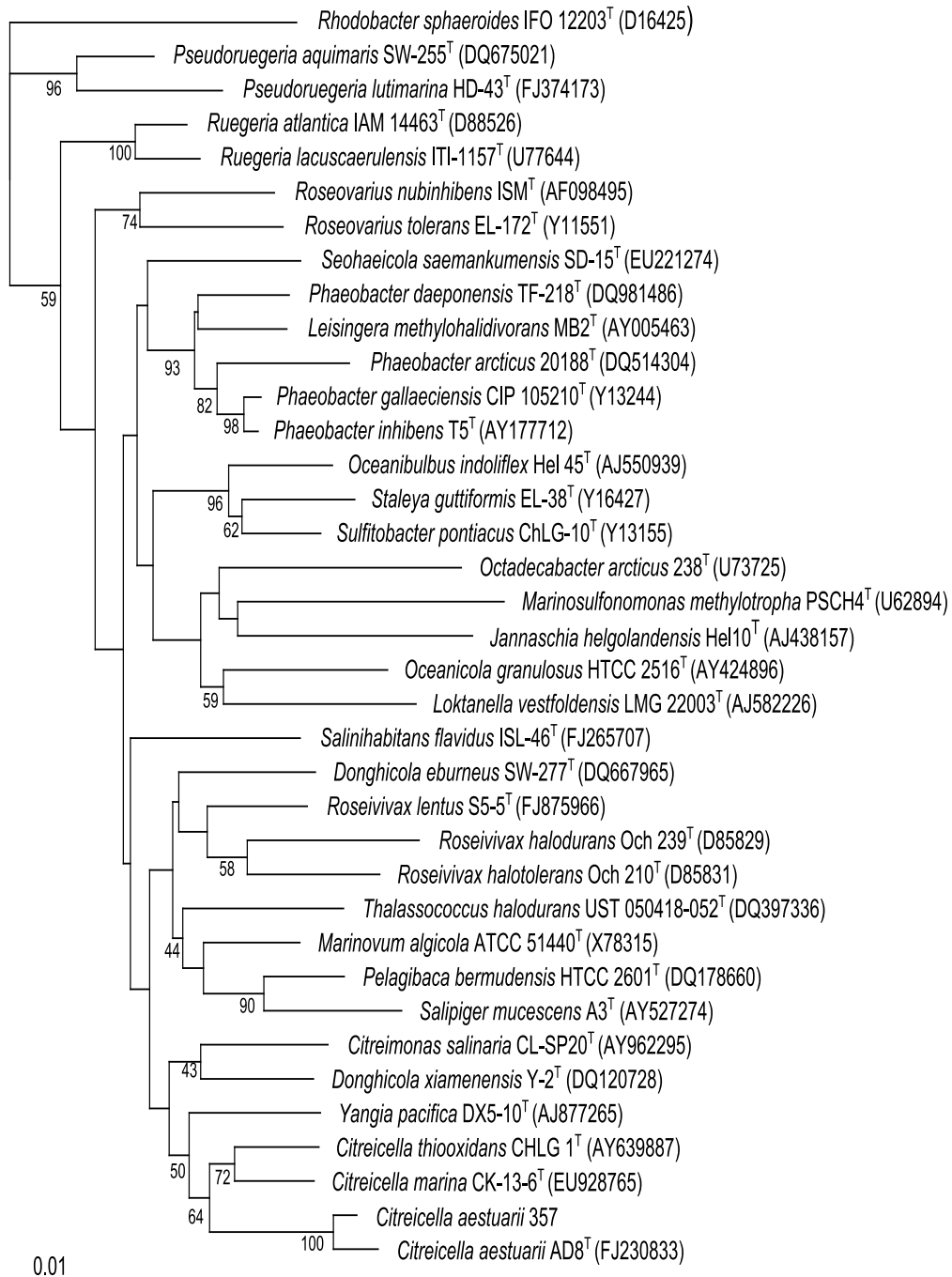


Figura 8. Análisis filogenético basado en el gen ADNr 16S de la cepa 357 y diversas cepas tipo de especies relacionadas. El análisis se realizó con el programa DNADIST del paquete bioinformático PHYLIP (Felsenstein, 1989). La matriz de distancia fue calculada acorde al modelo evolutivo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) y el árbol filogenético fue reconstruido usando el método de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). Los números de acceso de GenBank se indican entre paréntesis. Los números en los nodos indican el porcentaje de ocurrencia de las agrupaciones en el análisis de robustez por *bootstrap* (100 réplicas). Sólo se muestran los valores mayores de 40. *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203^T fue usado como *outgroup*.

1.2. Caracterización fenotípica de *Citreicella aestuarii* 357

1.2.1. Morfología macroscópica y microscópica.

Tras 72 horas de incubación a 30 °C en placas de agar marino (Cultimed) *C. aestuarii* 357 presentaba colonias de color beige de 1-2 mm de diámetro. Estas colonias eran convexas, redondas, con borde entero, y ligeramente elevadas en el centro (Figura 9). Además, no presentaban adherencia al medio de cultivo y tampoco difusión de ningún tipo de pigmento. Cuando fue cultivada en MMY con naftaleno como única fuente de carbono y energía se observó difusión de un pigmento de coloración verde-amarillenta (Figura 7 A). Esta pigmentación no se observó en las placas de MMY con *C. aestuarii* 357 crecida con salicilato como única fuente de carbono y energía (Figura 7 B).

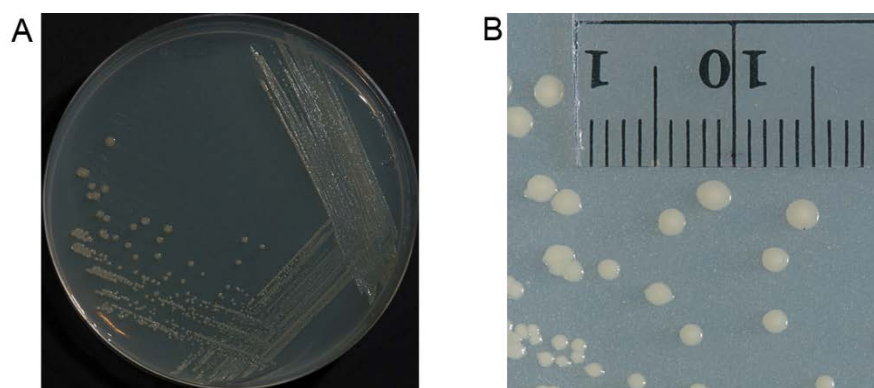


Figura 9. Morfología colonial de *C. aestuarii* 357 en agar marino. A. Placa de agar marino crecida a 30 °C durante 72 horas. B. Detalle de las colonias.

Tras realizar la tinción Gram, las células de *C. aestuarii* 357 se definieron como bacilos Gram negativos. La morfología bacilar de las células de *C. aestuarii* 357 se confirmó por microscopía electrónica de transmisión a partir de cultivos en fase exponencial realizados con caldo marino. Las células presentaron una morfología bacilar cuyo tamaño oscilaba entre 0,4 y 0,9 μm de ancho, y entre 1,3 y 1,5 μm de largo (Figura 10 A). Este tamaño es ligeramente inferior al determinado para la cepa tipo de la especie, *C. aestuarii* AD8^T (1,0-1,4 μm de ancho, 1,6-2,2 μm de largo) (Park *et al.*, 2011), y muy similar al de la cepa tipo del género, *C. thiooxidans* CHLG1^T (0,6-0,8 μm de ancho, 1,0-1,5 μm de largo) (Sorokin *et al.*, 2005). En estas condiciones no fue posible observar la presencia de flagelos en su superficie. Sin embargo, a partir de cultivos en fase estacionaria, y tras sustituir el ácido fosfotúngstico por acetato de uranilo como

agente de contraste, se observó una flagelación polar monotrica (Figura 10 B). En cambio, la cepa tipo de la especie presentaba una flagelación diferente: dos flagelos laterales en uno de los lados (Park *et al.*, 2011). En cuanto a la morfología celular, en la fase estacionaria las células de *C. aestuarii* 357 presentaron una morfología más parecida a un ovoide, con tamaños que oscilaban entre 0,9 y 1,2 μm de ancho, y entre 1,1 y 1,4 μm de largo. Este cambio de morfología no se asocia a una reducción del tamaño celular como la descrita para *Escherichia coli* en fase estacionaria (Akerlund *et al.*, 1995), o para *Pseudomonas putida* y *Enterobacter* sp. cultivados en presencia de hidrocarburos (Neumann *et al.*, 1995), ejemplos en los que la reducción del tamaño celular proporcionaba una reducción de la superficie expuesta en relación al volumen total de la célula, estrategia común para salvar las condiciones de estrés. El cambio de morfología observado sería más semejante al descrito para derivados de *P. stutzeri* AN10 adaptados a altas concentraciones de salicilato (Martín-Cardona, 2009), en los que la transformación de la morfología bacilar a cocobacilo no supuso una alteración de la relación superficie/volumen. Esta modificación de la morfología celular de bacilar a ovoide, aunque sin variación de la relación superficie/volumen, sugiere que las células de *C. aestuarii* 357 presentan en caldo marino el volumen mínimo necesario para mantener sus capacidades biológicas intactas, manteniéndolo en todas las fases del crecimiento celular.

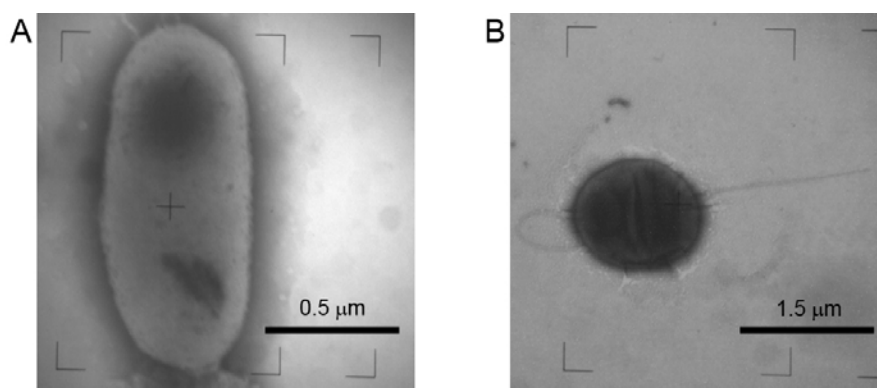


Figura 10. Morfología celular de *C. aestuarii* 357 por microscopía electrónica de transmisión. A. Célula procedente de cultivo de caldo marino en fase exponencial (tinción ácido fosfotúngstico, 1% p/v; amplificación, 60000x). B. Célula procedente de cultivo de caldo marino en fase estacionaria (tinción acetato de uranilo; 1% p/v; amplificación, 20000x).

1.2.2. Caracterización fisiológica.

Las propiedades fisiológicas de *C. aestuarii* 357 se evaluaron creciendo el microorganismo en agar marino y agar MMY suplementado con succinato como fuente única de carbono y energía. Tal como se muestra en la Tabla 3, las propiedades fisiológicas de *C. aestuarii* 357 son similares a las del resto de las cepas tipo de las especies de su género. Tan sólo mencionar que la cepa 357 es algo menos halotolerante y termotolerante que la cepa tipo de su especie, *C. aestuarii* AD8^T (Park *et al.*, 2011)

Tabla 3. Propiedades fisiológicas de *C. aestuarii* 357.

Características ^a	<i>C. aestuarii</i> AD8 ^T	<i>C. aestuarii</i> 357	<i>C. thiooxidans</i> CHLG 1 ^T	<i>C. marina</i> CK-13-6 ^T
NaCl (%)				
rango	1,0–10,0	2,8–5,3	0,5–6,0	1,0–12,0
óptima	2,0–4,0	2,3	2,0	2,0–7,0
Temperatura (°C)				
rango	15–40	15–30	8–35	4–38
óptimo	25–30	25–30	25–28	25–28
pH				
rango	5,0–9,5	5,0–9,0	6,5–8,5	6,0–9,0
óptimo	6,0–7,5	7,4	7,8	6,0–7,0

^a Los datos de las cepas tipo de las tres especies del género *Citricella* se tomaron de los artículos con las descripciones originales (Sorokin *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011). Los rangos evaluados para la cepa 357 englobaron los máximos y mínimos descritos para las tres especies del género.

1.2.3. Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica de *C. aestuarii* 357 se centró en dos aspectos: taxonómico y biotecnológico. La caracterización taxonómica se basó en las pruebas previamente realizadas en las descripciones de las especies del género *Citricella* (Sorokin *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011). Esta caracterización se realizó con el sistema API 20NE (bioMérieux) y se complementó con pruebas de crecimiento en agar MMY suplementado con diversas fuentes de carbono y energía. Al igual que la cepa tipo de la especie *C. aestuarii* AD8^T (Park *et al.*, 2011), la cepa 357 dio positivo para las pruebas de catalasa y oxidasa; creció a expensas de acetato, asparagina, glutamina, lactato, piruvato, sacarosa, serina, sorbitol, succinato y tirosina como fuentes únicas de carbono y energía; presentó la capacidad de oxidar tiosulfato a sulfato, y de nitrato a nitrito; y fue capaz de hidrolizar la esculina. Del mismo

modo, fue incapaz de crecer utilizando arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, isoleucina, metionina, prolina, treonina, triptófano y valina como fuentes únicas de carbono y energía; y fue incapaz de producir indol y de hidrolizar almidón, caseína, gelatina, Tween 40, Tween 80 y urea. De hecho, la única diferencia bioquímica de interés taxonómico detectada frente a la cepa tipo de su especie fue la capacidad de utilizar citrato trisódico como fuente de carbono y energía, capacidad metabólica no detectada para *C. aestuarii* AD8^T (Park *et al.*, 2011).

En cuanto a la caracterización del potencial biotecnológico de *C. aestuarii* 357, el estudio se centró básicamente en la capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía, capacidad que, tal como hemos visto en la introducción, está presente en varios miembros del grupo *Roseobacter* (Buchan *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2006; Harwati *et al.*, 2007; Moran *et al.*, 2007; Harwati *et al.*, 2008; Harwati *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2010; Buchan y González, 2010). En este punto del trabajo, la caracterización se hizo probando la capacidad de crecer en MMY suplementado con diversos hidrocarburos como fuente única de carbono y energía. Así, *C. aestuarii* 357 fue incapaz de crecer a expensas de antraceno, antranilato, benzoato, bifenilo, 3,4-dihidroxifenilacetato, fenantreno, fenol, hexadecano, 4-hidroxibenzoato, 3-hidroxifenilacetato, octano, tolueno y xileno. Por el contrario, *C. aestuarii* 357 fue capaz de desarrollar colonias aisladas a partir de dibenzotiofeno, 2,3-dihidroxibenzoato, 4-hidroxifenilacetato, 2,5-dihidroxifenilacetato, gentisato, naftaleno, protocatecuato y salicilato. La capacidad de crecer en estos ocho hidrocarburos aromáticos, dos de ellos poliaromáticos (dibenzotiofeno y naftaleno), le confiere un alto potencial biotecnológico que procederemos a estudiar con más detalle.

2. CARACTERIZACION GENÓMICA DE *Citreicella aestuarii* 357

2.1. Características genómicas globales de *Citreicella aestuarii* 357

Tal como se ha mencionado anteriormente, la cepa 357 fue capaz de desarrollar colonias aisladas en ocho hidrocarburos aromáticos distintos, dos de ellos poliaromáticos (naftaleno y dibenzotiofeno). Para identificar genéticamente las vías metabólicas de degradación decidimos secuenciar su genoma. La secuenciación, ensamblaje, anotación y análisis del genoma se realizó tal como se especifica en la sección “Materiales y Métodos”. Así, el ensamblaje del genoma de *C. aestuarii* 357 generó un total de 180 *contigs* de longitud superior a 500 pb. Los parámetros de calidad obtenidos en el ensamblaje (Tamaño promedio de *contig*, 25.547 pb; N50, 53.482 pb; Tamaño del *contig* más largo, 180.560 pb; Q40 plus bases, 4.592.905 pb, 99,88%; Índice de cobertura, 30x) fueron adecuados para su publicación en la base de datos de genomas del NCBI, así como en la de otros servidores. En la Tabla 4 se muestran los números de acceso de las diferentes bases de datos públicas en las que se puede encontrar la información del genoma de la cepa 357.

Tabla 4. *C. aestuarii* 357 en bases de datos de información genómica.

Base de datos	Dirección Web	Número de acceso
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov	Ref Seq: PRJNA16001
GOLD	www.genomesonline.org	Gold card: Gi06674
IMG	www.img.jgi.doe.gov	Taxon ID: 2513237353
Roseobase	www.roseobase.org	Genome: cit_357

En la Tabla 5 se muestran las características generales del genoma de la cepa 357. Así, el genoma de la cepa 357 tiene un tamaño de 4.598.615 pb, presenta una cobertura informativa del 87,31%, y un porcentaje molar de G+C del 64,23%. Estos valores, tal como se puede observar en la Tabla Suplementaria S1, son similares a los de los genomas del grupo *Roseobacter* secuenciados hasta el momento (Newton *et al.*, 2010).

Tabla 5. Características genómicas globales de *C. aestuarii* 357.

Características genómicas	Valor	Porcentaje
Tamaño genómico (pb)	4.598.615	100,00
DNA codificante (pb)	4.015.051	87,31
Contenido G+C (pb)	2.953.690	64,23
Número de genes	4.618	100,00
ARN	45	0,97
ARNr	3	6,67
ARNt	42	93,33
Proteínas (CDSs)	4.573	99,03
Con función conocida	3.148	68,84
Proteínas hipotéticas	1.425	31,16
Cluster de ortólogos		
IMG (E-value < 10 ⁻²)	1.828	
CD-hit (30% identidad)	3.822	
CD-hit (50% identidad en 50% secuencia)	4.431	
CD-hit (70% identidad en 60% secuencia)	4.510	
CDSs en cluster de parálogos		
IMG (E-value < 10 ⁻²)	1.531	33,48
CD-hit (30% identidad)	1.150	25,15
CD-hit (50% identidad en 50% secuencia)	246	5,38
CD-hit (70% identidad en 60% secuencia)	106	2,32
CDSs asignadas a COGs-NCBI (IMG, E-value < 10 ⁻²)	3.465	75,46
CDSs con péptido señal (IMG, E-value < 10 ⁻²)	950	20,77
CDSs con hélices transmembrana (IMG, E-value < 10 ⁻²)	960	20,99
CDSs asignados a enzimas E.C. (IMG, E-value < 10 ⁻²)	1.104	24,14
CDSs asignados a transportadores (IMG, E-value < 10 ⁻²)	686	15,00
CDSs asignados a KEGG (IMG, E-value < 10 ⁻²)	1.309	28,62
CDSs asignados a MetaCyc (IMG, E-value < 10 ⁻²)	1.073	23,46

La anotación se realizó utilizando el servicio de anotación automática de genomas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>). En la Tabla Suplementaria S2 se muestra un extracto tabulado de dicha anotación. Como se muestra en la Tabla 5, se identificaron un total de 4.618 genes, de los cuales 4.573 se asignaron a CDSs y 45 a ARNs funcionales (42 ARNt y 3 ARNr). En referencia a los ARNr, tan sólo se ha anotado un operón completo (*contig* C357_260, número de acceso NCBI NZ_AJKJ01000163) con el orden génico 23S-16S-5S. Sin embargo, el índice de cobertura de dicho fragmento de DNA (136x) sugiere la presencia de 4 o perones completos de ARNr, valor comprendido entre los límites de 1 a 5 descritos para el grupo *Roseobacter* (Newton *et al.*, 2010). En referencia a las CDSs, un total de 3.148 (68,8%) pudo asignárseles una posible función, manteniéndose un total de 1.425 (31,2%) como proteínas de función desconocida. Estos valores son similares a los observados para los otros genomas del grupo *Roseobacter* (Tabla Suplementaria S1). La estrategia de anotación que mayor porcentaje de

asignación de funcionalidad generó fue la comparación con la base de datos de COGs del NCBI. En la Tabla Suplementaria S3 se muestra un resumen numérico de la misma. Las proteínas pertenecientes a cada una de las familias de COGs pueden extraerse de la Tabla Suplementaria S2. Como sucede con todos los datos genómicos comentados hasta el momento, los resultados obtenidos fueron similares a los observados para el resto de genomas del grupo *Roseobacter* (Tabla Suplementaria S1).

2.2. Adscripción filogenómica de *Citreicella aestuarii* 357

Newton y colaboradores (2010) realizaron un estudio filogenómico de 32 cepas cuyos genomas habían sido secuenciados, basándose en 70 genes presentes en todos ellos en copia única. Decidimos repetir el análisis con *C. aestuarii* 357 y los 39 genomas del grupo *Roseobacter* secuenciados hasta este momento (Figura 11). En el análisis, al igual que Newton y colaboradores, introdujimos *Escherichia coli* K12 como cepa de referencia. De los 70 genes utilizados por Newton y colaboradores, tan sólo 61 de ellos estaban conservados en las cepas analizadas y, por tanto, fueron estos los que se utilizaron. Por otra parte, a diferencia de Newton y colaboradores, decidimos realizar el análisis con las secuencias aminoacídicas de sus productos génicos en lugar de utilizar secuencias nucleotídicas. En la Tabla Suplementaria S4 se detallan las proteínas utilizadas en el análisis así como las posiciones ocupadas por cada una de ellas en el alineamiento final. Tal como se menciona en la sección “Materiales y métodos” se utilizó el programa GBlocks para eliminar las posiciones más variables. De este modo, del total de 23.746 aminoácidos del alineamiento concatenado, 20.923 (88% del alineamiento original) fueron los residuos utilizados en el análisis filogenómico. El resultado del análisis filogenómico se muestra en la Figura 11.

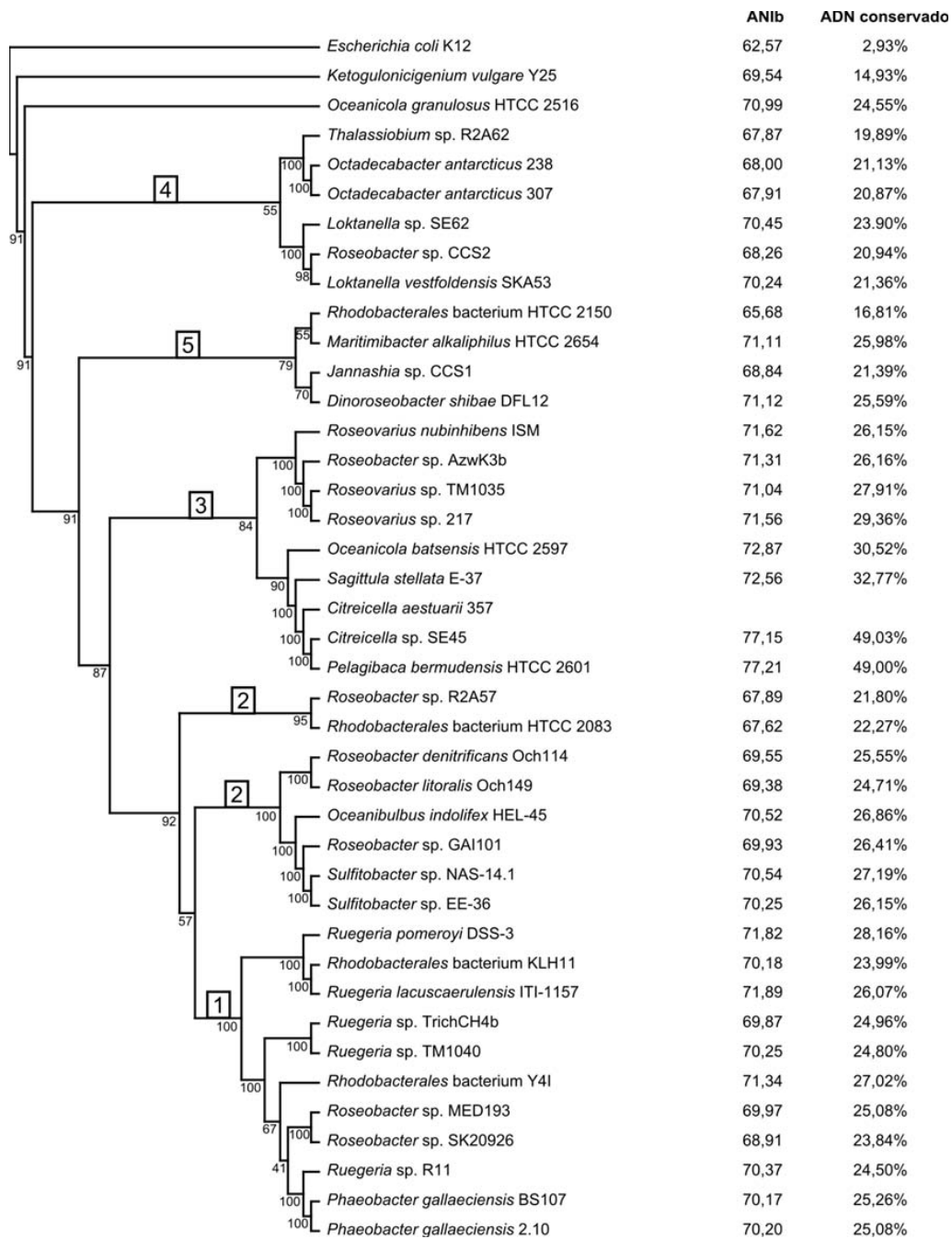


Figura 11. Análisis filogenético basado en un concatenado de proteínas conservadas de la cepa 357 y otras 39 cepas del grupo *Roseobacter* con genomas secuenciados. El análisis de parsimonia mostrado se realizó con el programa PROTPARS del paquete bioinformático Phylip (Felsenstein, 1989). Los números en los nodos indican el porcentaje de ocurrencia de las agrupaciones en el análisis de robustez por *bootstrap* (100 réplicas). Sólo se muestran los valores mayores de 40. *E. coli* K12 fue usado como *outgroup*. Los números encajonados sobre las ramas (1 a 5) indican los clados previamente descritos por Newton y colaboradores (2010). Los valores situados a la derecha de cada una de las cepas muestran el índice de semejanza genómica ANIb y el porcentaje de ADN conservado, ambos calculados con el programa JSpecies (Richter y Rosselló-Mora, 2009), entre el genoma de la cepa 357 y cada una de las cepas usadas en el análisis.

Como se puede observar, las cinco agrupaciones filogenómicas descritas por Newton y colaboradores (2010) se mantienen conservadas en nuestro análisis. El análisis filogenómico muestra como *C. aestuarii* 357 se afilia al clado 3 definido por Newton y colaboradores (2010), formando un subgrupo filogenéticamente coherente dentro de éste con la cepa de su mismo género *Citreicella* sp. SE45 (BioProject NCBI PRJNA55957), así como las cepas *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601 (Thrash *et al.*, 2010a), *Sagittula stellata* E-37 (BioProject NCBI PRJNA54621) y *Oceanicola batsensis* HTCC 2597 (Thrash *et al.*, 2010b). Es interesante destacar que todas las cepas de dicho subgrupo, al igual que la cepa 357, son aislados procedentes del Océano Atlántico y mares colindantes, tales como el Mar de los Sargazos y el Mar Caribe. Este mismo resultado se obtuvo al analizar las secuencias por métodos de distancia y por máxima verosimilitud (ver “Materiales y métodos”). Este resultado filogenómico viene reforzado por los valores de ANIb y DNA conservado entre la cepa 357 y el resto de cepas del grupo evaluadas (máximos de ANIb de 77,15 y 77,21, con *Citreicella* sp. SE45 y *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601, respectivamente, ambas con un porcentaje del 49% de ADN conservado, Figura 11).

2.3. Afiliación filogenómica de las CDSs de *Citreicella aestuarii* 357.

El análisis filogenómico mencionado anteriormente se reforzó con un análisis de semejanza entre las CDSs identificadas en la cepa 357 y las CDSs presentes en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). El análisis se realizó localmente utilizando BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y la base de datos a fecha de 12 de febrero de 2012. Para facilitar el cálculo se limitaron los resultados a un alineamiento por CDS, con un E-value de corte de 10^{-10} . Los resultados detallados pueden consultarse en la Tabla Suplementaria S5. De las 4.573 CDSs identificadas, tan sólo 450 resultaron ser únicas (con el criterio de homología de secuencia anteriormente mencionado) para *C. aestuarii* 357. De estas 450 CDSs, 428 fueron anotadas como proteínas hipotéticas de función desconocida. Sin embargo, un análisis detallado de los dominios conservados en ellas al compararlas con la base de datos COG del NCBI reveló que de las 450 CDSs, 58 de ellas podían codificar para proteínas funcionales (Figura 12). Entre éstas

destaca la presencia de 17 posibles transposasas, lo que sugiere un potencial de transferencia genética horizontal.

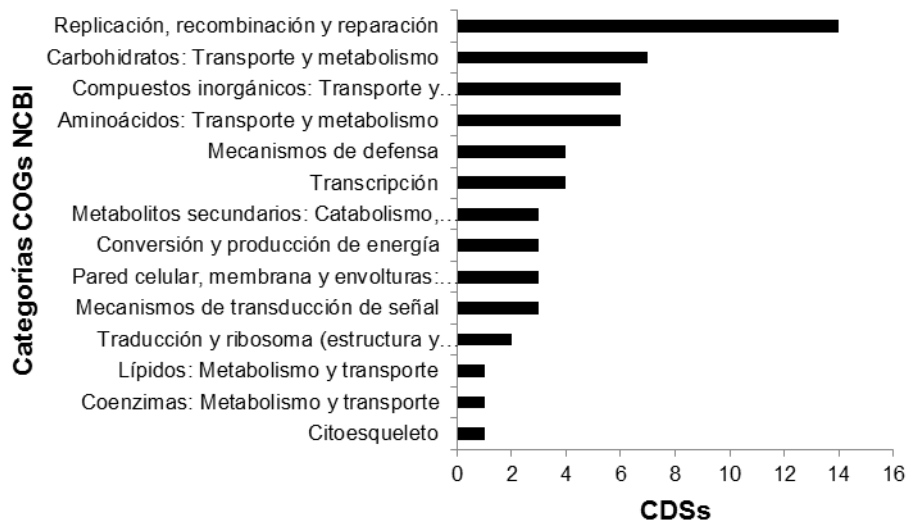


Figura 12. Distribución en COGs de las proteínas exclusivas de *C. aestuarii* 357. Distribución en COGs de las 58 proteínas de *C. aestuarii* 357 carentes de homólogos (E-value > a 10^{-10}) en las proteínas de la base de datos RefSeq del NCBI.

De las 4.573 CDSs analizadas, 4.123 presentaron algún homólogo en la base de datos RefSeq del NCBI (Tabla Suplementaria S5). De ellas, 4.089 pudieron afiliarse filogenéticamente a algún microorganismo cultivable, encontrándose representantes de 71 familias distintas, agrupadas en un total de 16 Phyla (Tabla 6). Como era de esperar, el 95,0% (3917 CDS) se afiliaron a la clase Alphaproteobacteria, y de éstas, la gran mayoría (3.702 CDSs) presentaron como mejor homólogo una CDS de la familia *Rhodobacteraceae*, a la que se afilian todos los miembros del grupo *Roseobacter*. De hecho, y tal como se muestra en la Tabla 7, el 95,8% de los CDSs se afiliaron con cepas pertenecientes al grupo *Roseobacter*. Así, la mayor parte de CDSs presentaron la mejor homología de secuencia con CDSs de *Citricella* sp. SE45 (1.437 CDSs) y de *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601 (1.258 CDSs), las dos cepas más próximas a *C. aestuarii* 357 atendiendo al análisis filogenómico mostrado en la Figura 11.

Tabla 6. Adscripción filogenética de las CDSs de *C. aestuarii* 357 atendiendo a la mejor homología con las CDSs de la base de datos RefSeq del NCBI. Las familias entrecomilladas hacen referencias a familias no validadas en Euzéby's LPSN (<http://www.bacterio.cict.fr/>) (Tindall *et al.*, 2006).

Filum	Familia	CDSs	Porcentaje
Acidobacteria		1	0,02
	<i>Holophagaceae</i>	1	0,02
Actinobacteria		18	0,44
	<i>Conexibacteraceae</i>	1	0,02
	<i>Gordoniaceae</i>	1	0,02
	<i>Micromonosporaceae</i>	5	0,12
	<i>Mycobacteriaceae</i>	2	0,05
	<i>Nakamurellaceae</i>	1	0,02
	<i>Propionibacteriaceae</i>	1	0,02
	<i>Pseudonocardiaceae</i>	2	0,05
	<i>Streptomycetaceae</i>	5	0,12
Proteobacteria (Clase Alphaproteobacteria)		3.917	95,00
	<i>Acetobacteraceae</i>	9	0,22
	" <i>Aurantimonadaceae</i> "	10	0,24
	<i>Beijerinckiaceae</i>	3	0,07
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	11	0,27
	<i>Brucellaceae</i>	4	0,10
	<i>Caulobacteraceae</i>	2	0,05
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	3	0,07
	<i>Hyphomonadaceae</i>	17	0,41
	<i>Methylobacteriaceae</i>	6	0,15
	<i>Methylocystaceae</i>	1	0,02
	" <i>Parvularculaceae</i> "	1	0,02
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	19	0,46
	<i>Rhizobiaceae</i>	46	1,12
	<i>Rhodobacteraceae</i>	3.702	89,79
	<i>Rhodospirillaceae</i>	11	0,27
	<i>Sphingomonadaceae</i>	16	0,39
	<i>Xanthobacteraceae</i>	15	0,36
	No asignadas	41	0,99
Bacteroidetes		4	0,10
	<i>Bacteroidaceae</i>	1	0,02
	<i>Cytophagaceae</i>	1	0,02
	<i>Flavobacteriaceae</i>	2	0,05
Proteobacteria (Clase Betaproteobacteria)		56	1,36
	<i>Alcaligenaceae</i>	18	0,44
	<i>Burkholderiaceae</i>	15	0,36
	<i>Comamonadaceae</i>	11	0,27
	<i>Gallionellaceae</i>	2	0,05
	<i>Neisseriaceae</i>	4	0,10
	<i>Oxalobacteraceae</i>	2	0,05
	<i>Rhodocyclaceae</i>	4	0,10
Chlorobi		1	0,02
	<i>Chlorobiaceae</i>	1	0,02
Chloroflexi		2	0,05
	" <i>Chloroflexaceae</i> "	1	0,02
	" <i>Herpetosiphonaceae</i> "	1	0,02
Cyanobacteria		15	0,36
	<i>Nostocaceae</i>	3	0,07
	<i>Oscillatoriothycideae</i>	12	0,29

Tabla 6. Continuación.

Filum	Familia	CDSs	Porcentaje
Proteobacteria (Clase Deltaproteobacteria)		4	0,10
	<i>Desulfomicrobiaceae</i>	1	0,02
	<i>Desulfovibrionaceae</i>	1	0,02
	<i>Desulfuromonadaceae</i>	1	0,02
	<i>Myxococcaceae</i>	1	0,02
Firmicutes		8	0,19
	<i>Acidaminococcaceae</i>	2	0,05
	<i>Bacillaceae</i>	1	0,02
	<i>Clostridiaceae</i>	1	0,02
	<i>Paenibacillaceae</i>	1	0,02
	<i>Peptococcaceae</i>	2	0,05
	<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	1	0,02
Fusobacteria		1	0,02
	<i>Leptotrichiaceae</i>	1	0,02
Proteobacteria (Clase Gammaproteobacteria)		58	1,41
	<i>Alcanivoracaceae</i>	2	0,05
	<i>Alteromonadaceae</i>	6	0,15
	<i>Chromatiaceae</i>	4	0,10
	<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	6	0,15
	<i>Enterobacteriaceae</i>	8	0,19
	<i>Halomonadaceae</i>	9	0,22
	<i>Methylococcaceae</i>	1	0,02
	<i>Moraxellaceae</i>	1	0,02
	<i>Oceanospirillaceae</i>	4	0,10
	<i>Pasteurellaceae</i>	1	0,02
	<i>Piscirickettsiaceae</i>	2	0,05
	<i>Pseudomonadaceae</i>	6	0,15
	<i>"Salinisphaeraceae"</i>	1	0,02
	<i>Shewanellaceae</i>	2	0,05
	<i>Vibrionaceae</i>	3	0,07
	<i>Xanthomonadaceae</i>	1	0,02
	No asignadas	1	0,02
Planctomycetes		1	0,02
	<i>Planctomycetaceae</i>	1	0,02
Spirochaetes		1	0,02
	<i>Spirochaetaceae</i>	1	0,02
Thermotogae		1	0,02
	<i>Thermotogaceae</i>	1	0,02
Verrucomicrobia		1	0,02
	No asignadas	1	0,02
No afiliado		12	0,29
No cultivado		17	0,41
Virus		5	0,12

Tabla 7. Adscripción filogenética de las CDSs de *C. aestuarii* 357 que presentaron la mejor homología con CDSs de la familia *Rhodobacteraceae* de la base de datos RefSeq del NCBI.

Clado	Cepa	CDSs	Porcentaje	
<i>Roseobacter</i>		3.547	95,81	
	<i>Citricella</i> sp. SE45	1.437	38,82	
	<i>DinoRoseobacter shibae</i> DFL 12	30	0,81	
	<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	9	0,24	
	<i>Ketogulonicigenium vulgare</i> Y25	2	0,05	
	<i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53	2	0,05	
	<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC 2654	28	0,76	
	<i>Oceanibulbus indolifex</i> HEL-45	34	0,92	
	<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC 2597	148	4,00	
	<i>Oceanicola granulosa</i> HTCC 2516	17	0,46	
	<i>Oceanicola</i> sp. S124	48	1,30	
	<i>Octadecabacter antarcticus</i> 238	7	0,19	
	<i>Octadecabacter antarcticus</i> 307	11	0,30	
	<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC 2601	1.258	33,98	
	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 2.10	12	0,32	
	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107	8	0,22	
	<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114	16	0,43	
	<i>Roseobacter litoralis</i> OCh 149	21	0,57	
	<i>Roseobacter</i> sp. AzwK-3b	16	0,43	
	<i>Roseobacter</i> sp. CCS2	8	0,22	
	<i>Roseobacter</i> sp. GAI101	22	0,59	
	<i>Roseobacter</i> sp. MED193	24	0,65	
	<i>Roseobacter</i> sp. SK209-2-6	15	0,41	
	<i>Roseovarius nubinihibens</i> ISM	36	0,97	
	<i>Roseovarius</i> sp. 217	72	1,94	
	<i>Roseovarius</i> sp. TM1035	23	0,62	
	<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	16	0,43	
	<i>Ruegeria</i> sp. PR1b	5	0,14	
	<i>Ruegeria</i> sp. R11	10	0,27	
	<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	8	0,22	
	<i>Ruegeria</i> sp. TW15	8	0,22	
	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> ITI-1157	23	0,62	
	<i>Ruegeria</i> sp. TrichCH4B	29	0,78	
	<i>Sagittula stellata</i> E-37	84	2,27	
	<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	14	0,38	
	<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1	19	0,51	
	<i>Thalassibium</i> sp. R2A62	8	0,22	
	<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium KLH11	5	0,14	
	<i>Rhodobacterales</i> bacterium HTCC 2083	3	0,08	
	<i>Rhodobacterales</i> bacterium HTCC 2150	4	0,11	
	<i>Rhodobacterales</i> bacterium Y4I	7	0,19	
	No <i>Roseobacter</i>		155	4,19
		<i>Labrenzia alexandrii</i> DFL-11	3	0,08
	<i>Paracoccus aminophilus</i>	2	0,05	
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	6	0,16	
	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	26	0,70	
	<i>Paracoccus denitrificans</i> SD1	4	0,11	
	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	5	0,14	
	<i>Paracoccus</i> sp. TRP	14	0,38	
	<i>Pseudovibrio</i> sp. JE062	4	0,11	
	<i>Rhodobacter capsulatus</i> SB 1003	12	0,32	
	<i>Rhodobacter</i> sp. SW2	20	0,54	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1	0,03	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	7	0,19	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	16	0,43	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029	5	0,14	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> f. sp. <i>denitrificans</i>	1	0,03	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KD131	13	0,35	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> WS8N	4	0,11	
	<i>Roseibium</i> sp. TrichSKD4	2	0,05	
	<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614	10	0,27	

2.4. Análisis genómico funcional de *Citricella aestuarii* 357.

El análisis genómico realizado por Newton y colaboradores (2010) para el grupo *Roseobacter* reveló que la única característica presente únicamente en microorganismos de un grupo filogenómico (grupo filogenómico 3) era la oxidación del H₂, no observándose correlación entre las agrupaciones filogenómicas y el resto de genes o agrupaciones génicas ecológicamente relevantes analizados. Esta falta de especialización funcional asociada a filogenia sugería una elevada tasa de adquisición de nuevos genes y de flujo genético entre los miembros del clado, mediada principalmente por mecanismos de transferencia genética horizontal (Newton *et al.*, 2010). A pesar de ello, decidimos hacer un análisis en profundidad del potencial genético ecológicamente relevante de la cepa 357, el cual mostramos a continuación.

2.4.1. Elementos genéticos móviles: transposasas y GTAs (Agentes de transferencia de genes).

En el análisis realizado por Newton y colaboradores (2010) se determinó la presencia de GTAs (Agentes de Transferencia de Genes) en 30 de los 32 genomas que analizaron. Estos sistemas de transferencia genética, inicialmente caracterizados en *Rhodobacter capsulatus* (revisado en Leung *et al.*, 2010), utilizan un sistema semejante a la transducción fágica para transferir material genético cromosómico entre bacterias de la familia *Rhodobacteraceae* (Biers *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009). El análisis de la presencia de GTAs en el genoma de la cepa 357 se realizó mediante BlastP utilizando como referencia los péptidos resultantes de los genes estructurales del GTA de *Rhodobacter capsulatus* B10 (Lang y Beatty, 2000). Tal como se puede observar en la Tabla Suplementaria S6, las 17 proteínas estructurales de la cepa B10 tuvieron un homólogo en el genoma de la cepa 357 (15 de ellas con un E-value < 10⁻²⁰). De hecho, todos los genes que codifican para estas proteínas se agrupan formando un cluster génico de aproximadamente 20 kb (posiciones 60.432 a 80.829 del *contig* C357_208, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000149) que codifica para un total de 23 posibles proteínas (ZP_10021471.1 a ZP_10021493.1). Esta agrupación génica presenta una sintenia casi perfecta con la presente en los miembros del grupo *Roseobacter* secuenciados

filogenómicamente más próximos (Tabla Suplementaria S6), sugiriendo la posibilidad de una elevada tasa de transferencia génica entre los miembros del grupo.

La presencia de transposones y secuencias de inserción, indicativa de la existencia de procesos de transferencia genética horizontal, ha sido considerada como de elevado interés ecológico en el ambiente marino (revisado en Sobecky y Hazen, 2009). Por ello, decidimos evaluar también la presencia de estos elementos genéticos móviles en la cepa 357. Para ello utilizamos la herramienta BlastP implementada en el servidor IS-Finder (<https://www-is.biotoul.fr/>; Siguier *et al.*, 2006), utilizando un valor de corte de E-value de 10^{-10} . Como se puede observar en la Tabla Suplementaria S7, un total de 129 CDSs presentaron homologías con transposasas presentes en la base de datos. Este número es bastante elevado, sobre todo cuando se compara con el valor promedio de transposasas (52 ± 38) anotado en los genomas del grupo *Roseobacter* (Newton *et al.*, 2010), lo que sugiere para la cepa 357 una elevada tasa de transferencia genética horizontal. La diversidad genética de las diferentes transposasas en el genoma de la cepa 357 es también considerable. Así, y tal como se muestra en la Figura 13, el análisis realizado demostró que estas 129 posibles transposasas pertenecían a un total de 11 familias génicas distintas. Esta gran diversidad genética se mantenía incluso si reducíamos el número de CDSs consideradas atendiendo a la longitud de la secuencia. Así, incluso para las posibles transposasas con longitudes superiores a 150 aminoácidos (40 CDSs) –la transposasa más pequeña caracterizada es la de IS608 (Barabas *et al.*, 2008), perteneciente a la familia IS200–, se detectó la presencia de un total de 10 familias distintas, lo que sugiere una gran diversidad de eventos de transferencia genética horizontal. Es interesante destacar que, en todos los casos, las secuencias de inserción mayoritarias eran las pertenecientes a las familias IS5 e IS3 (Figura 13), ejemplos de secuencias de inserción con mecanismos de salto muy débilmente o muy fuertemente regulados, respectivamente (Chandler y Mahillon, 2002).

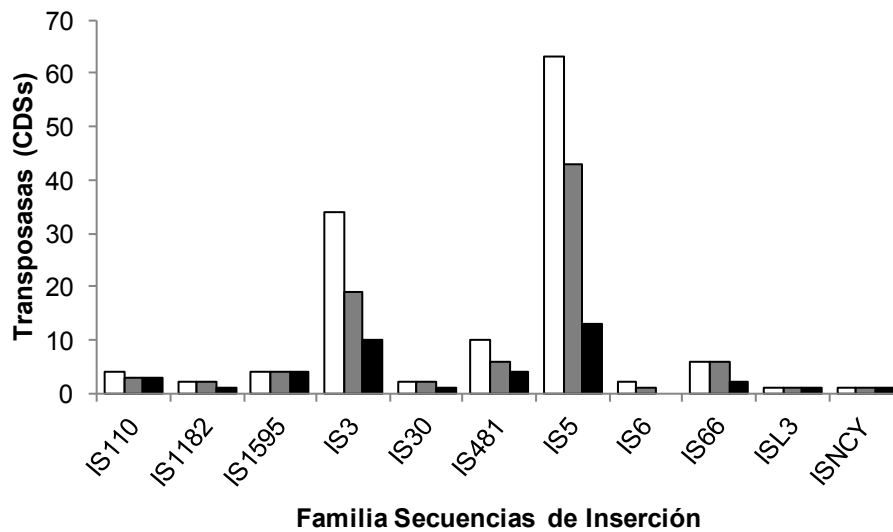


Figura 13. Transposasas en el genoma de *C. aestuarii* 357. Distribución de transposasas de la cepa 357 en familias atendiendo a la similitud con las transposasas de la base de datos IS-Finder (BlastP, E-value < 10^{-10}). Columnas blancas: todas las CDSs identificadas como posibles transposasas; columnas grises: posibles transposasas con longitud superior a 100 aminoácidos; columnas negras: posibles transposasas con longitud superior a 150 aminoácidos.

2.4.2. Oxidación del H₂.

Newton y colaboradores (2010) identificaron la capacidad de oxidar hidrógeno para obtener energía como una característica única para ciertos miembros del clado filogenómico 3, clado al que pertenece *C. aestuarii* 357. Barz y colaboradores (2010) hicieron una búsqueda exhaustiva de hidrogenasas en los genomas de microorganismos marinos disponibles y describieron la presencia de la agrupación génica completa para sintetizar una hidrogenasa NiFe-dependiente tolerante al O₂ en *Sagitulla stellata* E-37, *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601 y *Roseovarius* sp. TM1035. Utilizando como referencia los productos génicos descritos por Barz y colaboradores (2010) para *S. stellata* E-37, se encontró que el genoma de *C. aestuarii* 357 contenía una región de aproximadamente 20 kb (posiciones 78.354 a 97.653 del *contig* C357_142, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000118) que presentaba una sintenia perfecta con el cluster descrito para la cepa E-37 (Figura 14), codificando para 19 posibles proteínas (ZP_10020541.1 a ZP_10020560.1) involucradas en la síntesis de una hidrogenasa NiFe-dependiente (Tabla 8).

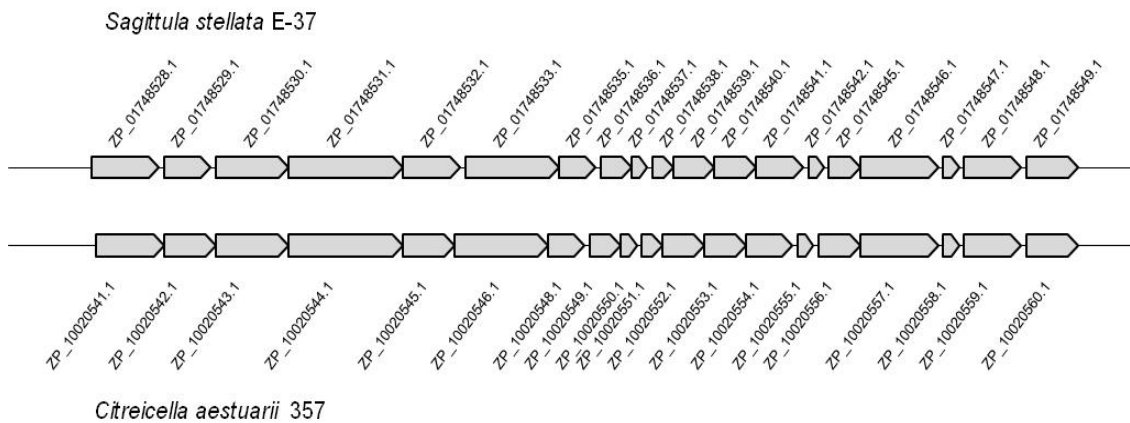


Figura 14. Sintenia entre las agrupaciones génicas que codifican para las proteínas involucradas en la síntesis de la hidrogenasa NiFe-dependiente de *C. aestuarii* 357 y *S. stellata* E-37.

Tabla 8. Comparativa de las CDSs que codifican para una hidrogenasa NiFe-dependiente de *C. aestuarii* 357 con las de *S. stellata* E-37.

<i>C. aestuarii</i> 357 ^a	Proteína	E-value	Identidad (%)	<i>S. stellata</i> E-37 ^a
ZP_10020541.1	HoxJ	2×10^{-145}	53,17	ZP_01748528.1
ZP_10020542.1	HoxB	2×10^{-168}	72,20	ZP_01748529.1
ZP_10020543.1	HoxC	0,0	66,95	ZP_01748530.1
ZP_10020544.1	HypF	0,0	67,95	ZP_01748531.1
ZP_10020545.1	HupS	0,0	94,17	ZP_01748532.1
ZP_10020546.1	HupL	0,0	86,93	ZP_01748533.1
ZP_10020547.1	Hidrolasa	0,8	52,17	ZP_01748534.1
ZP_10020548.1	HupZ	3×10^{-123}	68,60	ZP_01748535.1
ZP_10020549.1	Proteasa	3×10^{-98}	69,85	ZP_01748536.1
ZP_10020550.1	HoxL	10^{-36}	63,64	ZP_01748537.1
ZP_10020551.1	HupG	7×10^{-52}	62,81	ZP_01748538.1
ZP_10020552.1	HupH	2×10^{-119}	64,16	ZP_01748539.1
ZP_10020553.1	HupJ	2×10^{-126}	66,54	ZP_01748540.1
ZP_10020554.1	HupK	2×10^{-55}	40,07	ZP_01748541.1
ZP_10020555.1	HypA	2×10^{-56}	71,17	ZP_01748542.1
ZP_10020556.1	HypB	4×10^{-123}	78,40	ZP_01748545.1
ZP_10020557.1	HoxA	0,0	61,62	ZP_01748546.1
ZP_10020558.1	HypC	4×10^{-40}	68,67	ZP_01748547.1
ZP_10020559.1	HypD	0,0	81,05	ZP_01748548.1
ZP_10020560.1	HypE	9×10^{-163}	73,67	ZP_01748549.1

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

Entre ellas se encontraron las proteínas estructurales de la hidrogenasa (codificadas por los genes *hupSLZ*), las proteínas involucradas en la regulación

de su expresión (codificadas por los genes *hoxA* y *hoxJBC*), las proteínas involucradas en la tolerancia al O₂ (codificadas por los genes *hupGHJK*), así como todas las proteínas accesorias asociadas a la familia de hidrogenasas NiFe-dependientes (codificadas por los genes *hoxL*, *hypAB*, *hypCDE* y *hypF*) (Tabla 8).

2.4.3. Oxidación de CO.

Moran y colaboradores (2004) describieron experimentalmente la capacidad de *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 para oxidar monóxido de carbono que, debido a la carencia de RuBisCO (ribulosa bisfosfato carboxilasa) u otra vía completa de autotrofia, era utilizado únicamente como fuente de energía y no como fuente de carbono. La cepa DSS-3 presentaba dos operones completos *coxMLSG* (Moran *et al.*, 2004) que potencialmente codificaban para dos CO dehidrogenasas con distintas afinidades para CO (King y Weber, 2007): el tipo I u OMP, característica de carboxidotrofos clásicos como *Oligotropha carboxidovorans* y *Pseudomonas carboxydohydrogena*; y el tipo II o BMS, presente en microorganismos no carboxidotrofos, esta última con una menor afinidad por el monóxido de carbono. Newton y colaboradores (2010) demostraron la presencia de la forma II en casi todos los miembros del grupo *Rosebacter* analizados (la excepción fue *Roseovarius nubinhibens* ISM), mientras que la forma I sólo estaba presente en un tercio de los 32 genomas analizados. Por lo tanto, decidimos evaluar la presencia de estas enzimas en la cepa 357. Para ello se comparó mediante BlastP las CDSs de la cepa 357 con las CDSs de *R. pomeroyi* DSS-3 involucradas en la biosíntesis de ambas CO deshidrogenasas. El análisis (Tabla 9) demostró la presencia de un solo operón *coxMLSG* de aproximadamente 4,5 kb (posiciones 25.432 a 29.884 del *contig* C357_097, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000085), que presentó una sintenia perfecta con el operón *coxMLSG* de la cepa DSS-3 (Figura 15), que codificaba para la CO deshidrogenasa de tipo II. De hecho, la semejanza de cada una de las CDSs de la cepa 357 con sus homólogos de la cepa DSS-3 fue siempre superior para el tipo II que para el tipo I (Tabla 9), lo que sugiere la presencia en la cepa 357 de únicamente la CO deshidrogenasa de tipo II.

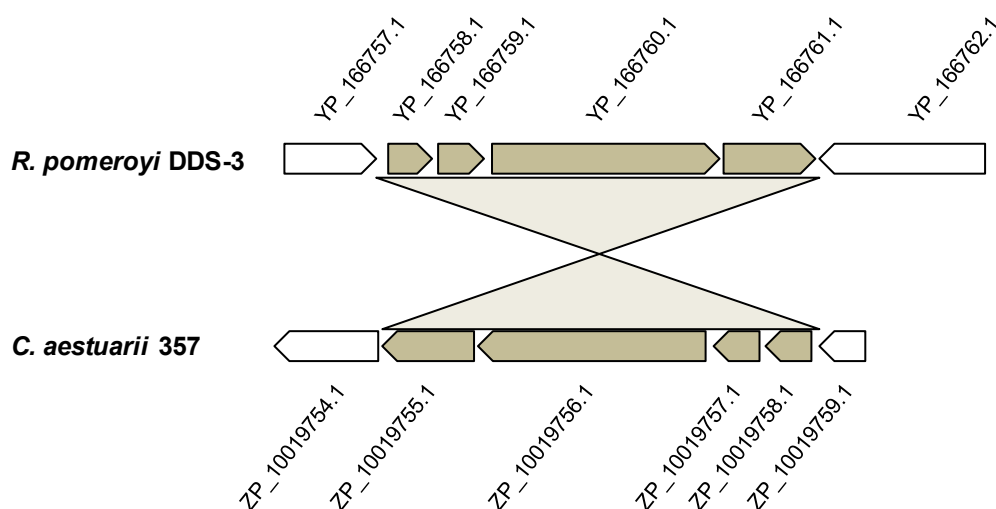


Figura 15. Sintenia entre las agrupaciones génicas que codifican para las proteínas involucradas en la síntesis de la CO deshidrogenasa de tipo II de *C. aestuarii* 357 y *R. pomeroyi* DSS-3.

Tabla 9. Comparativa de las CDSs que codifican para la CO deshidrogenasa de *C. aestuarii* 357 con las de *R. pomeroyi* DSS-3.

<i>C. aestuarii</i> 357 ^a	E-value	Identidad (%)	<i>R. pomeroyi</i> DSS-3 ^a	Proteína
ZP_10019755.1	10^{-20}	28,16	YP_167618.1	CoxM, tipo I
	7×10^{-109}	67,68	YP_166761.1	CoxM, tipo II
ZP_10019756.1	10^{-143}	39,44	YP_167616.1	CoxL, tipo I
	0,0	83,63	YP_166760.1	CoxL, tipo II
ZP_10019757.1	8×10^{-58}	55,63	YP_167617.1	CoxS, tipo I
	4×10^{-84}	69,57	YP_166759.1	CoxS, tipo II
ZP_10019758.1	2×10^{-35}	54,48	YP_167612.1	CoxG, tipo I
	9×10^{-70}	70,72	YP_166758.1	CoxG, tipo II

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

Newton y colaboradores (2010) demostraron también que el único miembro del grupo *Roseobacter* capacitado para utilizar CO como fuente de carbono era *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601, que presentaba una RuBisCO potencialmente funcional, presentando este microorganismo tan sólo la CO deshidrogenasa del tipo II. La búsqueda de determinantes de autotrofia en la cepa 357 dio resultado negativo por lo que podemos concluir que, de expresar una CO deshidrogenasa funcional, la cepa 357 tan sólo podrá utilizar el CO como fuente de energía, y no como fuente de carbono.

2.4.4. Transformación de compuestos de azufre.

Moran y colaboradores (2004) describieron experimentalmente la capacidad de *R. pomeroyi* DSS-3 de utilizar litoheterotróficamente tiosulfato, y pusieron de manifiesto la existencia de dos operones: *soxVSXYZABCD*, que codificaba para componentes de la cadena respiratoria y la sulfito oxidasa terminal; y *soxSR*, que codificaba para dos posibles proteínas reguladoras. Más adelante, Newton y colaboradores (2010) demostraron que esta estructura genética era compartida por una gran cantidad de miembros del grupo *Roseobacter* (23 de 32). Para identificar los genes *sox* en *C. aestuarii* 357 realizamos una comparación mediante BlastP con los genes *sox* de la cepa DSS-3 como referencia. El resultado (Tabla 10) nos indica que la cepa 357 presenta todos los genes *sox*, reguladores incluidos, codificados en una región de aproximadamente 9 kb (posiciones 1.327 a 10.023 del *contig* C357_053, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000042), manteniendo una sintenia perfecta con la cepa DSS-3 y, por extensión, con el resto de cepas del grupo *Roseobacter* que los presentan. Atendiendo a esto, podemos sugerir que la cepa 357 presenta la capacidad de utilizar tiosulfato y sulfito como aceptor final de electrones. De hecho, la capacidad de oxidar tiosulfato a sulfato ha sido demostrada, tal como se ha mencionado anteriormente en la caracterización bioquímica de la cepa 357.

Tabla 10. Comparativa de las CDSs codificadas por los genes *sox* de *C. aestuarii* 357 con las de *R. pomeroyi* DSS-3.

<i>C. aestuarii</i> 357 ^a	Proteína	E-value	Identidad (%)	<i>R. pomeroyi</i> DSS-3 ^a
ZP_10018328.1	SoxD	2 x 10 ⁻¹⁴⁶	67,29	YP_166251.1
ZP_10018329.1	SoxC	0,0	78,95	YP_166250.1
ZP_10018330.1	SoxB	0,0	81,83	YP_166249.1
ZP_10018331.1	SoxA	10 ⁻¹⁴⁰	71,37	YP_166248.1
ZP_10018332.1	SoxZ	10 ⁻⁶⁰	76,15	YP_166247.1
ZP_10018333.1	SoxY	10 ⁻⁵⁹	71,22	YP_166246.1
ZP_10018334.1	SoxX	2 x 10 ⁻⁵⁷	58,45	YP_166245.1
ZP_10018335.1	SoxW	2 x 10 ⁻⁹⁷	68,21	YP_166244.1
ZP_10018336.1	SoxV	2 x 10 ⁻¹⁰⁹	65,57	YP_166243.1
ZP_10018337.1	SoxS	10 ⁻³⁷	57,73	YP_166242.1
ZP_10018338.1	SoxR	4 x 10 ⁻⁶²	77,68	YP_166241.1

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

Adicionalmente a los genes *sox*, la anotación del genoma de la cepa 357 ha revelado una serie de posibles proteínas que podrían estar involucradas en la asimilación de tiosulfato y azufre inorgánico. Así, se ha descrito una posible tiosulfato sulfotransferasa (ZP_10020610.1) que sería el enzima responsable de la transformación del tiosulfato a sulfito y H₂S (LeFaou *et al.*, 1990). El sulfito podría ser atacado por una sulfito oxidasa dependiente de molibdeno, YedYZ (ZP_10019918.1 y ZP_10019918.1), cuyos genes parecen formar un operón (posiciones 39.327 a 40.840 del *contig* C357_107, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000095), rindiendo sulfato (Brokx *et al.*, 2005). Finalmente, el sulfato podría ser atacado por una adenilil-sulfato transferasa (ZP_10021239.1), rindiendo adenililsulfato (APS), vía de entrada del azufre en el metabolismo celular (Hilz y Lipmann, 1955). Adicionalmente a estas enzimas, se han detectado dos posibles transportadores de sulfato, ZP_10020237.1 y ZP_10020570.1, ubicados en regiones distintas del genoma.

Finalmente, indicar que a pesar de que en el grupo *Roseobacter* es característica la capacidad de atacar el osmolito dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Newton *et al.*, 2010), no hemos encontrado ninguna de las vías de degradación de este compuesto en el genoma de la cepa 357. Sin embargo, sí que hemos encontrado un posible operón de aproximadamente 5,2 kb (posiciones 47.812 a 53.014 del *contig* C357_075, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000064) que codificaría para las distintas subunidades de una dimetilsulfóxido (DMSO) reductasa (ZP_10019150.1 a ZP_10019153.1), un enzima que actúa como reductasa terminal, transfiriendo los electrones al DMSO, y que puede actuar sobre un amplio espectro de aceptores de electrones de las familias de los N-óxidos y los sulfóxidos, así como hidroxilamina y clorato (Weiner *et al.* 1988).

2.4.5. Metabolismo del nitrógeno y el fósforo.

En el ecosistema marino, la concentración de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, es un factor limitante para el crecimiento de las poblaciones microbianas. Por este motivo, los microorganismos marinos han desarrollado mecanismos que les permiten ser muy eficientes en la captación de dichos nutrientes. Para evaluar la presencia de genes para estos sistemas de captación de nutrientes en *C. aestuarii* 357 realizamos un análisis de su

genoma utilizando el sistema de anotación automática KAAS del KEGG (Moriya *et al.*, 2007), tal como se ha mencionado en la sección “Materiales y métodos”. En referencia a la captación de nitrógeno, se ha identificado un posible operón de aproximadamente 7 kb (posiciones 57.401 a 63.243 del *contig* C357_029, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000024), *nrtDABC*, cuyas cuatro CDSs (ZP_10018033.1 a ZP_10018036.1) codificarían los péptidos involucrados en un sistema de intrusión de nitrato/nitrito en el citoplasma celular.

El nitrato, ya en el interior del citoplasma, puede ser reducido por acción de una nitrato reductasa para ser utilizado como fuente de nitrógeno (vía asimilatoria) (Luque-Almagro *et al.*, 2011) o como aceptor final de electrones en un proceso de respiración anaeróbica (vía disimilatoria, que si rinde como producto final N₂ recibe el nombre de desnitrificación) (Kraft *et al.*, 2011). Analizando la posibilidad disimilatoria, hemos identificado una posible nitrato reductasa disimilatoria codificada en el operón *narKGHIJ*, de aproximadamente 6.5 kb (posiciones 18.124 a 24.896 del *contig* C357_129, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000113). De este operón, las cuatro últimas CDSs, *narGHIJ*, codificarían para las distintas subunidades estructurales de la nitrato reductasa (ZP_10020340.1 a ZP_1020342.1), mientras que la primera, *narK*, codificaría para una proteína de extrusión de nitrito del citoplasma al periplasma (ZP_10020343.1). Atendiendo a esto, la cepa 357 sería la única de su grupo filogenómico que dispondría de una nitrato reductasa disimilatoria. De hecho, tan solo en tres de los 32 genomas del grupo *Roseobacter* analizados por Newton y colaboradores se identificó la presencia de una nitrato reductasa disimilatoria (Newton *et al.*, 2010).

En cuanto a la asimilación de nitrato, hemos detectado una CDSs cadena abajo de *nrtDABC*, *nasA* (posiciones 67.021 a 69.651 del *contig* C357_029, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000024), que codificaría para una posible nitrato reductasa asimilatoria (ZP_10018040.1). En este sentido, con la cepa 357 serían ya 5 las cepas del grupo filogenómico 3 que presentarían esta capacidad metabólica, ascendiendo a un total de 11 de los 32 genomas analizados por Newton y colaboradores (2010).

Entre el operón *nrtDABC* y el gen *nasA* se encontrarían dos CDSs formando un posible operón, *nirBD* (posiciones 64.260 a 67.021 del *contig* C357_029, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000024), que codificarían para las dos

subunidades de la nitrito reductasa asimilatoria (ZP_10018038.1 y ZP_10018039.1), responsable de la transformación del nitrito a amonio. Es interesante destacar que la nitrito reductasa disimilatoria está presente en 14 de los 32 genomas analizados por Newton y colaboradores (2010). En este sentido, con la cepa 357, serían cinco las cepas de su grupo genómico en presentarla.

En cuanto a la desnitrificación, no hemos detectado ninguna CDS en el genoma de la cepa 357 que codifique para la nitrito reductasa, encargada de transformar el nitrito en óxido nítrico, ni para la óxido nítrico reductasa, que se encargaría de transformar el óxido nítrico a óxido nitroso. Sin embargo, si que hemos encontrado una posible óxido nitroso reductasa, enzima encargado de transformar el óxido nitroso a N_2 . Esta enzima multimérica vendría codificada por un posible operón de casi 8 kb, *nosRZDFYL* (posiciones 12.302 a 20.007 del *contig* C357_074, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000063), cuyos productos génicos constituirían una posible óxido nitroso reductasa activa (ZP_10019070.1 a ZP_10019075.1). Así, la cepa 357 sería la segunda cepa de su grupo genómico, junto a *Roseovarius* sp. 217, en presentarla.

Finalmente, y en el contexto de la metabolización del nitrógeno, hemos detectado la presencia, al igual que sucede en todos los genomas de *Roseobacter* previamente analizados (Newton *et al.*, 2010), de la capacidad de hidrolizar urea. Así, se ha identificado un posible operón de aproximadamente 5 kb, *ureEFABCGD* (posiciones 15.775 a 20.673 del *contig* C357_076, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000065), que codificaría para los péptidos estructurales de la ureasa (UreAB, ZP_10019210.1; UreC, ZP_10019211.1) y sus proteínas auxiliares (UreE, ZP_10019208.1; UreF, ZP_10019209.1; UreG, ZP_10019212.1; y UreD, ZP_10019213.1). Cadena arriba del posible operón *ureEFABCGD* se encontraría una región de aproximadamente 4.5 kb (posiciones 9.572 a 14.124 del *contig* C357_076, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000065) que codificaría para un posible complejo proteico transportador de urea (ZP_10019202.1 a ZP_10019207.1). Desafortunadamente, los resultados experimentales mostrados en el capítulo anterior no confirman la presencia de una ureasa funcional.

En relación al metabolismo del fósforo, la mayor parte de los *Roseobacter* analizados (Newton *et al.*, 2010) presentaron sistemas de transporte y

metabolización de fosfato, de fosfonato, así como sistemas de almacenamiento de polifosfato y una fosfatasa alcalina. En este sentido, *C. aestuarii* 357 no es una excepción. En la Tabla 11 se muestra un listado de las proteínas involucradas en estos procesos que han sido identificadas en la cepa 357, en comparación a las previamente identificadas para *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601 (Newton *et al.*, 2010), un miembro del grupo filogenómico al que pertenece la cepa 357 (Figura 11).

Tabla 11. Comparativa de las CDSs que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo y transporte de fosfatos y fosfonatos de *C. aestuarii* 357 con las de *P. bermudensis* HTCC 2601.

<i>C. aestuarii</i> 357 ^a	Proteína	E-value	Identidad (%)	<i>P. bermudensis</i> HTCC 2601 ^a
ZP_10018085.1	PhoR	0,0	77,63	ZP_01444464.1
ZP_10018090.1	PhoU	2×10^{-150}	85,05	ZP_01444470.1
ZP_10018091.1	PhoB	2×10^{-156}	94,00	ZP_01444471.1
ZP_10018086.1	PstS	0,0	88,15	ZP_01444466.1
ZP_10018087.1	PstC	0,0	82,22	ZP_01444467.1
ZP_10018088.1	PstA	0,0	83,21	ZP_01444468.1
ZP_10018089.1	PstB	0,0	91,73	ZP_01444469.1
ZP_10018601.1	PpK	0,0	88,02	ZP_01443268.1
ZP_10018812.1	PhnD2	2×10^{-179}	88,76	ZP_01446249.1
ZP_10021564.1	PhnE2	0,0	82,40	ZP_01445305.1
ZP_10021565.1	PhnE1	2×10^{-166}	81,33	ZP_01445306.1
ZP_10021566.1	PhnD1	0,0	89,80	ZP_01445307.1
ZP_10021567.1	PhnC	6×10^{-178}	88,78	ZP_01445308.1
ZP_10021551.1	PhnM	0,0	80,03	ZP_01445292.1
ZP_10021553.1	PhnN	8×10^{-60}	63,12	ZP_01445294.1
ZP_10021554.1	PhnL	6×10^{-127}	81,28	ZP_01445295.1
ZP_10021555.1	PhnK	9×10^{-169}	91,07	ZP_01445296.1
ZP_10021556.1	PhnJ	0,0	89,05	ZP_01445297.1
ZP_10021558.1	PhnI	0,0	87,93	ZP_01445298.1
ZP_10021559.1	PhnH	2×10^{-93}	72,46	ZP_01445299.1
ZP_10021560.1	PhnG	5×10^{-50}	77,17	ZP_01445300.1
ZP_10021989.1	PitA	0,0	83,06	ZP_01443238.1
ZP_10020264.1	PhoA	0,0	79,63	ZP_01443823.1

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

La mayor parte de estas proteínas se hallan codificadas en dos agrupaciones génicas. Así, encontramos una primera región de aproximadamente 7,5 kb (posiciones 8.779 a 16.357 del *contig* C357_032, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000027) que codificaría para 7 proteínas involucradas en el

transporte de fosfato (ZP_10018085.1 a ZP_10018091.1). Es de destacar la presencia entre ellas de un sensor de fosfato de alta afinidad (PhoR, ZP_10018085.1) cuya función vendría complementada por otro sensor de fosfato de baja afinidad (PitA, ZP_10021989.1) ubicado en otra región del genoma. La segunda región génica antes comentada tiene un tamaño aproximado de 15 kb (posiciones 138.878 a 153.278 del *contig* C357_208, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000149) y codifica para 17 posibles proteínas, estando 12 de ellas directamente relacionadas con el transporte y metabolismo de fosfonato (productos génicos de *phnM*, ZP_10021551.1; *phnNLKJ*, ZP_10021553.1 a ZP_10021556.1; *phnGHI*, ZP_10021558.1 a ZP_10021560.1; y *phnCD1E1E2*, ZP_10021564.1 a ZP_10021567.1). Al igual que para el transporte de fosfato, otra posible proteína relacionadas con el metabolismo del fosfonato ha sido identificada en una región distante del genoma (PhnD2, ZP_10018812.1). Finalmente, y en relación al fósforo, mencionar que se ha identificado una polifosfato quinasa (PpK, ZP10018601.1), enzima involucrado en el almacenamiento de polifosfato a partir de ATP (Brown *et al.*, 2008), así como una fosfatasa alcalina (PhoA, ZP_10020264.1).

2.4.6. Síntesis de vitaminas.

Las vitaminas sintetizadas por los miembros del grupo *Roseobacter* no son tan sólo esenciales para ellos mismos, sino que también son esenciales para la vida de otros microorganismos marinos eucariotas, con los que pueden mantener relaciones de simbiosis. Un ejemplo de ello es *Dinoroseobacter shibae* DFL12, que puede establecer una simbiosis con el dinoflagelado *Prorocentrum lima*, proporcionándole tiamina (vitamina B1) y cobalamina (vitamina B12) (Biebl *et al.*, 2005; Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Por este motivo Newton y colaboradores (2010) lo consideraron un aspecto relevante a analizar en los genomas del grupo *Roseobacter*, describiendo la presencia de la vía biosintética aeróbica de la cobalamina en la totalidad de los mismos, la vía biosintética de la tiamina en 22 de los 32 genomas analizados (68 %), y la vía biosintética de la biotina (vitamina B7 o vitamina H) en tan sólo 6 de los 8 miembros analizados del grupo filogenómico 1. En este sentido, es interesante destacar el hecho que los miembros del grupo *Roseobacter* que carecían de la

vía de biosíntesis de la biotina presentaban los genes necesarios para su captación del exterior. El análisis genómico que hemos realizado, utilizando como referencia los genes involucrados en la biosíntesis de la cobalamina y la tiamina de *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601, ha demostrado la existencia en la cepa 357 de ambas vías de biosíntesis (Tabla 12).

Tabla 12. Comparativa de las CDSs que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis de vitaminas (cobalamina y tiamina) de *Citricella aestuarii* 357 con las de *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601.

<i>C. aestuarii</i> 357 ^a	Proteína	E-value	Identidad (%)	<i>P. bermudensis</i> HTCC 2601 ^a
Síntesis de cobalamina (Vitamina B12)				
ZP_10019347.1	CobL	2 x 10 ⁻¹⁴⁷	65	ZP_01442600.1
ZP_10019349.1	CobM	3 x 10 ⁻¹⁴⁸	82	ZP_01442602.1
ZP_10019350.1	CobB	0,0	80	ZP_01442603.1
ZP_10019351.1	CobA	2 x 10 ⁻¹¹⁰	76	ZP_01442604.1
ZP_10019353.1	CobF	2 x 10 ⁻⁹⁹	64	ZP_01442605.1
ZP_10019710.1	CobN	0,0	73	ZP_01442594.1
ZP_10019767.1	CobH	3 x 10 ⁻⁹³	80	ZP_01442596.1
ZP_10019768.1	CobI	2 x 10 ⁻¹³¹	71	ZP_01442597.1
ZP_10019769.1	CobG	7 x 10 ⁻¹³³	79	ZP_01442598.1
ZP_10019770.1	CobK	2 x 10 ⁻⁴⁰	62	ZP_01442599.1
ZP_10019882.1	CobD	10 ⁻¹²⁵	68	ZP_01442998.1
ZP_10020566.1	CobQ	0,0	81	ZP_01443079.1
ZP_10021283.1	CobW	0,0	83	ZP_01442593.1
Síntesis de tiamina (Vitamina B1)				
ZP_10019375.1	ThiC	0,0	90	ZP_01446205.1
ZP_10019376.1	ThiS	3 x 10 ⁻²⁵	65	ZP_01446203.1
ZP_10019377.1	ThiG	3 x 10 ⁻¹⁵²	83	ZP_01446202.1
ZP_10019378.1	ThiE	2 x 10 ⁻⁹¹	71	ZP_01446201.1

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

Es interesante mencionar que las CDSs involucradas en la biosíntesis de la tiamina (ZP_10019375.1 a ZP_10019378.1) parecen estar agrupadas en un solo operón de aproximadamente 5,3 kb, *thiCSGE* (posiciones 27.955 a 32.202 del *contig* C357_082, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000071), mientras que las involucradas en la biosíntesis de la cobalamina parecen estar distribuidas en 6 regiones distintas del genoma. Así, hemos encontrado 4 CDSs que parecen formar operones monogénicos (*cobN*, ZP_10019710.1; *cobD*, ZP_10019882.1; *cobQ*, ZP_10020566.1; y *cobW*, ZP_10021283.1), y otras 9 CDSs que se agrupan en dos posibles operones poligénicos: *cobLMBAF*

(posiciones 1 a 5.982 del *contig* C357_082, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000071) y *cobHIGK* (posiciones 1 a 2.381 del *contig* C357_099, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000087).

En cuanto a la biosíntesis de la biotina, la cepa 357 ha resultado ser una excepción a su grupo ya que además de codificar para el transportador necesario para capturar dicha vitamina (BioY, ZP_10020372.1) (Fisher *et al.*, 2012), presenta la biotina sintetasa (BioA, ZP_10020373.1), enzima clave para la biosíntesis de la biotina (Lotierzo *et al.*, 2005). Es interesante destacar el hecho de que a pesar de ser funciones antagónicas, ambas proteínas parecen estar codificadas en un mismo operón de aproximadamente 2 kb: *bioYA* (posiciones 12.237 a 14.152 del *contig* C357_131, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000115).

2.4.7. Producción de metabolitos secundarios: antibióticos, NRP y AHL.

La producción de metabolitos secundarios excretables, tanto para la comunicación entre individuos (homoserinlactonas aciladas o AHL, implicadas en *quorum sensing*), como para competir con otros microorganismos por el nicho ecológico (antibióticos y NRP –péptidos no ribosomales–) son mecanismos ecológicamente relevantes presentes en miembros del grupo *Roseobacter* que muy probablemente han permitido, sino facilitado, su éxito ecológico en el ecosistema marino (Wagner-Döbler y Biebl, 2006). Por este motivo, Newton y colaboradores (2010) los incluyeron como elementos de especial relevancia en su análisis genómico. En relación a la producción de antibióticos, se sabe que el grupo *Roseobacter* es productor de al menos tres tipos distintos: triptantrina (Wagner-Döbler *et al.* 2004), tiotropocina (Brinkhoff *et al.*, 2004) y ácido tropoditiético (Berger *et al.*, 2012). Sin embargo, tan sólo 3 de los 32 genomas analizados por Newton y colaboradores (2010) presentaban genes de biosíntesis para estos antibióticos. En este sentido, el análisis realizado para la cepa 357 también resultó negativo. Tan sólo mencionar que se identificó una proteína (ZP_10018499.1), anotada como monooxigenasa de biosíntesis de antibióticos, que presentaba similitud con la familia proteica Pfam03992, en la que se encuentran muchas monooxigenasas de cepas del género *Streptomyces* involucradas en la biosíntesis de antibióticos. Un análisis con Blast (resultado no mostrado) sugiere que esta proteína, o proteínas

homólogas a ésta, parecen estar presentes en muchos de los genomas de *Roseobacter* disponibles en la base de datos. A pesar de ello, no se disponen de evidencias experimentales que sugieran, más allá de la semejanza proteica, el papel de esta proteína en la biosíntesis de antibióticos.

Los péptidos no ribosomales (NRP), tal como indica su nombre, son péptidos que no han sido sintetizados por los ribosomas. Son una familia muy diversa de metabolitos secundarios que presentan un amplio rango de actividades biológicas y propiedades farmacológicas de interés comercial. Tienen diferentes funciones tales como toxinas, sideróforos, pigmentos, antibióticos, citoestáticos e inmunopresores (Schwarzer *et al.* 2003). El responsable de su síntesis es la sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS), que actúa junto a una poliquétido sintasa auxiliar (PKS) (Schwarzer *et al.*, 2003). En relación a los péptidos no ribosomales (NRPs), Martens y colaboradores (2007) ya identificaron la presencia de sintasas específicas para la síntesis de dichos péptidos (NRPs) y poliquétido sintasas (PKS) auxiliares en 8 cepas del grupo *Roseobacter* de las 22 cepas analizadas, utilizando amplificación mediante PCR con cebadores degenerados diseñados sobre dominios conservados. Posteriormente, Newton y colaboradores (2010) describieron la presencia de estas enzimas en 15 de los 32 genomas del grupo *Roseobacter* analizados. Es interesante destacar que 5 de los 7 genomas analizados del grupo filogenómico 3 al que pertenece *C. aestuarii* 357 presentaban los genes necesarios para su síntesis. El análisis de la presencia de genes para NRPs y PKS (Tabla 13), utilizando a *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601 como cepa de referencia, reveló la existencia de un posible operón de aproximadamente 12.5 kb (posiciones 15.786 a 28.471 del *contig* C357_075, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000064) que codificaba para 4 CDSs con una sintenia perfecta con sus homólogas de *P. bermudensis* HTCC 2601: PKS, ZP_10019130.1; gt – glicosil transferasa–, ZP_10019131.1; NRPS, ZP_10019132.1; y PptA – fosfopanteteinil transferasa–, ZP_10019133.1).

Tabla 13. Comparativa de las CDSs que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis péptidos no ribosomales de *C. aestuarii* 357 con las de *P. bermudensis* HTCC 2601.

<i>C. aestuarii</i> 357 ^a	Proteína	E-value	Identidad (%)	<i>P. bermudensis</i> HTCC 2601 ^a
ZP_10019130.1	PKS	0,0	80,07	ZP_01444322.1
ZP_10019131.1	gt	0,0	81,46	ZP_01444323.1
ZP_10019132.1	NRPS	0,0	76,28	ZP_01444324.1
ZP_10019133.1	PptA	4 x 10 ⁻⁶⁵	57,93	ZP_01444325.1

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

Brinkhoff y colaboradores (2004) descubrieron que la síntesis del antibiótico tiotropocina por *Phaeobacter gallaeciensis* se correlacionaba con la densidad celular, lo que indicaba una regulación por *quorum sensing*. Así, se identificó una homoserina lactona acilada (AHL) en los sobrenadantes del cultivo de esta bacteria (Bruhn *et al.*, 2005). De hecho, esta acumulación de AHL se ha detectado en un gran número de miembros del grupo *Roseobacter* (Wagner-Döbler *et al.*, 2005), siendo uno de ellos *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. En esta cepa se detectó por primera vez en el grupo *Roseobacter* la presencia de dos proteínas funcionales involucradas en respuesta por *quorum sensing*: LuxI, la N-acyl-L-homoserina lactona sintetasa; y LuxR, su regulador transcripcional (Moran *et al.*, 2004). Ya más adelante, Newton y colaboradores (2010) determinaron la presencia del mecanismo de *quorum sensing* en 16 de los 32 genomas del grupo *Roseobacter* que analizaron. Para identificar la presencia del tándem LuxI/LuxR en la cepa 357 realizamos una comparación con *R. pomeroyi* DSS-3. De este modo encontramos un posible operón de 2.5 kb, *luxRI* (posiciones 45.036 a 46.592 del *contig* C357_089, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000077), que codificaba para ambas proteínas (LuxI, ZP_10019513.1, 62,7 % de identidad –E-value de 6 x 10⁻⁹¹– con YP_165635.1 de *R. pomeroyi* DSS-3; LuxR, ZP_10019514.1, 65,3 % de identidad –E-value de 10⁻¹¹⁷– con YP_165634.1 de *R. pomeroyii* DSS-3), lo que sugiere la presencia de un sistema LuxI/LuxR de *quorum sensing* en *C. aestuarii* 357.

2.4.8 Motilidad y adhesión a superficies.

La motilidad y el comportamiento quimiotáctico es uno de los factores que determinan la habilidad de las células del grupo *Roseobacter* para colonizar un ambiente heterogéneo (Moran *et al.*, 2007). La motilidad de diferentes

miembros del grupo ha sido anteriormente demostrada (Moran *et al.*, 2007), estando presentes los genes estructurales del flagelo en 22 de los 32 genomas del grupo *Rosebacter* analizados (Newton *et al.*, 2010). Tal como hemos visto anteriormente (Figura 10), *C. aestuarii* 357 presenta una flagelación polar monotrica, por lo que debería presentar los genes estructurales del flagelo codificados en su genoma. Para evaluar esto decidimos utilizar el sistema de anotación automática KAAS del KEGG (Moriya *et al.*, 2007), siguiendo las pautas que se han mencionado en la sección “Materiales y métodos”. Como se puede ver en la Figura 16 y en la Tabla Suplementaria S8, tal como se esperaba, la cepa 357 presentó codificado en su genoma todas las proteínas necesarias para la maquinaria flagelar.

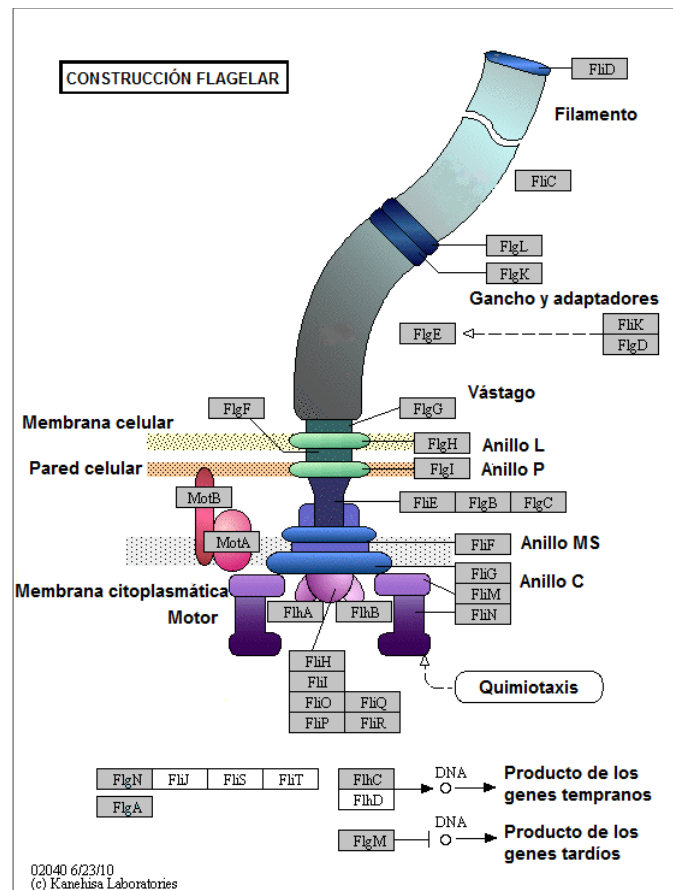


Figura 16. Maquinaria flagelar de *C. aestuarii* 357. Las proteínas ubicadas en cajas grises son las identificadas en el genoma de la cepa 357. En la Tabla Suplementaria S8 se puede consultar el número de acceso de la misma en la base de datos RefSeq del NCBI, así como el producto asignado atendiendo al sistema automático de anotación del NCBI. Esquema modificado de KAAS de KEGG.

En referencia al comportamiento quimiotáctico en bacterias del grupo *Roseobacter*, la primera evidencia se obtuvo con *Ruegeria* sp. TM1040, que presentaba quimiotaxis hacia el DMSP y varios aminoácidos (Miller *et al.*, 2004). La secuenciación de su genoma reveló la presencia de toda la maquinaria de transducción de señales involucrada en el comportamiento quimiotáctico (genes *che*) así como un elevado número de receptores quimiotácticos (MCPs, proteínas quimiotácticas receptoras de metilo) (Moran *et al.*, 2007). Al extender el análisis a 32 genomas, Newton y colaboradores (2010) revelaron la presencia de los genes involucrados en el comportamiento quimiotáctico en el 50% de las cepas estudiadas. La estrategia para determinar la presencia de dichos genes en *C. aestuarii* 357 fue la misma que para los genes estructurales del flagelo. El análisis sugiere que la cepa 357 puede presentar un comportamiento quimiotáctico ya que presenta la mayoría de las proteínas Che y, al menos, 6 MCPs (Figura 17 y Tabla Suplementaria S8).

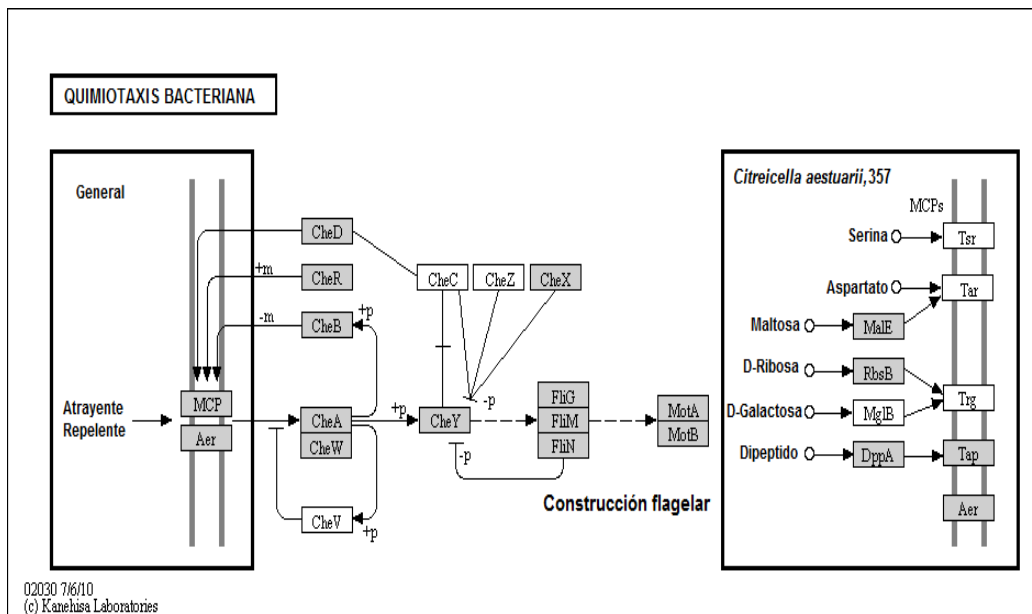


Figura 17. Maquinaria quimiotáctica de *C. aestuarii* 357. Las proteínas ubicadas en cajas grises son las identificadas en el genoma de la cepa 357. En la Tabla Suplementaria S8 se puede consultar el número de acceso de la misma en la base de datos RefSeq del NCBI, así como el producto asignado atendiendo al sistema automático de anotación del NCBI. Esquema modificado de KAAS de KEGG.

Por otra parte, los primeros análisis genómicos del grupo *Roseobacter* revelaron la presencia de genes involucrados en la secreción de metabolitos y ADN, sugiriéndose un papel importante en el establecimiento de relaciones

entre los miembros del grupo *Roseobacter* y el resto de individuos pertenecientes al ecosistema marino, principalmente con el fitoplancton (Moran *et al.*, 2007). El análisis exhaustivo de genomas realizado por Newton y colaboradores (2010) reveló la presencia de uno de estos sistemas de secreción, el sistema de secreción de tipo IV, en casi todas las cepas analizadas. Para abordar el análisis del genoma de la cepa 357 utilizamos el sistema de anotación automático KAAS del KEGG (Moriya *et al.*, 2007). Los resultados del análisis se muestran en la Figura 18 y en la Tabla Suplementaria S8.

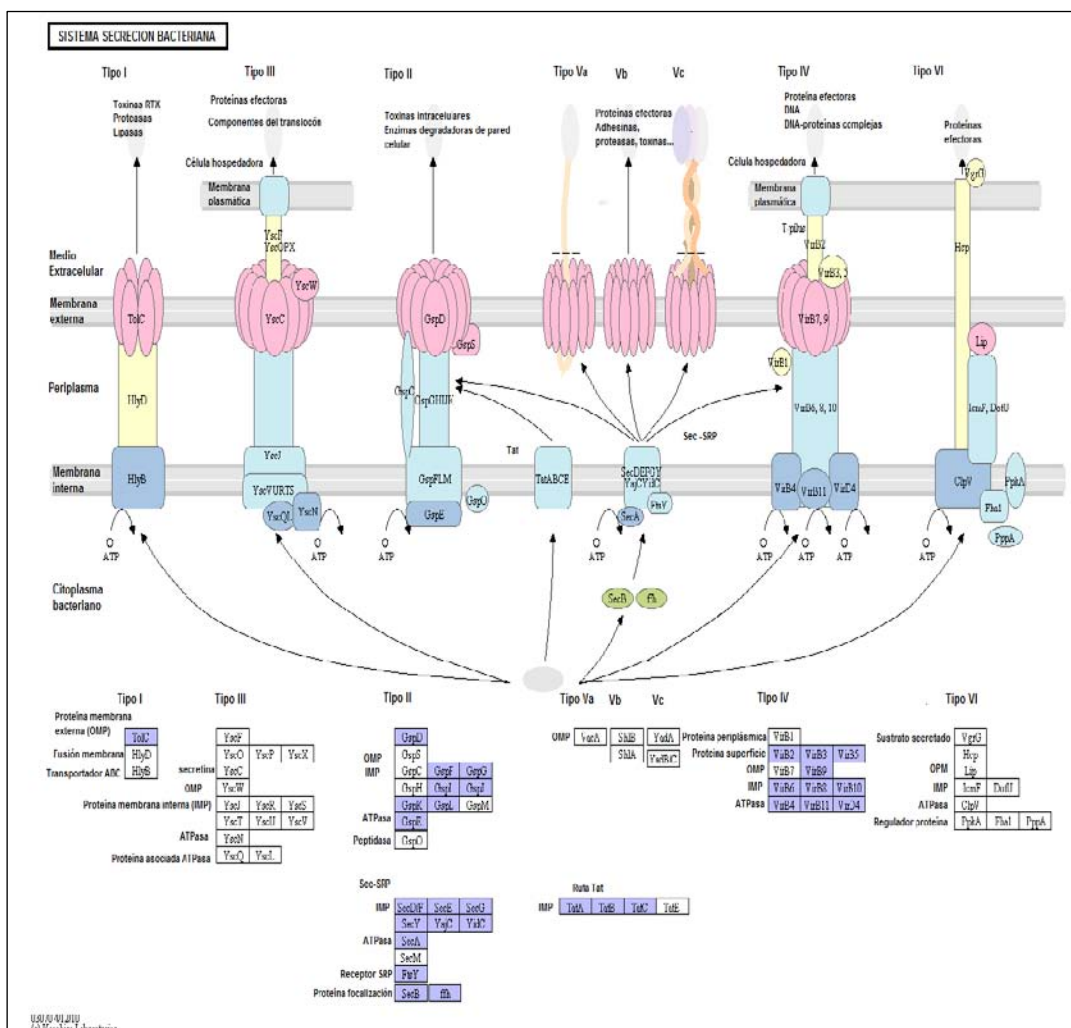


Figura 18. Sistemas de secreción de *C. aestuarii* 357. Las proteínas ubicadas en cajas grises son las identificadas en el genoma de la cepa 357. En la tabla suplementaria S8 se puede consultar el número de acceso de la misma en la base de datos RefSeq del NCBI, así como el producto asignado atendiendo al sistema automático de anotación del NCBI. Esquema modificado de KAAS de KEGG.

Tal como podemos observar, y al igual que sucede en la mayor parte de bacterias gram-negativas (Pugsley, 1993), *C. aestuarii* 357 presenta el sistema general de secreción (vía Sec-SRP) que permite la exportación de proteínas y otras macromoléculas del citoplasma al periplasma. Adicionalmente, la cepa 357 dispone de TolC, la proteína de membrana externa del sistema de secreción de tipo I, involucrado, entre otros procesos, en la extrusión de proteasas, lipasas y toxinas al exterior celular (Holland *et al.*, 2005). En este sentido, es interesante destacar que se ha anotado una posible toxina RTX en el genoma de la cepa 357 (ZP_10021070), que podría tener su vía de secreción a través de la porina TolC. La existencia de este tipo de toxinas en miembros del grupo *Roseobacter* es bastante común, habiéndose descrito su liberación al medio de cultivo por varios miembros del grupo (Christie-Oleza *et al.*, 2010; 2012). Sorprendentemente, en el genoma de la cepa 357 se han encontrado codificados la mayor parte de los péptidos que constituyen el sistema de secreción de tipo II, utilizado principalmente por patógenos para la liberación de toxinas intracelulares y enzimas degradadoras de pared celular (Ayers *et al.*, 2010; Korotkov *et al.*, 2012). Finalmente, y al igual que el 50% de los genomas analizados por Newton y colaboradores (2010), la cepa 357 presenta los determinantes genéticos del sistema de secreción de tipo IV, involucrado en la extrusión de proteínas efectoras al exterior de la célula, procedentes tanto del citoplasma como del periplasma, así como en la transferencia de ADN al exterior celular (Hayes *et al.*, 2010). En relación a este último aspecto indicar que la cepa 357, al igual que casi todas las cepas analizadas (30 de 32) por Newton y colaboradores (2010) presenta codificado en su genoma las CDSs necesarias para la síntesis del pili de tipo IV (Tabla Suplementaria S8), involucrado en la transferencia directa de ADN entre células (Ayers *et al.*, 2010). Así, se han identificado las 6 proteínas necesarias para fabricar dicho pili (ZP_10021851.1 a ZP_10021854.1, ZP_10021856.1 y ZP_10021857.1) codificadas junto a OmpA (ZP_10021855.1) en un posible operón de aproximadamente 8.3 kb, *cpaBCompAcpaEFtadBC* (posiciones 116.227 a 124.529 del *contig* C357_263, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000164). Esta agrupación génica presenta una fuerte sintenia con

la de sus homólogos en los genomas de los miembros del grupo *Roseobacter* analizados hasta la fecha (Slightom y Buchan, 2009).

2.4.9. Estrategia trófica: fotoheterotrofia, autotrofia y heterotrofia.

Independientemente de las capacidades quimiolitoheterotróficas de las cepas analizadas (ver apartados 4.2, 4.3 y 4.4 del presente capítulo), Newton y colaboradores (2010) agruparon a las 32 cepas del grupo *Roseobacter* cuyos genomas analizaron en tres grandes grupos: fotoheterótrofos (10 cepas que presentaban en su genoma los genes *puf* y, por tanto, eran capaces de obtener energía mediante fototrofia anoxigénica aeróbica; junto a 3 cepas capaces de sintetizar rodopsinas), autótrofos (1 cepa capaz de fijar CO₂ gracias a la presencia en su genoma de los determinantes genéticos para producir una RuBisCO funcional) y heterótrofos (18 cepas carentes de los genes *puf*, e incapaces de sintetizar rodopsinas y RuBisCO). Para clarificar a que grupo pertenecía *C. aestuarii* 357 se utilizó el sistema de anotación automática KAAS del KEGG (Moriya *et al.*, 2007), tal como se ha mencionado anteriormente. El resultado nos mostró la ausencia de genes *puf*, de genes de síntesis de rodopsinas, y de genes para la síntesis de RuBisCO. Por este motivo consideraremos a *C. aestuarii* 357 como un heterótrofo. De hecho, y como era de esperar, el análisis genómico reveló la presencia del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) completo (Figura Suplementaria S1, Tabla Suplementaria S9), la mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos a través de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas –Glucólisis– (Figura Suplementaria S2, Tabla Suplementaria S9), así como la práctica totalidad de las proteínas de la ruta de las pentosas fosfato y la ruta Entner-Doudoroff (Figura Suplementaria S3, Tabla Suplementaria S9). En la Tabla 14 se muestra un resumen de las capacidades metabólicas de aprovechamiento de hidratos de carbono identificadas por análisis genómico, así como el resultado obtenido al evaluar el crecimiento de la cepa 357 a expensas de ellas utilizando MMY en placa. Como podemos observar, en la mayor parte de los casos la capacidad metabólica predicha por análisis genómico pudo ser corroborada en los experimentos de crecimiento en placa. Las excepciones fueron tres: la incapacidad de crecer en presencia de lactosa, y la capacidad de

crecer a expensas de lactato y de sorbitol, no habiéndose sido predichas estas dos últimas capacidades metabólicas en el análisis genómico.

Tabla 14. Evaluación del crecimiento a expensas de diferentes fuentes de carbono y energía (0,2% p/v) para *C. aestuarii* 357 y predicción de la utilización de dichos compuestos a partir del análisis genómico realizado.

Fuente de Carbono	Crecimiento experimental	Predicción genómica
Acetato sódico	Positivo	Presente
Acetato amónico	Positivo	Presente
Acetato potásico	Positivo	Presente
Succinato sódico	Positivo	Presente
Piruvato sódico	Positivo	Presente
Citrato sódico	Positivo	Presente
Lactato cálcico	Positivo	Ausente
Lactosa	Negativo	Presente
Malato	positivo	Presente
Sacarosa	Positivo	Presente
D(-) Sorbitol	Positivo	Ausente
D(-) Fructosa	Positivo	Presente
D(+) Manosa	Positivo	Presente
D(+) Glucosa	Positivo	Presente
D(-) Ribosa.	Positivo	Presente
D(-) Xilosa	Positivo	Presente

3. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POR *Citricella aestuarii* 357

3.1. Potencial degradador de hidrocarburos de *Citricella aestuarii* 357.

3.1.1. Vías centrales de degradación: gentisato y homogentisato.

Los análisis genómicos realizados hasta la fecha han revelado que los miembros del grupo *Roseobacter* pueden presentar hasta 6 rutas catabólicas distintas para compuestos monoaromáticos: vía del benzoil-CoA, vía del fenilacetato, vía del homoprotocatecuato, vía del homogentisato, vía del gentisato y vía del beta-cetoadipato (Moran *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2010; Buchan y González, 2010). En este sentido, 27 de los 32 genomas del grupo *Roseobacter* analizados por Newton y colaboradores (2010) presentaban al menos una de estas vías degradativas, aunque tan sólo tres de ellos (*Ruegeria pomeroyi* DSS-3, *Jannaschia* sp. CCS1 y *Sagittula stellata* E-37) presentaban todos los determinantes génicos de las seis vías degradativas (Moran *et al.*, 2007). Estas tres cepas fueron las que utilizamos como referencia para determinar la presencia de dichas vías en *C. aestuarii* 357.

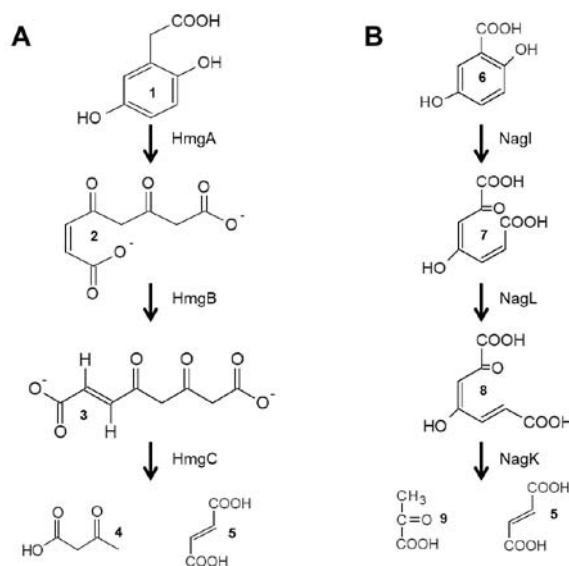


Figura 19. Predicción de las vías de degradación de homogentisato (A) y gentisato (B) en *C. aestuarii* 357. Enzimas: HmgA, homogentisato 1,2-dioxigenasa (ZP_10019356.1); HmgB, fumarilacetoacetato hidrolasa (ZP_10019357.1); HmgC, maleilacetoacetato isomerasa (ZP_10019361.1); NagI, gentisato 1,2-dioxigenasa (ZP_10020728.1); NagL, maleilpiruvato isomerasa (ZP_10020718.1); NagK, fumarilpiruvato hidrolasa (ZP_10020717.1). Compuestos: 1, homogentisato; 2, 4-maleilacetoacetato; 3, 4-fumarilacetoacetato; 4, acetoacetato; 5, fumarato; 6, gentisato; 7, 3-maleilpiruvato; 8, 3-fumarilpiruvato; 9, piruvato.

El análisis genómico reveló que sólo 2 de las 6 vías (vías del homogentisato y del gentisato) presentaban sus determinantes codificados en el genoma de la cepa 357 (Figura 19). Así, las tres proteínas involucradas en la degradación de homogentisato (ZP_10019356.1, homogentisato 1,2-dioxigenasa; ZP_10019357.1, fumarilacetoacetato hidrolasa; y ZP_10019361.1, maleilacetoacetato isomerasa) parecen estar codificadas en un posible operón de 5 CDSs de aproximadamente 5,8 kb (posiciones 7.142 a 13.327 del *contig* C357_082, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000071). Es interesante destacar que tanto las enzimas encargadas de la transformación del homogentisato como las dos proteínas acompañantes (ZP_10019358, beta-lactamasa; y ZP_10019359, oxidoreductasa FAD-dependiente) están conservadas, tanto en secuencia como en ubicación genómica, en las tres cepas de referencia utilizadas (Tabla 15), lo que sugiere una relevancia funcional para todas ellas.

Tabla 15. Análisis de semejanza con BlastP entre las posibles enzimas de la vía degradativa del homogentisato de *C. aestuarii* 357 y las presentes en las cepas de referencia.

Cepa de referencia	RefSeq	Identidad (%)	E-value
ZP_10019356.1, HmgA (homogentisato 1,2-dioxigenasa)			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_165941.1	85,45	0,0
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_509381.1	83,64	0,0
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01745241.1	82,27	0,0
ZP_10019357.1, HmgB (fumarilacetoacetato hidrolasa)			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_165940.1	62,08	6×10^{-171}
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_509378.1	64,58	0,0
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01745242.1	68,45	0,0
ZP_10019358.1, posible beta-lactamasa			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_165938.1	80,95	0,0
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_509377.1	77,46	0,0
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01745244.1	86,03	0,0
ZP_10019359.1, oxidoreductasa dependiente de FAD			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_165937.1	48,80	10^{-164}
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_509374.1	47,01	2×10^{-139}
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01745246.1	47,93	5×10^{-160}
ZP_10019360.1, proteína hipotética			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_165936.1	65,31	8×10^{-14}
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_509373.1	50,00	2×10^{-8}
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01745247.1	57,45	6×10^{-12}
ZP_10019361.1, HmgC (maleilacetoacetato isomerasa)			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_165934.1	58,71	7×10^{-77}
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_509379.1	53,30	2×10^{-53}
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01747917.1	38,92	2×10^{-27}

Un análisis detallado de la proteína ZP_10019359.1 ha revelado un grado de homología considerable (50,45% de identidad, E-value de 2×10^{-168}) con una posible 4-hidroxifenilacetato 1-monooxigenasa de *Ralstonia solanacearum* UW551 (ZP_00944380.1). Esta enzima, de ser funcional, sería la responsable de la transformación de 4-hidroxifenilacetato a homogentisato y, por tanto, explicaría el crecimiento de la cepa 357 en placas de MMY suplementadas con 4-hidroxifenilacetato mencionado anteriormente en la caracterización bioquímica de la cepa.

En cuanto a la vía degradativa del gentisato, las tres proteínas involucradas en la misma (ZP_10020717.1, fumarilpiruvato hidrolasa; ZP_10020718.1, maleilpiruvato isomerasa; y ZP_10020728.1, gentisato 1,2-dioxigenasa) (Tabla 15) parecen estar codificadas en dos regiones distintas del genoma pero próximas entre sí, separadas únicamente por aproximadamente 9 kb (*nagKL* y *nagl*, posiciones 8.748 a 9.979 y 19.199 a 20.251, respectivamente, del *contig* C357_151, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000121). Es interesante mencionar que, a diferencia de la sintenia conservada observada para los genes de la vía del homogentisato, no existe sintenia entre los genes de la vía del gentisato en las cepas analizadas (Tabla 16), lo que puede sugerir orígenes distintos.

Tabla 16. Análisis de semejanza con BlastP entre las posibles enzimas de la vía degradativa del gentisato de *C. aestuarii* 357 y las presentes en las cepas de referencia.

Cepa de referencia	RefSeq	Identidad (%)	E-value
ZP_10020717.1, NagK (fumarilpiruvato hidrolasa)			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_168885.1	46,45	8×10^{-49}
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_510851.1	61,38	4×10^{-79}
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01748614.1	61,26	8×10^{-86}
ZP_10020718.1, NagL (maleilpiruvato isomerasa)			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_165934.1	46,38	5×10^{-58}
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_509379.1	47,69	3×10^{-57}
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01747917.1	43,81	2×10^{-41}
ZP_10020728.1; NagI (gentisato 1,2-dioxigenasa)			
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_168884.1	36,94	6×10^{-64}
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	YP_164947.1	34,90	3×10^{-63}
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	YP_510852.1	34,28	2×10^{-54}
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01747621.1	34,31	9×10^{-63}
<i>Sagittula stellata</i> E-37	ZP_01747685.1	33,24	2×10^{-50}

3.1.2. Vías periféricas de degradación: naftaleno y dibenzotiofeno.

Dada la divergencia observada en la sintenia de las vías centrales de degradación del genticato, decidimos analizar cuáles eran los genes que flanqueaban a *nahKL* y *nagl* en *C. aestuarii* 357. Por este motivo realizamos una búsqueda mediante BlastP de proteínas homólogas a las 27 proteínas codificadas en el *contig* C357_151, de 28.085 pb, en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI. Como se puede observar en la Tabla Suplementaria S10, la mitad de las proteínas codificadas en dicha región del genoma presentaron su mejor homólogo codificado en el genoma de *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1^T (Cai *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011), un miembro de la familia *Rhodobacteraceae* degradador de petróleo que fue aislado de un suelo contaminado de las salinas Shengli Oilfield (China). Además, la sintenia presentada entre las regiones genómicas de ambos microorganismos era bastante buena (Figura 20), estando conservadas 21 de las CDSs identificadas (Tabla Suplementaria S11).

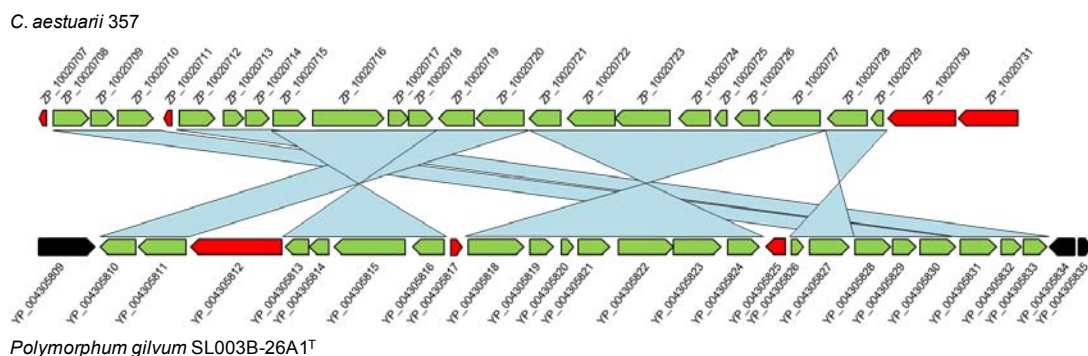


Figura 20. Comparación genómica entre el *contig* C357_151 de *C. aestuarii* 357 y la región genómica de *P. gilvum* SL003B-26A1^T comprendida entre las posiciones 4.390.194 y 4.417.140 (NC_01529). En verde se representan las CDSs conservadas entre ellos. Los datos sobre su grado de homología pueden consultarse en la tabla suplementaria S11. En rojo se representan las CDSs no conservadas entre ambas regiones. En negro se representan las posibles CDSs identificadas como transposasas.

Es interesante destacar que la región conservada en *P. gilvum* SL003B-26A1^T está flanqueada por dos CDSs que codifican para transposasas (YP_004305809.1, que se afiliaría a la familia IS4; y YP_004305835.1, perteneciente a la familia IS66), lo que sugiere una posible adquisición por transferencia genética horizontal. En cambio, no se han encontrado homólogos para ambas transposasas en el genoma de la cepa 357, por lo que no

podemos afirmar que estas secuencias de inserción (IS4 e IS66) estén involucradas en la transferencia genética. Sin embargo, hay que recordar la presencia en el genoma de *C. aestuarii* 357 de un GTA. De hecho, de las 17 proteínas estructurales definidas previamente en *Rhodobacter capsulatus* B10 como pertenecientes al GTA (Lang y Beatty, 2000) y detectadas en el genoma de la cepa 357 (Tabla Suplementaria S6), 13 han podido ser detectadas en una región de 14,4 kb del genoma de *P. gilvum* SL003B-26A1^T (YP_004304646.1 a YP_004304659.1, posiciones 3.147.136 a 3.161.452 del genoma, número de acceso del NCBI NC_015259) (Tabla Suplementaria S12), lo que sugiere un posible proceso de transferencia horizontal entre estas cepas mediado por GTA.

El resultado más interesante de la comparativa realizada entre las CDSs del *contig* C357_151 y la base de datos de proteínas no redundantes fue la homología y sintenia (Tabla 17 y Figura 21) detectada entre 7 de las CDSs de la cepa 357 y las CDSs codificadas en el operón *dbdABCaCbCcDE* de *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W, un degradador de dibenzotiofeno aislado de fangos anóxicos procedentes de un depósito de almacenamiento de petróleo (Hirano *et al.*, 2004; 2006).

Tabla 17. Comparativa de las CDSs que codifican para degradación de dibenzotiofeno de *C. aestuarii* 357 con las de *X. polyaromaticivorans* 127W.

<i>C. aestuarii</i> ^a	Proteína	E-value	Identidad (%)	<i>X. polyaromaticivorans</i> ^a
ZP_10020723.1	DbdE	0,0	72,12	BAC98960.1
ZP_10020724.1	DbdD	4 x10 ⁻¹⁵¹	77,86	BAC98959.1
ZP_10020725.1	DbdCc	10-50	67,59	BAC98958.1
ZP_10020726.1	DbdCb	2 x10 ⁻⁹⁴	72,19	BAC98957.1
ZP_10020727.1	DbdCa	0,0	78,12	BAC98956.1
ZP_10020728.1	DbdB/Nagl	0,0	79,71	BAC98955.1
ZP_10020729.1	DbdA	9 x10 ⁻⁴⁴	61,68	BAC98954.1

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

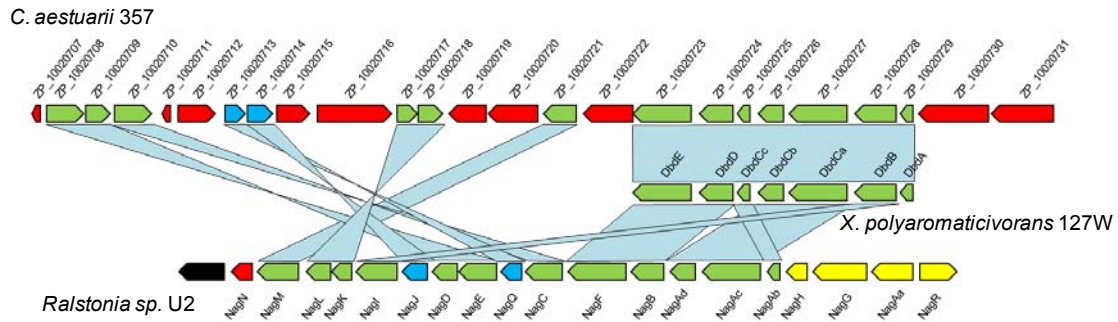


Figura 21. Comparación genómica entre el contig C357_151 de *C. aestuarii* 357 y las regiones genómicas de *X. polyaromaticivorans* 127W (AB121977) y *Ralstonia* sp. U2 (AF036940) implicadas en la degradación de di benztiofeno y naftaleno, respectivamente. En verde se representan las CDSs involucradas en la degradación de dibenzotiofeno y naftaleno que están conservadas entre ellos. En azul se muestran aquellas CDSs conservadas entre ellos que no tienen funciones relacionadas con la degradación de estos hidrocarburos aromáticos. Los datos sobre el grado de homología presentado entre ellas, así como la función asociada a las mismas, pueden consultarse en la tabla suplementaria S13. En rojo se representan las CDSs no conservadas entre las regiones genómicas comparadas. En negro se representan las posibles CDSs identificadas como transposasas. En amarillo se presentan las CDSs imprescindibles para la degradación de naftaleno en *Ralstonia* sp. U2 que no han encontrado su homólogo en el genoma de la cepa 357.

Así, y tal como se muestra en la Figura 22, la cepa 357 codificaba, atendiendo a la homología detectada con la cepa 127W, para cuatro CDSs involucradas en la vía Kodama de degradación del dibenzotiofeno (Kodama *et al.*, 1973). Así, sus productos génicos serían necesarios para formar dos proteínas funcionales directamente involucradas en las dos primeras etapas del catabolismo del dibenzotiofeno: DbdC, que actuaría como una dibenzotiofeno 1,2-dioxigenasa, transformando el dibenzotiofeno en *cis*-1,2-dihidroxi-1,2-dihidroxi-dibenzotiofeno; y DbdD (ZP_10020724.1), que actuaría como una *cis*-dibenzotiofeno dihidrodiol deshidrogenasa, transformando el *cis*-1,2-dihidroxi-1,2-dihidroxi-dibenzotiofeno en 1,2-dihidroxi-dibenzotiofeno. Es interesante destacar el hecho de que DbdC sería un enzima constituido por tres péptidos distintos: DbdCa (ZP_10020727.1), que sería una ferredoxina que transferiría los electrones necesarios para la reacción de di oxigenación; DbdCb (ZP_10020726.1), conocida como subunidad pequeña de la dioxigenasa terminal, que recibiría los electrones cedidos por DbdCa y los transferiría al centro activo de la enzima; y DbdCc (ZP_10020725.1) o subunidad grande de la dioxigenasa terminal, en la que se encontraría el centro activo de la

enzima y, por tanto, sería la responsable última de la dioxigenación del dibenzotiofeno.

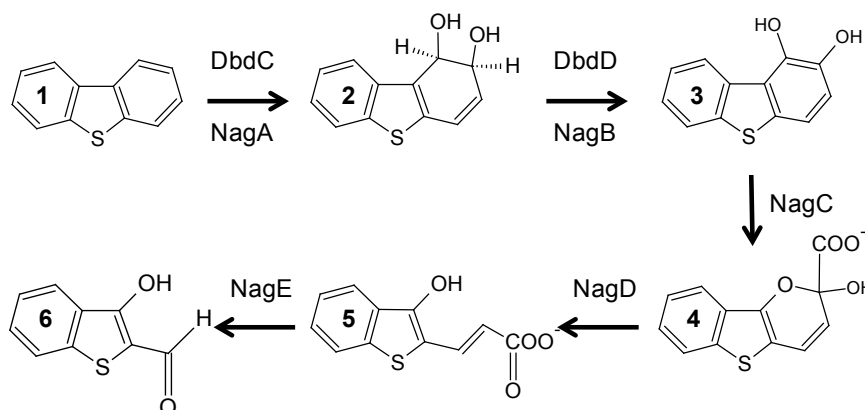


Figura 22. Vía de degradación de dibenzotiofeno de *C. aestuarii* 357. Enzimas: DbdC/NagA (ZP_10020725.1 a ZP_10020727.1), dibenzotiofeno/naftaleno 1,2-dioxigenasa; DbdD/NagB (ZP_10020724.1), cis-dibenzotiofeno/naftaleno dihidrodiol deshidrogenasa; NagC (ZP_10020710.1), 1,2-dibenzotiofeno/dihidroxi-naftaleno dioxigenasa; NagD (ZP_10020709.1), 2-hidroxicromeno-2-carboxilato deshidrogenasa; NagE (ZP_10020708.1), trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato hidratasa-aldolasa. Compuestos: 1, dibenzotiofeno; 2, cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidrodibenzotiofeno; 3, 1,2-dihidroxi-dibenzotiofeno; 4, cis-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato; 5, trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato; 6, 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (HFBT).

Las tres CDSs restantes de *C. aestuarii* 357 presentes también en *X. polyaromaticivorans* 127W codificaban para una ferredoxina (DbdA, ZP_10020729.1), que probablemente cedía electrones a una gentisato 1,2-dioxigenasa (DbdB/NagI, ZP_10020728.1), y finalmente una salicilaldehído deshidrogenasa (DbdE/NagF, ZP_10020723.1). Estas dos últimas enzimas no son necesarias para la degradación de dibenzotiofeno pero sí que son esenciales para la degradación del naftaleno vía gentisato, tal como se ha demostrado para *Ralstonia* sp. U2 (Fuenmayor *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001). Por este motivo decidimos comparar las CDSs del *contig* C357_151 con las CDSs identificadas para la degradación de naftaleno en *Ralstonia* sp. U2 (AF036940.2). El resultado de la comparación se muestra en la Tabla 18 y en la Figura 21.

Así, y tal y como se muestra en la Figura 23, *C. aestuarii* 357 dispondría de las enzimas necesarias para transformar el naftaleno hasta salicilato: NagA/DbdC (ZP10020725.1 a ZP_10020727.1), una naftaleno dioxigenasa involucrada en la transformación del naftaleno a cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno; NagB/DbdD (ZP_10020724.1), una cis-naftaleno dihidrodiol deshidrogenasa

involucrada en la generación de 1,2-dihidroxi-naftaleno a partir de *cis*-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno; NagC (ZP_10020710.1), una 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa encargada de transformar el 1,2-dihidroxi-naftaleno a 2-hidroxicromeno-2-carboxilato; NagD (ZP_10020709.1), una 2-hidroxicromeno-2-carboxilato isomerasa que transformaría el 2-hidroxicromeno-2-carboxilato a *trans*-o-hidroxibenzilidenopiruvato; NagE (ZP_10020708.1), una *trans*-o-hidroxibenzilidenopiruvato hidratasa-aldolasa, que transformaría el *trans*-o-hidroxibenzilidenopiruvato a salicilaldehído; y finalmente NagF/DbdE (ZP_10020723.1), una salicilaldehído deshidrogenasa que transformaría el salicilaldehído en salicilato. Finalmente, indicar que los productos génicos identificados como NagC, NahD y NagE estarían también involucrados en la metabolización del 1,2-dihidroxi-dibenzotiofeno procedente del dibenzotiofeno a 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (Figura 22).

Tabla 18. Comparativa de las CDSs que codifican para la degradación de naftaleno via gentisato de *C. aestuarii* 357 con las de *Ralstonia sp.* U2.

<i>C. aestuarii</i> 357 ^a	Proteína	E-value	Identidad (%)	<i>Ralstonia sp.</i> U2 ^a
ZP_10020708.1	NagE	6×10^{-135}	60,20	AAD12616.1
ZP_10020709.1	NagD	10^{-43}	38,14	AAD12617.1
ZP_10020710.1	NagC	0,16	24,79	AAD12614.1
ZP_10020713.1	NagQ	7×10^{-36}	36,31	AAD12615.1
ZP_10020714.1	NagJ	5×10^{-55}	45,54	AAD12618.1
ZP_10020717.1	NagK	10^{-53}	46,56	AAD12620.1
ZP_10020718.1	NagL	7×10^{-63}	49,06	AAD12621.1
ZP_10020721.1	NagM	2×10^{-23}	32,62	AAD12620.1
ZP_10020723.1	NagF	0,0	57,62	AAD12613.1
ZP_10020724.1	NagB/DbdD	2×10^{-52}	39,68	AAD12612.1
ZP_10020725.1	NagAb/DbdCb	2×10^{-17}	33,00	AAD12609.1
ZP_10020726.1	NagAd/DbdCd	3×10^{-10}	24,85	AAD12611.1
ZP_10020727.1	NagAc/DbdCc	7×10^{-75}	33,41	AAD12610.1
ZP_10020728.1	NagI	6×10^{-52}	33,53	AAD12619.1

^a Los números de acceso son los de la base de datos de proteínas de referencia del NCBI

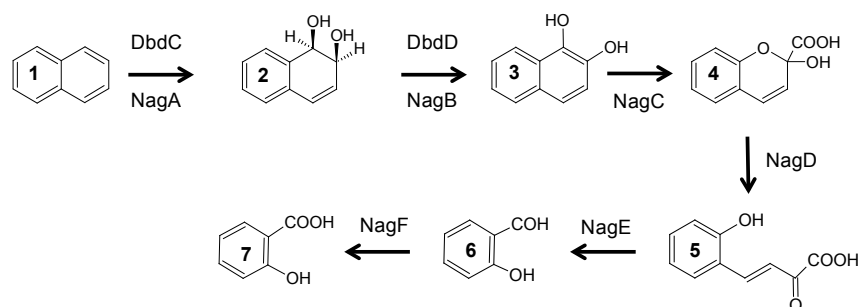


Figura 23. Vía de degradación de naftaleno a salicilato de *Citricella aestuarii* 357. Enzimas: NagA/DbdC (ZP_10020725.1 a ZP_10020727.1), naftaleno/dibenzotiofeno 1,2-dioxigenasa; NagB/DbdD (ZP_10020724.1), cis-naftaleno/dibenzotiofeno dihidrodiool deshidrogenasa; NagC (ZP_10020710.1), 1,2-dihidroxi-naftaleno/dihidroxi-dibenzotiofeno dioxigenasa; NagD (ZP_10020709.1), 2-hidroxicromeno-2-carboxilato deshidrogenasa; NagE (ZP_10020708.1), trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato hidratasa-aldolasa; NagF/DbdE (ZP_10020723.1), salicilaldehído deshidrogenasa. Compuestos: 1, naftaleno; 2, cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidrodinaftaleno; 3, 1,2-dihidroxi-naftaleno; 4, 2-hidroxicromeno-2-carboxilato; 5, trans-o-hidroxibenzilidenopiruvato; 6, salicilaldehído; 7, salicilato.

Se sabe que *Ralstonia* sp. U2 requiere una salicilato 1,5-hidroxilasa para transformar el salicilato a gentisato y, así, poder metabolizarlo (Zhou *et al.*, 2002). Esta enzima es estructuralmente más parecida a la naftaleno dioxigenasa que a una salicilato 1,2-hidroxilasa (Zhou *et al.*, 2002). Como se puede observar en la Figura 21, no se encontró ninguna CDSs que codificase para dicha salicilato 1,5-hidroxilasa (NagGH) en el *contig* C357_151 de *C. aestuarii* 357. Para evaluar la presencia de una posible salicilato 1,5-hidroxilasa en el genoma de la cepa 357 realizamos una búsqueda mediante BlasP, utilizando como referencia la subunidad grande (NagG, AAD12607.1) de dicho enzima en *Ralstonia* sp. U2. Así, lo más parecido a NagG resultó ser la CDS previamente identificada como subunidad grande de la naftaleno dioxigenasa (ZP_10020727.1, 39% de identidad, E-value 2×10^{-36}). Sin embargo, la posibilidad de que la naftaleno 1,2-dioxigenasa pueda actuar también como salicilato 1,5-hidroxilasa no es tan evidente ya que Zhou y colaboradores (2002) demostraron que ambos enzimas de *Ralstonia* sp. U2 no presentaban actividades cruzadas, esto es, la naftaleno 1,2 dioxigenasa no ataca el salicilato, y la salicilato 1,5-hidroxilasa no ataca al naftaleno. En el análisis realizado aparecieron otros dos posibles candidatos a subunidad grande de salicilato 1,5-hidroxilasa, ambas anotadas como proteínas con un centro activo Rieske 2Fe-2S esencial para dicha actividad (Zhou *et al.*, 2002):

ZP_10020615.1 (29% identidad con NagG, E-value de 4×10^{-19}) y ZP_10017525.1 (26% identidad con NagG, E-value de 3×10^{-18}). Sin embargo, la homología presentada, inferior a la de la posible naftaleno 1,2-dioxigenasa mencionada anteriormente, dificulta su identificación como salicilato 1,5-hidroxilasa.

3.1.3. Otras capacidades catabólicas: ¿una nueva salicilato 1,2-hidroxilasa?

Ante la falta de una clara salicilato 1,5-hidroxilasa en el genoma de *C. aestuarii* 357 decidimos abordar la degradación de salicilato analizando la presencia de CDSs que codificasen enzimas de otras vías. Así, mediante BlastP y utilizando como referencia las dos salicilato 1,2-hidroxilasas de *Pseudomonas stutzeri* AN10 (NahG y NahW; números de acceso NCBI AAD02146.1 y AAD02157.1, respectivamente) previamente caracterizadas en el laboratorio de microbiología de la UIB (Bosch *et al.*, 1999; 2000; Lanfranconi *et al.*, 2009), valoramos la presencia de este enzima en el genoma de la cepa 357. Así, encontramos una CDSs (anotada como una monooxigenasa dependiente de FAD, posiciones 60.512 a 61.684 del *contig* C357_067, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000056) cuyo producto génico (ZP_10018797.1) presentó un cierto grado de homología con ambas salicilato 1,2-hidroxilasas de *P. stutzeri* AN10 (NahG, 27% identidad, E-value de 4×10^{-28} ; NahW, 29% identidad, E-value de 7×10^{-32}). De hecho, una búsqueda de homología entre esta posible salicilato 1,2-hidroxilasa de *C. aestuarii* 357 y el resto de proteínas presentes en la base de datos de secuencias no redundantes del NCBI reveló que las proteínas homólogas mejor conservadas con ella se encontraban en miembros de la familia *Rhodobacteraceae*, principalmente pertenecientes al grupo *Roseobacter* (Tabla Suplementaria S14). De hecho, y tal como se muestra en la Figura 24, el 43% de identidad de secuencia marcaba el límite inferior de afiliación de dichas proteínas al grupo *Roseobacter*, siendo las CDSs más parecidas a la de la cepa 357 las pertenecientes a las tres cepas más próximas a la cepa 357 desde el punto de vista filogenómico (Figura 11): *Pelagibaca bermudensis* HTCC 2601, *Citricella* sp. SE45 y *Sagittula stellata* E-37. Este dato sugería que en el grupo *Roseobacter* se encuentra una posible salicilato 1,2-hidroxilasa de distribución universal que podría considerarse característica de dicho grupo.

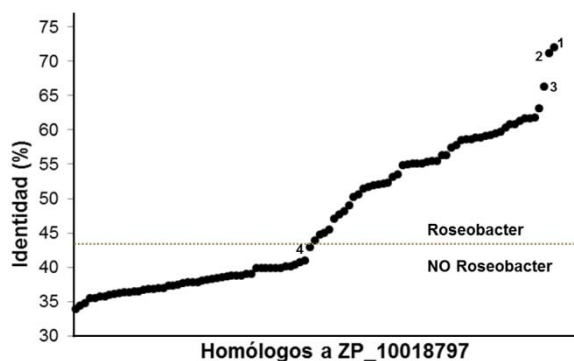


Figura 24. Grado de identidad de secuencia aminoacídica entre ZP_10018797.1 de *C. aestuarii* 357 y las 100 proteínas más parecidas a ella presentes en la base de datos NR del NCBI. La línea discontinua marca el límite de afiliación de las proteínas al grupo *Roseobacter*. 1, ZP_01443892.1 de *P. bermudensis* HTCC 2601; 2, ZP_06781756.1 de *Citricella* sp. SE45; 3, ZP_01745440.1 de *S. stellata* E-37; 4, YP_004482819.1 de *Marinomonas posidonica* IVIA-Po-181.

Para confirmar esta observación decidimos hacer un análisis filogenético entre las posibles salicilato 1,2-hidroxilasas presentes en miembros del grupo *Roseobacter* y salicilato 1,2-hidroxilasas bien caracterizadas desde el punto de vista funcional (Figura 25). En el análisis se introdujeron también algunas 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilasas, que son las hidroxilasas dependientes de FAD caracterizadas más parecidas estructuralmente a las salicilato 1,2-hidroxilasas (Montersino y Berkel, 2012). Las secuencias utilizadas en el análisis se pueden consultar en la Tabla Suplementaria S15.

Tal como se observa en el análisis, todas las posibles salicilato 1,2-hidroxilasas del grupo *Roseobacter* se afiliaron conjuntamente (Tipo I), y se mantuvieron separadas del resto. De hecho, filogenéticamente hablando resultaron ser más parecidas a 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilasas (Tipo IV) que a salicilato 1,2-hidroxilasas propiamente dichas (Tipos II y III). Los dos tipos de salicilato 1,2-hidroxilasas conocidas (NahG, Tipo II; y NahW, Tipo III) se mantuvieron filogenéticamente separadas. Esta agrupación por tipo de enzima puede sugerir una función distinta a la hidroxilación en posición 1,2 para las hidroxilasas FAD-dependientes de Tipo I. Una posibilidad sería que presentasen actividad salicilato 1,5-hidroxilasa. De hecho, una salicilato 1,5-hidroxilasa purificada de *Rhodococcus erythropolis* ha presentado características fisicoquímicas más parecidas a enzimas monoméricos como las salicilato 1,2-hidroxilasas que a enzimas triméricos como las salicilato-1,5

hidroxilasas propiamente dichas (Suemori *et al.*, 1995). A pesar de ello, esta enzima no ha sido secuenciada y, por tanto, no ha podido utilizarse en el análisis filogenético.

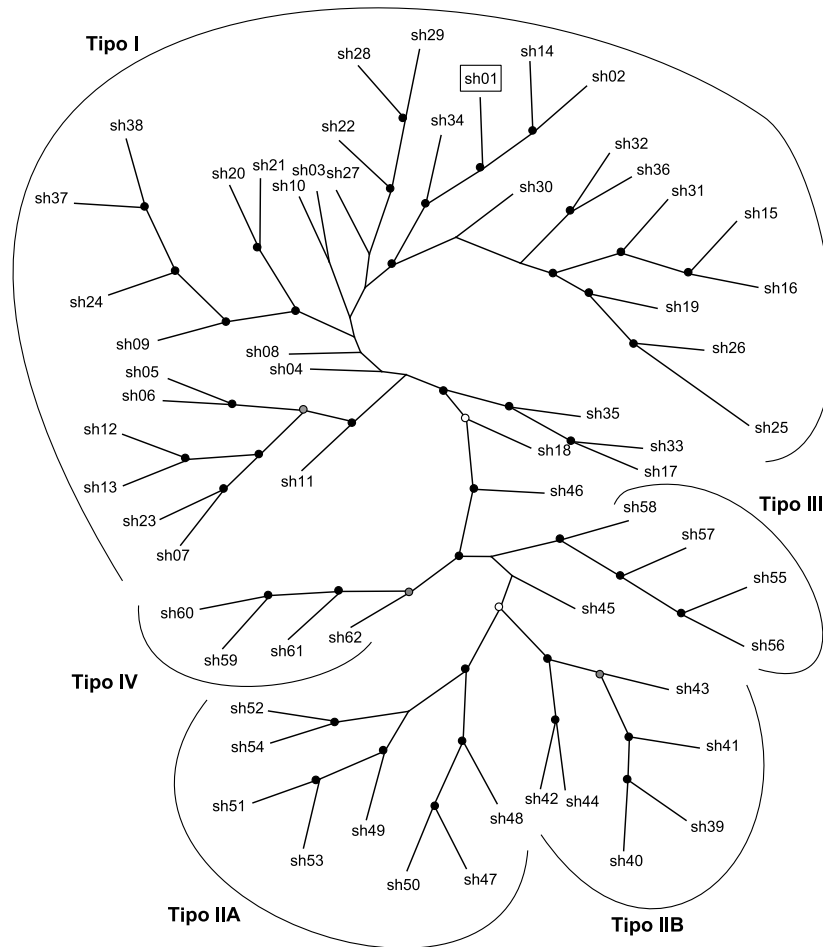


Figura 25. Análisis filogenético de posibles salicilato 1,2-hidroxilasas del grupo *Roseobacter*. El análisis se generó por el método de neighbour-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el método de Jones-Taylor-Thornton. El árbol se calculó a partir de 62 secuencias (Tabla suplementaria S15), 38 procedentes de genomas del grupo *Roseobacter* y 24 procedentes de microorganismos bien caracterizados en lo que se refiere a la degradación de salicilato. Para el análisis se utilizó un total de 2 93 posiciones conservadas de las 529 que presentaba el alineamiento. La selección se realizó con el programa GBlocks, tal como se indica en la sección “Materiales y métodos”. Los círculos en los nodos indican el porcentaje de ocurrencia de las agrupaciones en el análisis de robustez por *bootstrap* (100 réplicas). Sólo se muestran los valores mayores de 50: blanco, valor superior a 80; gris, valor superior a 75; negro, valor superior a 50. La secuencia encuadrada (sh01) corresponde a ZP_10018797.1 de *C. aestuarii* 357. Las agrupaciones se han indicado en base al enzima analizado y a la adscripción filogenética mayoritaria de las cepas que los albergan: Tipo I, NahG, roseobacters; Tipo IIA, NahG, pseudomonas; Tipo IIB, NahG, burkholderias; Tipo III, NahW; Tipo IV, 3-hidroxibenzoato-6-hidroxilasas.

Sin embargo, y con una aproximación más conservadora, de ser ZP_10018797.1 una salicilato 1,2-hidroxilasa funcional, el salicilato sería monooxygenado y descarboxilado hasta catecol. De formarse catecol, éste

podría seguir metabolizándose con la ayuda de dos enzimas distintos: una catecol 2,3-dioxigenasa, que abriría el anillo aromático de forma extradiólica (Figura 5) generando hidroximucónico semialdehido; o una catecol 1,2-dioxigenasa, que abriría el anillo aromático de forma intradiólica (Figura 5) generando cis-cis-hidroximuconato. Ambos productos finales serían canalizados al ciclo de krebs por enzimas específicos. El análisis genómico de la cepa 357 reveló la ausencia de CDSs codificantes para ambos enzimas. Sin embargo, se sabe que algunas 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa, como es el caso de NahC de *Pseudomonas* sp. ND6, pueden atacar el catecol como si se tratara de una catecol 2,3-dioxigenasa, aunque con una menor eficiencia que para su sustrato natural: el 1,2-dihidroxi-naftaleno (Kuhm *et al.*, 1991). Si esto sucediese con NagC (ZP_10020710.1) de *C. aestuarii* 357, que de hecho aparece en la anotación automática como una catecol 2,3-dioxigenasa, el catecol sería transformado a hidroximucónico semialdehido. Sin embargo, no hemos podido identificar ninguna de las CDSs necesarias para la canalización del hidroximucónico semialdehido hacia el ciclo de Krebs, por lo que la metabolización del salicilato vía catecol 2,3-dioxigenasa se podría ver interrumpida en este punto.

Finalmente, indicar que existe una última posibilidad para la metabolización del salicilato que es la rotura directa del anillo aromático por la gentisato 1,2-dioxigenasa (NagI/DbdB, ZP_10020728.1) actuando como una salicilato 1,2-dioxigenasa, tal como se ha descrito para *Pseudoaminobacter salicylatoxidans* BN12 (Hintner *et al.*, 2001; 2004). De suceder esto, el salicilato sería transformado en 2-oxohepta-3,5-dienedioato. Atendiendo a su estructura, se puede proponer que con una hidroxilación y una isomerización este compuesto podría transformarse en 3-maleilpiruvato y, con esto, canalizarse hacia el ciclo de Krebs. En este sentido, se ha identificado en el *contig* C357_151 una posible citocromo P450 (ZP_10020722.1) que, debido a su papel genérico como monooxigenasa de hidrocarburos aromáticos (Ullrich y Hofrichter, 2007), podría ser la responsable de la hidroxilación del 2-oxohepta-3,5-dienedioato. Finalmente, NagM (ZP_10020721.1, identificada como una 5-carboximetil-2-hidroximuconato-delta-isomerasa) podría ser la isomerasa necesaria para generar 3-maleilpiruvato, que finalmente sería canalizado al ciclo de Krebs por la acción sucesiva de NahL y NagK (Figura 19).

En definitiva, los datos genómicos no permiten definir de un modo claro cómo sería metabolizado el salicilato. En la Figura 26 se muestra un resumen de las diferentes posibilidades, indicándose con trazos negros aquellas actividades enzimáticas con mayores probabilidades de ocurrir, y en trazos grises aquellas más improbables, atendiendo a los datos genómicos. Las vías metabólicas no identificadas se muestran bloqueadas. Podemos observar que la probabilidad mayor de ataque del salicilato atendiendo al análisis genómico se realizaría con una salicilato 1,2-hidroxilasa, rindiendo catecol. Sin embargo, de actuar la 1,2-dihidroxi-naftaleno dioxigenasa como una catecol 2,3-dioxigenasa, la vía no podría progresar por carecer de enzimas catabólicos para el hidroximucónico semialdehído. El ataque del salicilato por parte de una salicilato 1,5-hidroxilasa no está respaldado genómicamente de modo directo. Sin embargo, las dos posibilidades planteadas (ataque con la naftaleno 1,2-dioxigenasa o al gún enzima portador del núcleo Rieske Fe-S actuando como salicilato 1,5-hidroxilasa, o abertura directa con la gentisato 1,2-dioxigenasa a modo de salicilato 1,2-dioxigenasa) rendirían productos químicos canalizables hacia el ciclo de Krebs. Sin embargo, se necesitan datos experimentales para clarificar la vía catabólica del salicilato y, por extensión, del naftaleno.

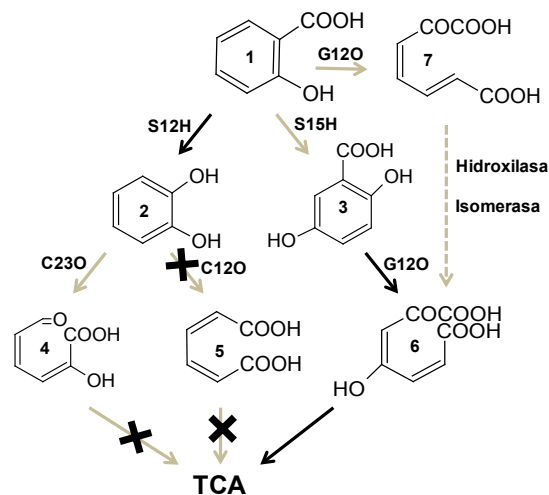


Figura 26. Posibles estrategias de ataque del salicilato por *C. aestuarii* 357. Enzimas: S12H, salicilato 1,2-hidroxilasa; C23O, catecol 2,3-dioxigenasa; C12O, catecol 1,2-dioxigenasa; S15H, salicilato 1,5-hidroxilasa; G12O, gentisato 1,2-dioxigenasa. Compuestos: 1, salicilato; 2, catecol; 3, gentisato; 4, hidroximucónico semialdehído; 5, cis-cis-hidroximuconato; 6, 3-maleilpiruvato; 7, 2-oxohepta-3,5-dienedioato. Las flechas en negro indican actividades respaldadas genómicamente. Las flechas en gris indican actividades deducidas basadas en sustratos alternativos de enzimas identificados genómicamente. Las flechas interrumpidas indican ausencia de evidencia genómica.

3.2. Caracterización fisiológica de la degradación de hidrocarburos.

Como hemos mencionado anteriormente, *C. aestuarii* 357 parece poseer los determinantes génicos para poder catabolizar hidrocarburos poliaromáticos como el naftaleno y el dibenzotiofeno. Como se ha visto en la introducción, la cepa 357 no es la primera del grupo en describirse como degradadora de naftaleno (Harwati *et al.*, 2009), pero si que es la primera en tener caracterizados los posibles genes involucrados en dicho proceso. De hecho, la capacidad de crecimiento a expensas de naftaleno y dibenzotiofeno, y de dos de sus posibles metabolitos intermediarios (salicilato y gentisato) ya ha sido demostrada en placa. Decidimos evaluar estas capacidades catabólicas en cultivo líquido para i) poder determinar el tiempo de duplicación de la cepa 357 en cada uno de estos hidrocarburos y, ii) caracterizar químicamente los intermediarios de la ruta de degradación que pudieran acumularse en el medio para clarificar y/o confirmar los distintos pasos del proceso catabólico. Para ello procedimos a realizar curvas de crecimiento en MMY tal como se ha descrito en la sección “Materiales y métodos”.

Tabla 19. Crecimiento de *C. aestuarii* 357 con diferentes sustratos como fuente única de carbono y energía.

Sustrato*	Tiempo duplicación (h)	A ₆₀₀ máxima
Succinato 0,5 % (p/v)	6,0 ± 0,8	0,844
Naftaleno 0,1 % (p/v)	15,0 ± 2,1	0,440
Salicilato 3 mM	13,5 ± 1,8	0,466
Gentisato 3 mM	9,5 ± 1,2	0,356
Dibenzotiofeno 0,1 % (p/v)	88,0 ± 7,2	0,164

* Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

Como podemos observar en la Tabla 19, *C. aestuarii* 357 pudo crecer en medio líquido utilizando los cuatro hidrocarburos aromáticos como fuente única de carbono y energía, corroborando las observaciones previas realizadas en medio sólido y sugiriendo la funcionalidad de las vías metabólicas predichas tras el análisis genómico. A pesar de ello y como era de esperar, *C. aestuarii* 357 presentó el mejor crecimiento utilizando succinato como fuente de carbono y energía, y no utilizando hidrocarburos aromáticos. Este comportamiento es característico de bacterias generalistas involucradas en degradación de hidrocarburos, como es el caso de *Pseudomonas stutzeri* AN10 que, tal como

se ha mencionado en la introducción, es un modelo de degradación de naftaleno que ha sido bien caracterizado en nuestro laboratorio (Bosch *et al.*, 1999a; 1999b; 2000; Lanfranconi *et al.*, 2009; Brunet-Galmes *et al.*, 2012). En este microorganismo, que fue aislado como degradador de naftaleno, vimos que el crecimiento a expensas de naftaleno (t_d , 2,2 h) era ligeramente más lento que a expensas de succinato (t_d , 1,4 h) (Lanfranconi *et al.*, 2009). A pesar de que *C. aestuarii* crece más lento que *P. stutzeri* AN10 en ambas condiciones (Tabla 19), las diferencias de crecimiento observadas para gentisato con respecto a succinato (Tabla 19) serían del mismo orden que las observadas para naftaleno respecto a succinato en la cepa AN10, lo que sugiere que la cepa 357 podría estar adaptada a crecer a expensas de gentisato como fuente única de carbono y energía. Este detalle es interesante ya que, mientras *P. stutzeri* AN10 fue aislado en placas de naftaleno, *C. aestuarii* 357 fue aislado sin presión selectiva de hidrocarburos, lo que sugeriría un potencial degradador intrínseco en miembros del grupo *Roseobacter* (al menos en lo que refiere a rutas centrales de degradación), muy probablemente debido a la presión ejercida por la presencia crónica de hidrocarburos en los ecosistemas en los que proliferan de forma natural, como es el caso de los puertos (Nogales *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; 2009; Ma *et al.*, 2009).

Tras el gentisato, las mejores tasas de crecimiento de *C. aestuarii* 357 a expensas de hidrocarburos aromáticos se obtuvieron a expensas de salicilato, naftaleno y dibenzotiofeno, por este orden. Esta distribución de tiempos puede considerarse lógica si entendemos la vía catabólica como un proceso modular: primero se necesita una vía de degradación de gentisato, luego una salicilato 1,5-hidroxilasa, y a continuación la ruta de degradación de naftaleno a salicilato. En el caso del dibenzotiofeno, tal como se ha comentado en la introducción, la metabolización no sería total, por lo que el rendimiento energético sería menor. Este comportamiento no se observó en *P. stutzeri* AN10, cepa en la que el crecimiento con salicilato 3 mM (t_d , 3,4 h) fue más lento que en presencia de naftaleno (t_d , 2,2 h). El responsable de esta menor tasa de crecimiento fue el propio salicilato, que resultó ser tóxico para la cepa AN10. De hecho, a medida que se incrementaba la concentración de salicilato del medio, se incrementaba el tiempo de generación del microorganismo, hasta

llegar a valores de t_d de 9,4 horas en presencia de salicilato 12 mM (Lanfranconi *et al.*, 2009).

Para clarificar si el salicilato y/o el gentisato eran tóxicos para *C. aestuarii* 357, decidimos evaluar las tasa de crecimiento de la cepa a expensas de concentraciones crecientes de ambos compuestos (Tabla 20).

Tabla 20. Crecimiento de *C. aestuarii* 357 con salicilato y gentisato a diferentes concentraciones como fuentes únicas de carbono y energía.

Sustrato*	Tiempo duplicación (h)	A ₆₀₀ máxima
Salicilato 3 mM	13,5 ± 1,8	0,466
Salicilato 4,5 mM	18,3 ± 2,4	0,501
Salicilato 6 mM	37,0 ± 5,2	0,138
Salicilato 7,5 mM	91,0 ± 18,3	0,046
Salicilato 9 mM	ND	ND
Gentisato 3 mM	9,5 ± 1,2	0,356
Gentisato 6 mM	13,1 ± 1,4	0,521
Gentisato 9 mM	13,3 ± 1,6	0,684
Gentisato 12 mM	13,4 ± 1,2	0,703

* Todos los experimentos se hicieron por duplicado, utilizando MMY como medio basal de crecimiento. ND: no detectado.

Los resultados indicaron dos comportamientos distintos. En el caso del salicilato, a medida que incrementábamos la concentración se incrementaba el tiempo de generación, hasta llegar a concentraciones de salicilato (9 mM) en los que no se observó crecimiento. Este comportamiento fue el mismo que se observó para la cepa AN10 (Lanfranconi *et al.*, 2009) por lo que se confirmó la toxicidad del salicilato para *C. aestuarii* 357. Adicionalmente, y a diferencia de lo que se observó en AN10, en la que a medida que incrementábamos la concentración de salicilato en el medio el cultivo iba adquiriendo una mayor biomasa (Lanfranconi *et al.*, 2009), la cepa 357 alcanzó valores de biomasa cada vez más bajos a medida que se incrementaba la concentración de salicilato utilizada, lo que sugería mecanismos de toxicidad distintos a los que ocurren en la cepa AN10. Es interesante observar que los parámetros de crecimiento de 357 son similares para salicilato 3 mM y naftaleno (Tabla 19). Probablemente, una acumulación de salicilato en el medio de cultivo de *C. aestuarii* 357 al crecer en naftaleno podría explicar el fenotipo observado con respecto al crecimiento a expensas de succinato: mayor tiempo de duplicación y reducción de la biomasa generada (Tabla 19). Esta posibilidad viene reforzada por el hecho que al crecer en presencia de naftaleno como fuente única de carbono y energía *C. aestuarii* 357 acumula compuestos químicos en

el medio celular que provocan un cambio en el color del medio de cultivo de transparente a amarillo-verdoso (Figura 24).

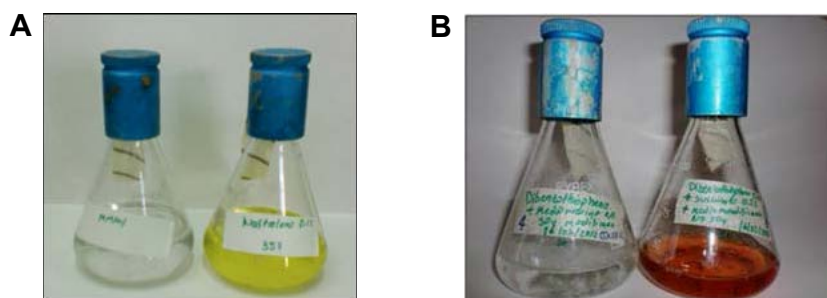


Figura 27. Cambio de coloración debido a acumulación de metabolitos en *Citricella aestuarii* 357 crecida a expensas de naftaleno (A) y dibenzotiofeno (B) como fuentes únicas de carbono y energía.

En cuanto al gentisato, aunque a partir de 6 mM se observó un ligero incremento del tiempo de duplicación, éste se estabilizó ($t_d \approx 13$ h), al menos hasta el máximo de concentración de gentisato evaluada (12 mM) (Tabla 20). Además, a medida que se incrementó la concentración de gentisato en el medio de cultivo se obtuvo una mayor biomasa final, aproximándose a las densidades celulares obtenidas con succinato y sugiriendo que la menor biomasa generada en presencia de gentisato, al comparar con la generada con succinato, era por falta de sustrato. En definitiva, estos datos sugieren que el gentisato no es tóxico para la cepa 357 y, por tanto, podemos definir a *C. aestuarii* 357 como un buen degradador de este hidrocarburo aromático.

Finalmente, y en relación al dibenzotiofeno, pudimos observar un incremento muy grande en el tiempo de duplicación en comparación con el crecimiento a expensas de succinato, así como la generación de muy poca biomasa celular (Tabla 19). Al igual que en el caso del naftaleno, se acumularon metabolitos intermediarios de degradación a expensas de dibenzotiofeno que dieron al cultivo un tono rosado-azulado (Figura 27). Todo ello nos hace pensar que el dibenzotiofeno, o alguno de sus metabolitos intermediarios, resulta tóxico para *C. aestuarii* 357. Adicionalmente, decidimos evaluar si *C. aestuarii* 357 era capaz de desulfurizar este compuesto y, por tanto, utilizarlo como fuente de azufre. Para ello planteamos cultivos de la cepa 357 en medio MMF (medio libre de azufre: MMY sin Na_2SO_4 ni extracto de levadura) suplementado con dibenzotiofeno como fuente única de carbono, energía y azufre. Sin embargo, y a pesar de detectar la aparición de metabolitos intermediarios de la

degradación, tras más de 20 días de cultivo no pudimos observar incremento en la biomasa celular. Este resultado es lógico si se tiene en cuenta que el t_d en presencia de una fuente de azufre (medio MMY) y con dibenzotiofeno como fuente única de carbono y energía fue de 88 horas (Tabla 19). Por este motivo decidimos plantear experimentos de crecimiento en el medio MMF, en presencia y ausencia de dibenzotiofeno como fuente de azufre, y succinato como fuente de carbono y energía (Tabla 21).

Tabla 21. Crecimiento de *C. aestuarii* 357 en diferentes condiciones de cultivo en presencia de dibenzotiofeno.

Medio evaluado*	Tiempo duplicación (h)	A ₆₀₀ máxima
MMMY + succinato	6,0 ± 0,8	0,844
MMMY + succinato + DBT	11,2 ± 1,3	0,486
MMF + succinato + DBT	64,5 ± 6,2	0,234
MMF + succinato + Na ₂ SO ₄ + DBT	10,8 ± 1,4	0,540

* Todos los experimentos se hicieron por duplicado. MMF es MMY sin extracto de levadura ni fuente de azufre. Las cantidades de sustratos añadidas (p/v) fueron las siguientes: succinato, 0,5% p/v; dibenzotiofeno (DBT), 0,1% p/v; Na₂SO₄, 0,3% p/v.

La primera conclusión que podemos sacar del experimento es que el dibenzotiofeno es tóxico para *C. aestuarii* 357. Así, podemos observar que la adición de dibenzotiofeno al cultivo en MMY complementado con succinato como fuente de carbono y energía genera un considerable incremento del tiempo de duplicación (t_d de 6 a 11 horas) y reduce a la mitad la biomasa generada. Este efecto tóxico podría ser debido al propio dibenzotiofeno o a algún metabolito secundario de los que se acumulan en el medio de cultivo durante el crecimiento celular (Figura 27). Este incremento del tiempo de generación es todavía más acusado cuando le eliminamos la fuente clásica de azufre (Na₂SO₄). Sin embargo, el tiempo de duplicación observado (64,5 h) es menor que el obtenido en MMY suplementado con dibenzotiofeno (88 h) como fuente única de carbono y energía (Tabla 19). Además, la densidad celular alcanzada es algo mayor que la alcanzada con MMY suplementado únicamente con dibenzotiofeno. Estos datos sugieren que en estas condiciones (MMF + succinato + dibenzotiofeno), la fuente de carbono y energía mayoritariamente utilizada es el succinato, y que el dibenzotiofeno debería actuar principalmente como fuente de azufre, aunque su efecto tóxico sobre la cepa 357 (o el de sus intermediarios de degradación) limitase el crecimiento. Finalmente, mencionar que al complementar el medio MMF con Na₂SO₄ se

recuperaron los niveles de crecimiento, aunque no totalmente, probablemente debido a la toxicidad mediada por el dibenzotiofeno o metabolitos derivados.

La siguiente pregunta era si *C. aestuarii* 357 presentaba codificado en su genoma la maquinaria necesaria para desulfurizar dibenzotiofeno. La Figura 28 resume el proceso de desulfurización de uno de los microorganismos mejor estudiados capaces de realizar este proceso: *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Denome *et al.*, 1994; Piddington *et al.*, 1995; Lei y Tu, 1996).

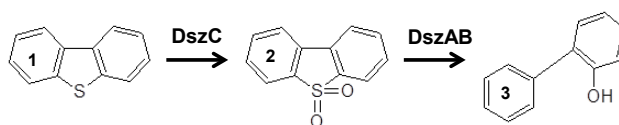


Figura 28. Desulfurización de dibenzotiofeno. Enzimas: DszC, dibenzotiofeno monooxigenasa; DszAB, dibenzotiofeno-sulfono liasa. Compuestos: 1, dibenzotiofeno; 2, dibenzotiofeno sulfona; 3, 2-hidroxibifenilo.

Como podemos ver en la figura, son necesarios al menos dos enzimas para poder utilizar el dibenzotiofeno como fuente de azufre: una dibenzotiofeno monooxigenasa (DszC, P54998), un enzima monomérico que catalizaría la transformación del dibenzotiofeno en dibenzotiofeno-sulfona; y una dibenzotiofeno sulfono liasa (DszA, P54995; DszB, P54997), un heterodímero que catalizaría la desulfurización de la dibenzotiofeno-sulfona rindiendo 2-hidroxibifenilo. El genoma de la cepa 357 resultó poseer una CDS (posiciones 48.580 a 49.863 del *contig* C357_208, número de acceso del NCBI NZ_AJKJ01000149) cuyo producto génico (ZP_10021459) presento un 36 % de identidad (E-value, 9×10^{-82}) con DszA de *R. erythropolis* IGTS8, lo que sugiere su papel como desulfurasa terminal. Sin embargo, no se han encontrado CDSs homólogos a DszB y DszC en el genoma de la cepa 357. A pesar de ello, es interesante el hecho de que cadena abajo de esta posible desulfurasa terminal se encuentra una CDS cuyo producto génico (ZP_10021460), atendiendo a la anotación automática, codifica para un posible FMN-reductasa NADPH-dependiente. Esta reductasa, aunque no interviene directamente en la desulfurización del dibenzotiofeno, podría estar involucrada en la cesión de electrones a DszC y DszAB, tal como ocurre con la reductasa DszD caracterizada para *R. erythropolis* D-1 (Matsubara *et al.*, 2001).

3.3. Caracterización química de las vías degradativas.

3.3.1. Degradación de naftaleno, salicilato y gentisato.

Tal como hemos demostrado anteriormente, *C. aestuarii* 357 es capaz de crecer a expensas de naftaleno, salicilato y gentisato como fuentes únicas de carbono y energía. Además, la cepa 357 presenta codificado en una región de su genoma de aproximadamente 28 kb (*contig* C357_151) la práctica totalidad de los determinantes genéticos de la vía de degradación de dichos compuestos, sugiriendo la degradación de naftaleno a salicilato, y la posterior canalización de este último a gentisato y 3-maleilpiruvato. Durante el crecimiento en naftaleno pudimos observar la acumulación de posibles metabolitos intermediarios en el medio de cultivo (Figura 27). Por este motivo decidimos intentar identificar los posibles metabolitos acumulados mediante su resolución por HPLC (ver “Materiales y métodos”) para poder confirmar la estrategia de degradación propuesta para la cepa 357.

En primer lugar se analizó la posible acumulación de metabolitos secundarios en el sobrenadante de *C. aestuarii* 357 crecida con gentisato 3 mM como única fuente de carbono y energía. El cromatograma a una absorbancia de 330 nm reveló la presencia de dos picos cuyos espectros de absorción se pudieron asignar a gentisato ($t_R = 5,8$ min), para el cual disponíamos de estándar, y a 3-maleilpiruvato ($t_R = 2,7$ min) (Zhou *et al.*, 2001) (Figura suplementaria S4). Como era de esperar, la desaparición de gentisato se correspondía con el incremento en la biomasa celular y la aparición de 3-maleilpiruvato (alcanzando una acumulación máxima de 5,4 μ M) (Figura 29). Esto confirmaba la metabolización del gentisato mediada por una gentisato 1,2-dioxigenasa.

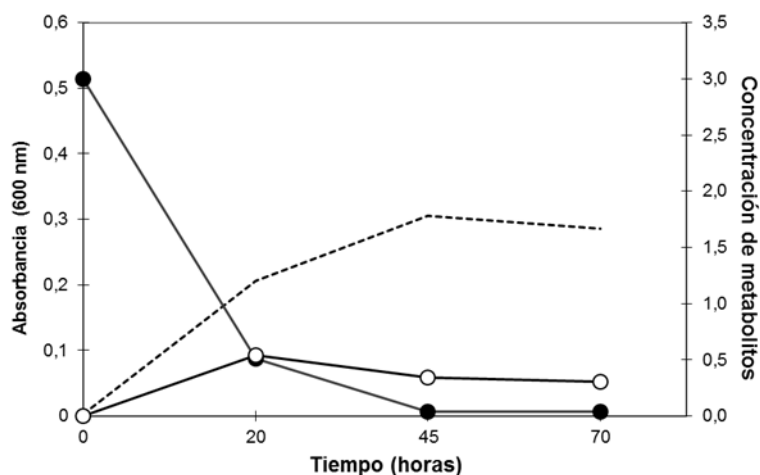


Figura 29. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermediarios de la degradación de gentisato por *C. aestuarii* 357. Línea discontinua, biomasa celular (A_{600}). Líneas continuas, concentración de metabolitos: 3-maleilpiruvato (\circ , $\times 10 \mu\text{M}$) y gentisato (\bullet , mM).

Decidimos realizar el experimento utilizando salicilato 3 mM como única fuente de carbono y energía. El cromatograma (330 nm) reveló la presencia de dos picos cuyos espectros de absorción permitieron su identificación como salicilato ($t_R = 11,7$ min), para el cual disponíamos de estándar, y 3-maleilpiruvato ($t_R = 2,7$ min), no detectándose la presencia de gentisato ni de otro intermediario de la degradación de salicilato (Figura Suplementaria S5). El análisis reveló que la desaparición de salicilato se correspondía con el incremento de la biomasa celular y con la acumulación de 3-maleilpiruvato hasta un máximo de $0,14 \mu\text{M}$ (50 veces inferior al observado para el crecimiento en gentisato) (Figura 30).

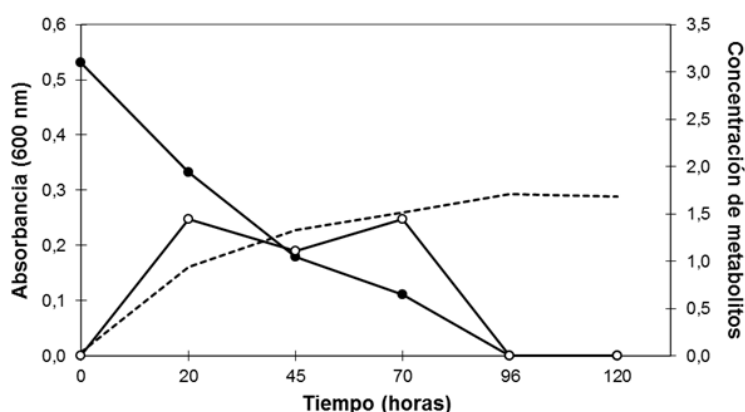


Figura 30. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermediarios de la degradación de salicilato por *C. aestuarii* 357. Línea discontinua, biomasa celular (A_{600}). Líneas continuas, concentración de metabolitos: 3-maleilpiruvato (\circ , $\times 10^{-1} \mu\text{M}$) y salicilato (\bullet , mM).

Este dato, junto con la no observación de acumulación de catecol (para el cual también disponíamos de estándar) indicaría que la metabolización de salicilato ocurre vía 3-maleilpiruvato y no vía catecol, por lo que la posible salicilato 1,2-hidroxilasa identificada (ZP_10018797.1), o bien no se expresa o, de expresarse, no actúa como una salicilato 1,2-hidroxilasa. Así, y dado que la cepa 357 presenta una menor tasa de crecimiento para salicilato que para gentisato (Tabla 19) y no acumula gentisato durante el crecimiento en salicilato, pueden sugerirse dos escenarios distintos (Figura 26) en la metabolización de este último: 1) actividad salicilato 1,2-dioxigenasa residual mediada por la gentisato 1,2-dioxigenasa, y posterior canalización del producto resultante a 3-maleilpiruvato, con lo que no se formaría gentisato; o 2) baja actividad salicilato 1,5-hidroxilasa, con lo que se generarían pequeñas cantidades de gentisato que sería inmediatamente canalizado a 3-maleilpiruvato por la gentisato 1,2-dioxigenasa, impidiendo su detección en el sobrenadante.

Para clarificar este aspecto decidimos generar biomasa de la cepa 357 crecida a expensas de gentisato como fuente única de carbono y energía, y ponerla en contacto con salicilato (3 mM) (ver “Materiales y métodos”). En la Figura 31 se muestra la acumulación de metabolitos detectadas durante las primeras 32 horas de inducción.

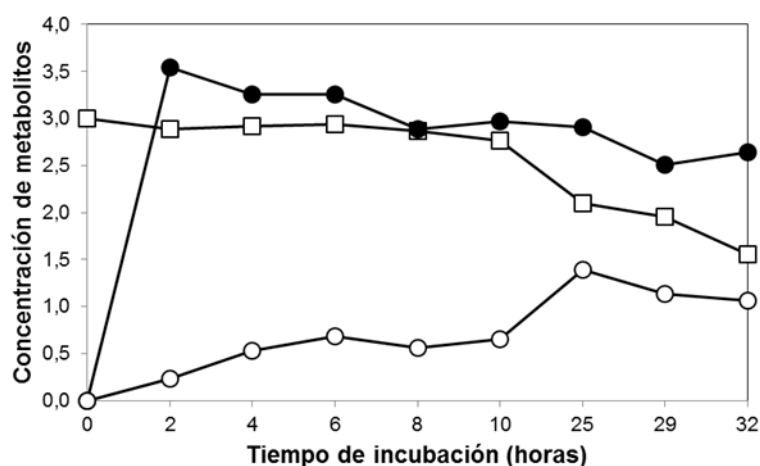


Figura 31. Acumulación de metabolitos por *Citricella aestuarii* 357 tras incubación con salicilato (3 mM). Concentración de metabolitos: 3-maleilpiruvato (○, μM), salicilato (□, mM) y gentisato (●, x10 μM).

Como se puede observar, y tal como se esperaba, las células de *C. aestuarii* 357 empiezan a consumir salicilato y a generar 3-maleilpiruvato. De hecho, el incremento de la concentración de 3-maleilpiruvato en el medio de cultivo

ocurre paralelamente al consumo de salicilato. Adicionalmente, y a diferencia de lo observado durante el crecimiento con salicilato como fuente única de carbono y energía, esta incubación con salicilato permitió detectar gentisato en el medio de cultivo ($t_R = 5,8$ min, concentración máxima detectada de $35,3 \mu\text{M}$) a partir de las 2 horas de incubación y hasta el final del experimento (Figura 31). Este resultado nos indica que el salicilato es definitivamente atacado por una salicilato 1,5-hidroxilasa rindiendo gentisato que, mediante la gentisato 1,2-dioxigenasa es transformado en 3-maleilpiruvato y, consecuentemente, canalizado hacia el ciclo de Krebs. Como hemos mencionado anteriormente, el bajo rendimiento en la transformación de salicilato a gentisato podría justificarse con la presencia de un enzima no especializado aunque capaz de monooxigenar el salicilato en posición 5'. Un ejemplo de ello podría ser la misma subunidad grande de la naftaleno dioxigenasa (ZP_10020727.1), o las otras dos proteínas portadoras de centros activos Rieske 2Fe-2S (ZP_10017525.1 y ZP_10020615.1) mencionadas anteriormente, o incluso la monooxigenasa FAD-dependiente (ZP_10018797.1) semejante a salicilato 1,2-hidroxilasas codificada en el *contig* C357_067. Sin embargo, la confirmación de esta hipótesis requiere de experimentación adicional.

Finalmente, decidimos analizar la acumulación de metabolitos durante el crecimiento en naftaleno. Durante el análisis pudimos detectar e identificar espectrofotométricamente hasta 5 metabolitos intermediarios diferentes (Figura Suplementaria S6): salicilaldehído ($t_R = 9,9$ min) y salicilato ($t_R = 12,4$ min), identificados por comparación con estándares de laboratorio; y 3-maleilpiruvato ($t_R = 3,3$ min), 2-hidroxicromeno-2-carboxilato ($t_R = 6,5$ min) y trans-o-hidroxibenzilideno piruvato ($t_R = 8,7$ min), identificados atendiendo a datos bibliográficos (Eaton y Chapman, 1992; Zhou *et al.*, 2001).

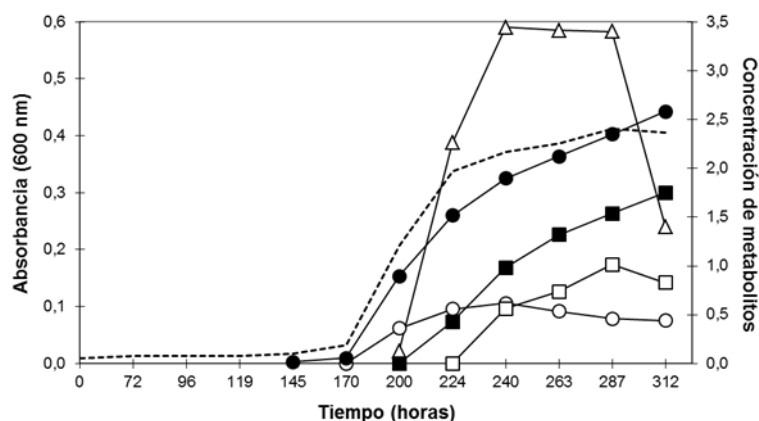


Figura 32. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermedios de la degradación de naftaleno por *C. aestuarii* 357. Línea discontinua, biomasa celular (A_{600}). Líneas continuas, concentración de metabolitos: 3-maleilpiruvato (\circ , μM), salicilato (\bullet , mM), salicilaldehído (\blacksquare , $\times 10 \mu\text{M}$), 2-hidroxicromeno-2-carboxilato (\square , μM) y trans-o-hidroxibenzilideno piruvato (\blacktriangle , mM).

Como podemos observar (Figura 32), el primer metabolito intermedio que se acumula es el salicilato, llegando a concentraciones de hasta 2.6 mM al final del experimento. Como se ha demostrado anteriormente, el salicilato ha resultado ser tóxico para la cepa 357 (Tabla 20). Atendiendo a esto, es muy probable que la acumulación de salicilato sea la responsable del enlentecimiento del crecimiento y la generación de poca biomasa al utilizar naftaleno como fuente única de carbono y energía (Tabla 19). De utilizar la misma estrategia de metabolización del salicilato propuesta anteriormente, la acumulación de salicilato estaría producida por un desbalance del flujo metabólico, en el que la enzima salicilato 1,5-hidroxilasa no sería capaz de transformar a genticato todo el salicilato generado a partir de naftaleno. Sin embargo, y tal como sucedió con el crecimiento a expensas de salicilato, no pudimos detectar la presencia de genticato en el medio de cultivo (Figura 32). Para intentar visualizar la acumulación de genticato decidimos generar biomasa de la cepa 357 utilizando genticato como fuente de carbono y energía, y pusimos en contacto esta biomasa con naftaleno. Tal como podemos ver en la Figura 33, detectamos la presencia de genticato a partir de las 4 horas de incubación con naftaleno, manteniéndose en valores próximos a 30 mM durante todo el experimento. Esta observación corroboraba la metabolización del salicilato formado a partir de naftaleno hacia genticato.

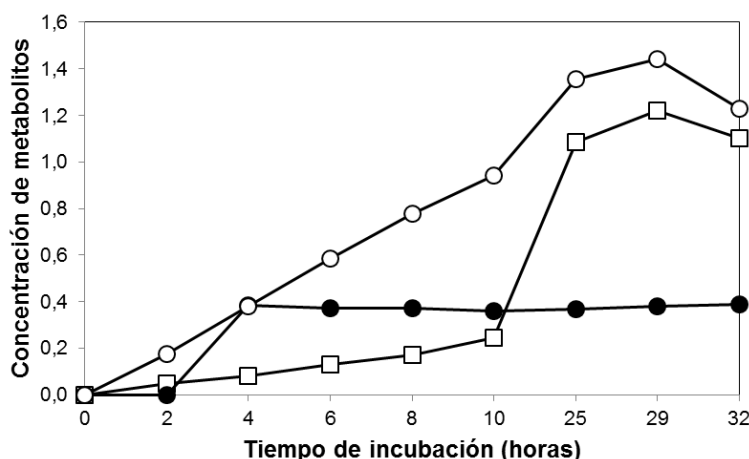


Figura 33. Acumulación de metabolitos por *Citreicella aestuarii* 357 tras inducción con naftaleno (0,1% p/v). Concentración de metabolitos: 3-maleilpiruvato (○, μM), salicilato (□, mM) y gentisato (●, μM).

Durante el crecimiento de la cepa 357 a expensas de naftaleno, y tras la detección del salicilato, empezaron a detectarse otros metabolitos intermediarios de la degradación (Figura 32), demostrándose químicamente la ruta catabólica de degradación de naftaleno a salicilato previamente propuesta a partir de los datos genómicos (Figura 23). Esta acumulación de metabolitos contrasta con la ausencia de metabolitos detectados en los análisis realizados con bacterias especialistas en la degradación de naftaleno, como es el caso de *P. stutzeri* AN10 (Lanfranconi *et al.*, 2009). La acumulación de metabolitos en *C. aestuarii* 357 sugiere que el flujo de éstos a través de las diferentes enzimas involucradas en la degradación de naftaleno no está optimizado, lo que ocurriría en un estadio temprano en la adquisición de determinantes genéticos relacionados con dicho metabolismo. De hecho, esto estaría en consonancia con el hecho de que en la cepa 357 no se mantenga el orden génico observado en la vía de degradación de naftaleno de *Ralstonia* sp. U2 (Figura 21). Además, en la cepa 357 no se encontraron genes reguladores en la proximidad de los genes catabólicos, a diferencia de lo que se ha observado en bacterias especialistas como *P. stutzeri* AN10 (Bosch *et al.*, 2000) y *Ralstonia* sp. U2 (Fuenmayor *et al.*, 1998), donde sendos reguladores transcripcionales (NahR y NagR, respectivamente) son los responsables de la expresión de los genes catabólicos en presencia de salicilato.

3.3.2. Degradación de dibenzotiofeno.

Tal como se ha mencionado anteriormente, hemos demostrado la capacidad de crecimiento de *C. aestuarii* 357 a expensas de di benzotiofeno como fuente única de carbono y energía (Tabla 19), así como la utilización de este compuesto como fuente de azufre (Tabla 21). Los datos genómicos revelaron la existencia de la vía degradativa de di benzotiofeno a 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (Figura 22), así como la existencia de una desulfurasa terminal que podría permitir su canalización a 2-hidroxibifenilo (Figura 28) aprovechándolo como fuente de azufre. Dada la acumulación de metabolitos detectada durante el crecimiento con dibenzotiofeno (Figura 27), decidimos detectarlos e identificarlos por HPLC. Así, durante el crecimiento a expensas de dibenzotiofeno como fuente única de carbono y energía, se detectó la acumulación de un único metabolito ($t_R = 4,8$ min) cuyo espectro de absorción permitió su identificación como 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (Figura Suplementaria S7) (Bressler y Fedorak, 2001a), el producto final de la transformación biótica descrita anteriormente (Figura 23), demostrando así que las enzimas involucrados en la degradación de naftaleno a salicilato también eran las responsables de la metabolización del dibenzotiofeno. De hecho, y tal como se muestra en la Figura 34, la acumulación de 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno se observó paralelamente al incremento de biomasa celular, alcanzándose el máximo de concentración de este compuesto ($0,43 \mu\text{M}$) al final del experimento.

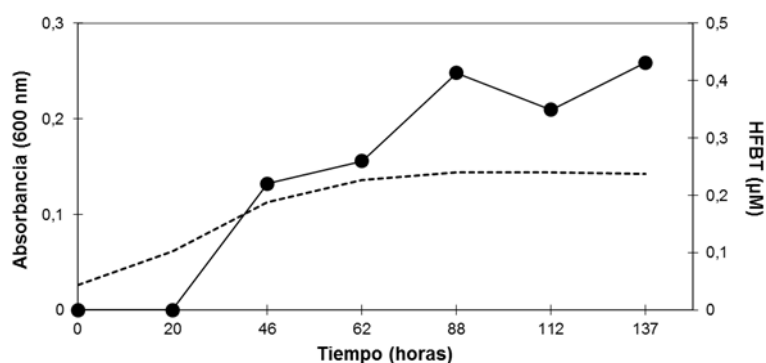


Figura 34. Cuantificación de la acumulación de metabolitos intermedios de la degradación de dibenzotiofeno por *C. aestuarii* 357. Línea discontinua, biomasa celular (A_{600}). Línea continua, concentración 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (HFBT, ●, μM).

Al igual que hicimos anteriormente con el naftaleno y el salicilato, pusimos en contacto biomasa celular de la cepa 357 con dibenzotiofeno en un intento de identificar otros metabolitos intermediarios. En este sentido pudimos detectar e identificar espectrofotométricamente un segundo metabolito intermediario de la degradación de dibenzotiofeno (Figura Suplementaria S7), el trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato ($t_R = 2,8$ min) (Bressler y Fedorak, 2001b), que se acumulaba en el medio de cultivo (Figura 35) y que, tal como se había sugerido tras el análisis genómico, generaba 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno al ser atacado por NagE (Figura 23). Finalmente, indicar que al final del experimento se observó un tercer metabolito acumulado en el sobrenadante que pudo ser identificado como 2-mercaptofenilglioxalato ($t_R = 2,0$ min) (Figura Suplementaria S7), y que es el resultado de la transformación abiótica del 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (Eaton y Nitterauer, 1994).

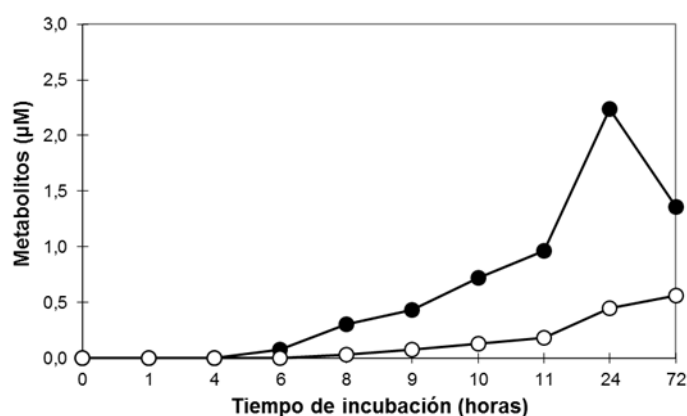


Figura 35. Acumulación de metabolitos por *Citreicella aestuarii* 357 tras inducción con dibenzotiofeno (0,1% p/v). Concentración de metabolitos: trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato (○, μM) y 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (●, μM).

Finalmente, decidimos analizar el sobrenadante de los cultivos realizados con la cepa 357 en el medio libre de azufre y suplementado con succinato como fuente de carbono y energía, y dibenzotiofeno como fuente de azufre. El análisis cromatográfico reveló, tal como habíamos observado en el crecimiento a expensas de dibenzotiofeno, la acumulación de trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato y 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (Figura 36). Sin embargo, el resultado más interesante se obtuvo al modificar las condiciones cromatográficas (ver “Materiales y métodos”) ya que se detectó un pico ($t_R =$

2,3 min) cuyo espectro de absorción permitió su identificación, por comparación con un estándar, como 2-hidroxibifenilo (Figura Suplementaria S8). La identificación de este compuesto, que alcanzó una concentración máxima de 0,06 μM a las 74 horas de experimento (Figura 36), demostraba la desulfurización del dibenzotiofeno, muy probablemente debida a la acción de la desulfurasa terminal DszA (ZP_10021459.1) anteriormente mencionada (Figura 28).

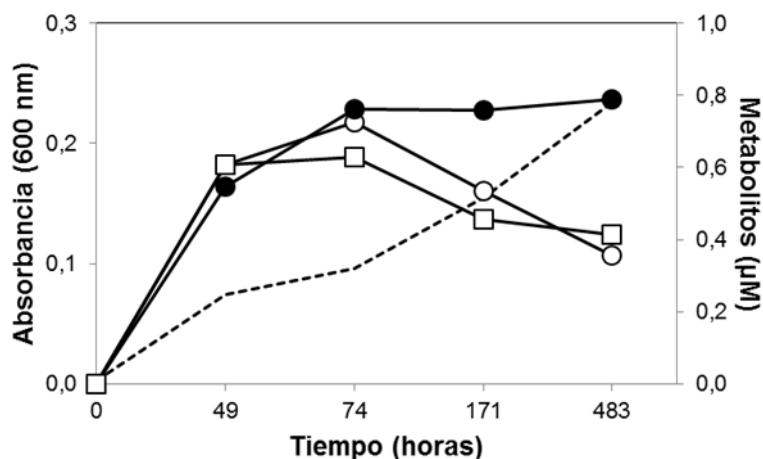


Figura 36. Cuantificación de metabolitos intermediarios acumulados durante la desulfurización de dibenzotiofeno por *C. aestuarii* 357. Línea discontinua, biomasa celular (A_{600}). Líneas continuas, concentración de metabolitos: trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionaftenil]-2-oxo-3-butenoato (\circ , μM), 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno (\bullet , μM) y 2-hidroxibifenilo (\square , $\times 10^{-1} \mu\text{M}$).

CONCLUSIONES

1. La caracterización taxonómica de la cepa 357 (filogenia del ADNr 16S, hibridación ADN-ADN y caracterización fenotípica) ha revelado su pertenencia a la especie *Citricella aestuarii*. Las únicas controversias taxonómicas con la cepa tipo de la especie, *C. aestuarii* AD8^T, han sido i) la capacidad de la cepa 357 de crecer a expensas de citrato como fuente única de carbono y energía; y ii) la presencia de flagelación polar monotrica en la cepa 357, a diferencia de la presencia de dos flagelos laterales en la cepa tipo de la especie.
2. El análisis filogenético realizado con las secuencias de las 61 proteínas conservadas en copia única en los 40 genomas del grupo *Roseobacter* utilizados ha revelado la adscripción de *C. aestuarii* 357 al clado filogenómico 3 descrito previamente por Newton y colaboradores (2010). Esta afiliación se ha visto corroborada por el análisis de semejanza genómica entre cepas (ANIb) y por la búsqueda del mejor homólogo en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI para cada una de las CDSs identificadas en el genoma de la cepa 357.
3. Desde el punto de vista metabólico, el análisis genómico ha revelado que *C. aestuarii* 357 es un microorganismo heterótrofo. Adicionalmente, la presencia de los genes *cox* y *sox* sugiere un metabolismo quimiolitotrofo a partir de monóxido de carbono y de tiosulfato, respectivamente. La presencia de los genes involucrados en la biosíntesis de una hidrogenasa dependiente de níquel revela la posibilidad adicional de oxidar H₂ para obtener energía.
4. El análisis genómico sugiere la posibilidad que *C. aestuarii* 357 pueda sintetizar cobalamina, tiamina y biotina, así como metabolitos secundarios con capacidad antimicrobiana o antifúngica, tales como antibióticos y péptidos no ribosomales. Estas evidencias genómicas dan pie a evaluar el uso de la cepa 357 en la producción de compuestos de interés biotecnológico.

5. El análisis genómico ha revelado la presencia en *C. aestuarii* 357 de las vías degradativas para el homogentisato y el gentisato. Junto a esta última se han encontrado los determinantes génicos necesarios para la degradación de naftaleno y dibenzotiofeno, a salicilato y 3-hidroxi-2-formilbenzotiofeno, respectivamente. La coexistencia de esta vía periférica de degradación junto a la vía de degradación del gentisato sugiere la canalización del salicilato producido a gentisato. Sin embargo, no se ha podido identificar genéticamente la presencia de una salicilato 1,5-hidroxilasa, enzima responsable de la transformación del salicilato a gentisato. En cualquier caso, la cepa 357 es el primer miembro del grupo *Roseobacter* para el que se ha descrito genéticamente una vía periférica de degradación.
6. Se ha demostrado fisiológicamente la capacidad de *C. aestuarii* 357 de crecer a expensas de naftaleno, dibenzotiofeno, salicilato y gentisato como fuentes únicas de carbono y energía. El análisis realizado ha demostrado la toxicidad del salicilato, y ha permitido definir a la cepa 357 como un microorganismo degradador de gentisato.
7. El análisis químico de los intermediarios acumulados durante los experimentos de crecimiento a expensas de hidrocarburos aromáticos ha confirmado que la degradación de dibenzotiofeno se realiza mayoritariamente por la vía Kodama rindiendo 3-hidroxi-2-formilbenzotiofeno. Sin embargo, también se ha observado la acumulación de 2-hidroxibifenilo, lo que sugiere un aprovechamiento del dibenzotiofeno como fuente de azufre. En este sentido se ha identificado una posible desulfurasa terminal que podría estar involucrada en la desulfurización del dibenzotiofeno.
8. La identificación de intermediarios de degradación en los cultivos realizados con naftaleno, salicilato y gentisato ha demostrado que la metabolización de naftaleno se realiza a través de estos dos compuestos químicos. Así, a pesar de no haberse identificado genéticamente una salicilato 1,5-hidroxilasa, la acumulación de gentisato observada a partir de

naftaleno y salicilato como fuentes únicas de carbono y energía demuestran la existencia de esta enzima. El análisis genómico ha identificado cuatro posibles candidatos para llevar a cabo la transformación del salicilato a g entisato: la propia naftaleno 1,2-dioxigenasa, dos homólogos a ésta anotados como proteínas con centro activo Rieske 2FE-2S, y una monooxigenasa FAD-dependiente conservada en todos los miembros del grupo *Roseobacter*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adebusuyi AA, Smith AY, Gray MR, Foght JM (2012) The EmhABC efflux pump decreases the efficiency of phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas fluorescens* strain LP6a. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 757–766.
- Aguiló-Ferretjans MM, Bosch R, Martín-Cardona C, Lalucat J, Nogales B (2008) Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain). *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 231–240.
- Akerlund T, Nordström K, Bernander R (1995) Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 6791–6797.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- Ayers M, Howell PL, Burrows LL (2010) Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries. *Future Microbiol.* 5: 1203–1218.
- Barabas O, Ronning DR, Guynet C, Hickman AB, Ton-Hoang B, Chandler M, Dyda F (2008) Mechanism of IS200/IS605 family DNA transposases: activation and transposon-directed target site selection. *Cell* 132: 208–220.
- Barz M, Beimgraben C, Staller T, Germer F, Opitz F, Marquardt C, Schwarz C, Gutekunst K, Vanselow KH, Schmitz R, LaRoche J, Schulz R, Appel J (2010) Distribution analysis of hydrogenases in surface waters of marine and freshwater environments. *PLoS One.* 5: e13846.
- Berger M, Brock NL, Liesegang H, Dogs M, Preuth I, Simon M, Dickschat JS, Brinkhoff T (2012) Genetic analysis of the upper phenylacetate catabolic pathway in the production of tropodithietic acid by *Phaeobacter gallaeciensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 3539–3551.
- Biebl H, Allgaier M, Tindall BJ, Koblizek M, Lünsdorf H, Pukall R, Wagner-Döbler I (2005) *DinoRoseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1089–1096.
- Biers EJ, Wang K, Pennington C, Belas R, Chen F, Moran MA (2008) Occurrence and expression of gene transfer agent genes in marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2933–2939.

- Bosch R, García-Valdés E, Moore ER (1999a) Genetic characterization and evolutionary implications of a c hromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* 236: 149–157.
- Bosch R, García-Valdés E, Moore ER (2000) Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. *Gene* 245: 65–74.
- Bosch R, Moore ER, García-Valdés E, Pieper DH (1999b) NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* 181: 2315–2322.
- Brakstad OG, Lødeng AGG (2005) Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microb. Ecol.* 49: 94–103.
- Bressler DC, Fedorak PM (2001a) Purification, stability, and mineralization of 3-hydroxy-2-formylbenzothiophene, a metabolite of dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 821–826.
- Bressler DC, Fedorak PM (2001b) Identification of disulfides from the biodegradation of dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5084–5093.
- Brinkhoff T, Bach G, Heidorn T, Liang L, Schlingloff A, Simon M (2004) Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2560–2565.
- Brinkhoff T, Giebel HA, Simon M (2008) Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Arch Microbiol.* 189: 531–539.
- Brito EM, Guyoneaud R, Goñi-Urriza M, Ranchou-Peyruse A, Verbaere A, Crapez MA, Wasserman JC, Duran R (2006) Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res Microbiol.* 157: 752–62.
- Brokx SJ, Rothery RA, Zhang G, Ng DP, Weiner JH (2005) Characterization of an *Escherichia coli* sulfite oxidase homologue reveals the role of a conserved active site cysteine in assembly and function. *Biochemistry.* 44:10339–10348.

- Brown MR, Kornberg A (2008) The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem. Sci.* 33: 284–290.
- Bruhn JB, Nielsen KF, Hjelm M, Hansen M, Bresciani J, Schulz S, Gram L (2005). Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the *Roseobacter* clade. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7263–7270.
- Brunet-Galmés I, Busquets A, Peña A, Gomila M, Nogales B, García-Valdés E, Lalucat J, Bennasar A, Bosch R (2012) Complete genome sequence of the naphthalene-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* AN10 (CCUG 29243). *J. Bacteriol.* 194: 6642–6643.
- Buchan A, Collier LS, Neidle EL, Moran MA (2000) Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4662–4672.
- Buchan A, González JM (2010) *Roseobacter*. En: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. (Ed. Timmis KN) Springer-Verlag; Berlin. Pp. 1335–1343.
- Buchan A, González JM, Moran MA (2005) Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5665–5677.
- Cai M, Wang L, Cai H, Li Y, Tang YQ, Wu XL (2011) *Rubrimonas shengliensis* sp. nov. and *Polymorphum gilvum* gen. nov., sp. nov., novel members of *Alphaproteobacteria* from crude oil contaminated saline soil. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 321–327.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17: 540–552
- Chandler M, Mahillon J (2002) Insertion sequences revisited. En: *Mobile DNA II* Craig NL et al. Eds. ASM Press. Pp. 305–366.
- Christie-Oleza JA, Armengaud J (2010) In-depth analysis of exoproteomes from marine bacteria by shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 case-study. *Mar. Drugs.* 8: 2223–2239.
- Christie-Oleza JA, Piña-Villalonga JM, Bosch R, Nogales B, Armengaud J (2012) Comparative proteogenomics of twelve *Roseobacter* exoproteomes reveals different adaptive strategies among these marine bacteria. *Mol. Cell. Proteomics.* 11: M111.013110.

- Coulon F, Mckew BA, Osborn AM, McGenity TJ, Timmis KN (2007) Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ. Microbiol.* 9: 177–186.
- Crawford RL, Hutton SW, Chapman PJ (1975) Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis*. *J. Bacteriol.* 121: 794–799.
- Denome SA, Oldfield C, Nash LJ, Young KD (1994) Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *J. Bacteriol.* 176: 6707–6716.
- Denome SA, Stanley DC, Olson ES, Young KD (1993) Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.* 175: 6890–6901.
- Eaton RW, Chapman PJ (1992) Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J. Bacteriol.* 174: 7542–7554.
- Eaton RW, Nitterauer JD (1994) Biotransformation of benzothiophene by isopropylbenzene-degrading bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 3992–4002.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164–166.
- Fisher DJ, Fernández RE, Adams NE, Maurelli AT (2012) Uptake of biotin by *Chlamydia* spp. through the use of a bacterial transporter (BioY) and a host-cell transporter (SMVT). *PLoS One* 7: e46052.
- Fuenmayor SL, Wild M, Boyes AL, Williams PA (1998) A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *J. Bacteriol.* 180: 2522–2530.
- Guindon S, Delsuc F, Dufayard JF, Gascuel O (2009) Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Methods Mol. Biol.* 537: 113–137.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 81–91.

- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D, Watanabe K (2007) Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes Environ.* 22: 412–415.
- Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D, Watanabe K (2008) *Tranquillimonas alkanivorans* gen. nov., sp. nov., an alkanane-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2118–2121.
- Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D, Watanabe K (2009) *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 392–396.
- Hayes CS, Aoki SK, Low DA (2010) Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu. Rev. Genet.* 44: 71–90.
- Hilz H, Lipmann F (1955) The enzymatic activation of sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41: 880–890.
- Hintner JP, Lechner C, Riegert U, Kuhm AE, Storm T, Reemtsma T, Stolz A (2001) Direct ring fission of salicylate by a salicylate 1,2-dioxygenase activity from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*. *J. Bacteriol.* 183: 6936–6942.
- Hintner JP, Reemtsma T, Stolz A (2004) Biochemical and molecular characterization of a ring fission dioxygenase with the ability to oxidize (substituted) salicylate(s) from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*. *J. Biol. Chem.* 279: 37250–37260.
- Hirano S, Haruki M, Takano K, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S (2006) Gene cloning and in vivo characterization of a dibenzothiophene dioxygenase from *Xanthobacter polyaromaticivorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 672–681.
- Hirano S, Kitauchi F, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S (2004) Isolation and characterization of *Xanthobacter polyaromaticivorans* sp. nov. 127W that degrades polycyclic and heterocyclic aromatic compounds under extremely low oxygen conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 557–564.
- Holland IB, Schmitt L, Young J (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol. Membr. Biol.* 22: 29–39.

- Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, Li W (2010) CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26: 680–682.
- Jiang Y, Yang X, Liu B, Zhao H, Cheng Q, Cai B (2004) Catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain ND6: gene sequence and enzyme characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 1798–1800.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Applic. Biosci.* 8: 275–282.
- Jones RM, Britt-Compton B, Williams PA (2003) The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are on operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* 185: 5847–5853.
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. *En: Mammalian protein metabolism* (Ed. Munro HN). Academic Press, New York, USA, pp. 21–132.
- King GM, Weber CF (2007) Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 107–118.
- Kodama K, Umehara K, Shimizu K, Nakatami S, Minoda Y, Yamada K (1973) Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathways. *Agric. Biol. Chem.* 37: 45–50.
- Konstantinidis KT, Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 2567–2572.
- Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WG (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 336–351.
- Kraft B, Strous M, Tegetmeyer HE (2011) Microbial nitrate respiration: genes, enzymes and environmental distribution. *J. Biotechnol.* 155: 104–117.
- Krawiec S (1990) Bacterial desulfurization of thiophenes: screening techniques and some speculations regarding the biochemical and genetic basis. *Dev. Ind. Microbiol.* 31: 103–113.
- Kuhm AE, Stolz A, Ngai KL, Knackmuss HJ (1991) Purification and characterization of a 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from a bacterium that degrades naphthalenesulfonic acids. *J. Bacteriol.* 173: 3795–3802.

- Lai Q, Fu Y, Wang J, Chen S, Zhong H, Sun F, Shao Z (2011) *Citricella marina* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 728–731.
- Lalucat J (1988) Analysis of refractile (R) bodies. *En: Methods in Microbiology*. Volume 20. Electron microscopy in microbiology (Ed. Mayer F). Academic Press, New York, USA, pp. 79–90.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *En: Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Eds. Stackebrandt E, Goodfellow M). Wiley, New York, USA, pp. 115–175.
- Lanfranconi MP, Bosch R, Nogales B (2010) Short-term changes in the composition of active marine bacterial assemblages in response to diesel oil pollution. *Microb. Biotechnol.* 3: 607–621.
- Lanfranconi MP, Christie-Oleza JA, Martín-Cardona C, Suárez-Suárez LY, Lalucat J, Nogales B, Bosch R (2009) Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *FEMS Microbiol. Lett.* 300: 265–272.
- Lang AS, Beatty JT (2000) Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 859–864.
- Le Faou A, Rajagopal BS, Daniels L, Fauque G (1990). Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. *FEMS Microbiol. Rev.* 6: 351–381
- Lei B, Tu SC (1996) Gene overexpression, purification, and identification of a desulfurization enzyme from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 as a sulfide/sulfoxide monooxygenase. *J. Bacteriol.* 178: 5699–5705.
- Leung MM, Florizone SM, Taylor TA, Lang AS, Beatty JT (2010) The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 675: 253–264.
- Li S, Li X, Zhao H, Cai B (2011) Physiological role of the novel salicylaldehyde dehydrogenase NahV in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas putida* ND6. *Microbiol. Res.* 166: 643–653.
- Li W, Shi J, Wang X, Han Y, Tong W, Ma L, Liu B, Cai B (2004) Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Gene* 336: 231–240.

- Li S, Zhao H, Li Y, Niu S, Cai B (2012) Complete genome sequence of the naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* strain ND6. *J. Bacteriol.* 194: 5154–5155.
- Li S, Zhao H, Li Y, Niu S, Cai B (2013) Complete nucleotide sequence of plasmid pND6-2 from *Pseudomonas putida* ND6 and characterization of conjugative genes. *Gene* 512: 148–156.
- Li SG, Tang YQ, Nie Y, Cai M, Wu XL (2011) Complete genome sequence of *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1^T, a crude oil-degrading bacterium from oil-polluted saline soil. *J. Bacteriol.* 193: 2894–2895.
- Lotierzo M, Tse Sum Bui B, Florentin D, Escalettes F, Marquet A (2005) Biotin synthase mechanism: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 820–823
- Luque-Almagro VM, Gates AJ, Moreno-Vivián C, Ferguson SJ, Richardson DJ, Roldán MD (2011) Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 2011 39: 1838–1843.
- Ma Y, Xiong H, Tang S, Yang Q, Li M (2009) Comparison of the community structure of planktonic bacteria in ballast water from entry ships and local sea water in Xiamen Port. *Prog. Nat. Sci.* 19: 947–953.
- Markowitz VM, Chen IM, Palaniappan K, Chu K, Szeto E, Grechkin Y, Ratner A, Jacob B, Huang J, Williams P, Huntemann M, Anderson I, Mavromatis K, Ivanova NN, Kyrpides NC (2012) IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res.* 40: D115–D122.
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from organisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208–218.
- Martens T, Gram L, Grossart HP, Kessler D, Müller R, Simon M, Wenzel SC, Brinkhoff T (2007) Bacteria of the *Roseobacter* clade show potential for secondary metabolite production. *Microb. Ecol.* 54: 31–42.
- Martin-Cardona C (2009) Versatilidad genético-fisiológica en poblaciones de *Pseudomonas stutzeri* AN10 sometidas a estrés químico por salicilato. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears (UIB).
- Matsubara T, Ohshiro T, Nishina Y, Izumi Y (2001) Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1179–1184.

- McKew BA, Coulon F, Osborn AM, Timmis KN, McGenity TJ (2007) Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ. Microbiol.* 9: 165–176.
- Miller TR, Hnilicka K, Dziedzic A, Desplats P, Belas R (2004) Chemotaxis of *Silicibacter* sp. strain TM1040 toward dinoflagellate products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4692–4701.
- Montersino S, van Berkel WJ (2012) Functional annotation and characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochim. Biophys. Acta* 1824: 433–442.
- Moran MA, Belas R, Schell MA, González JM, Sun F, Sun S, Binder BJ, Edmonds J, Ye W, Orcutt B, Howard EC, Meile C, Palefsky W, Goesmann A, Ren Q, Paulsen I, Ulrich LE, Thompson LS, Saunders E, Buchan A (2007) Ecological genomics of marine *Roseobacters*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4559–4569.
- Moran MA, Buchan A, González JM, Heidelberg JF, Whitman WB, Kiene RP, Henriksen JR, King GM, Belas R, Fuqua C, Brinkac L, Lewis M, Johri S, Weaver B, Pai G, Eisen JA, Rahe E, Sheldon WM, Ye W, Miller TR, Carlton J, Rasko DA, Paulsen IT, Ren Q, Daugherty SC, Deboy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Nelson WC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Haft DH, Selengut J, Ward N (2004) Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature.* 432: 910–913.
- Moran MA, González JM, Kiene RP (2003) Linking a bacterial taxon to sulfur cycling in the sea: studies of the marine *Roseobacter* group. *Geomicrobiol. J.* 20: 375–388.
- Moran MA, Miller WL (2007) Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 792–800.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa A, Kanehisa M (2007) KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res.* 35: W182–W185.
- Neumann G, Veeranagouda Y, Karegoudar TB, Sahin O, Mäusezahl I, Kabelitz N, Kappelmeyer U, Heipieper HJ (2005) Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles* 9: 163–168.

- Newton RJ, Griffin LE, Bowles KM, Meile C, Gifford S, Givens CE, Howard EC, King E, Oakley CA, Reisch CR, Rinta-Kanto JM, Sharma S, Sun S, Varaljay V, Vila-Costa M, Westrich JR, Moran MA (2010) Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J.* 4: 784–798.
- Nogales B, Aguiló-Ferretjans MM, Martín-Cardona C, Lalucat J, Bosch R (2007) Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. *Environ. Microbiol.* 9: 1913–1929.
- Park MS, Chung BS, Lee H J, Jin HM, Lee SS, Oh YK, Jeon CO (2011) *Citricella aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2595–2599.
- Peng RH, Xiong AS, Xue Y, Fu XY, Gao F, Zhao W, Tian YS, Yao QH (2008) Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 927–955.
- Piddington CS, Kovacevich BR, Rambosek J (1995) Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 468–475.
- Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28: 1823–1829.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35: 7188–7196.
- Pugsley AP (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50–108.
- Richter M, Rosselló-Móra R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 19126–19131.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425
- Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* 20: 275–287.
- Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J (2011) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat. Chem.* 3: 331–335.

- Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34: D32–D36.
- Slightom RN, Buchan A (2009) Surface colonization by marine *Roseobacters*: integrating genotype and phenotype. *Appl Environ Microbiol.* 75 :6027–6037.
- Sobecky PA, Hazen TH (2009) Horizontal gene transfer and mobile genetic elements in marine systems. *Methods. Mol. Biol.* 532: 435–453.
- Sorokin DY, Tourova TP, Muyzer G (2005) *Citreicella thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel lithoheterotrophic sulfur-oxidizing bacterium from the Black Sea. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 679–687.
- Suemori A, Nakajima K, Kurane R, Nakamura Y (1995) Physicochemical and immunochemical characterization of salicylate 5-hydroxylase, m-hydroxybenzoate 6-hydroxylase and p-hydroxybenzoate 3-hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis*. *Biotechnol. Lett.* 17: 1063–1068.
- Thrash JC, Cho JC, Ferriera S, Johnson J, Vergin KL, Giovannoni SJ (2010a) Genome sequences of *Pelagibaca bermudensis* HTCC2601^T and *Maritimibacter alkaliphilus* HTCC2654^T, the type strains of two marine *Roseobacter* genera. *J. Bacteriol.* 192: 5552–5553.
- Thrash JC, Cho JC, Vergin KL, Giovannoni SJ (2010b) Genome sequences of *Oceanicola granulosus* HTCC2516^T and *Oceanicola batsensis* HTCC2597^T. *J. Bacteriol.* 192: 3549–3550.
- Tindall BJ, Kämpfer P, Euzéby JP, Oren A (2006) Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2715–2720.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876–4882.
- Tøndervik A, Bruheim P, Berg L, Ellingsen TE, Kotlar HK, Valla S, Throne-Holst M (2012) *Ralstonia* sp. U2 naphthalene dioxygenase and *Comamonas* sp. JS765 nitrobenzene dioxygenase show differences in activity towards methylated naphthalenes. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 173–178.
- Ullrich R, Hofrichter M (2007) Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64: 271–293.

- Wagner-Döbler I, Ballhausen B, Berger M, Brinkhoff T, Buchholz I, Bunk B, Cypionka H, Daniel R, Drepper T, Gerdts G, Hahnke S, Han C, Jahn D, Kalhoefer D, Kiss H, Klenk HP, Kyripides N, Liebl W, Liesegang H, Meincke L, Pati A, Petersen J, Piekarski T, Pommerenke C, Pradella S, Pukall R, Rabus R, Stackebrandt E, Thole S, Thompson L, Tielen P, Tomasch J, von Jan M, Wanphrut N, Wichels A, Zech H, Simon M (2010) The complete genome sequence of the algal symbiont *DinoRoseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *ISME J.* 4: 61–77.
- Wagner-Döbler I, Biebl H (2006) Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 255–280.
- Wagner-Döbler I, Rheims H, Felske A, El-Ghezal A, Flade-Schröder D, Laatsch H, Lang S, Pukall R, Tindall BJ (2004) *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a North Sea alphaproteobacterium that produces bioactive metabolites. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1177–1184.
- Wagner-Döbler I, Thiel V, Eberl L, Allgaier M, Bodor A, Meyer S, Ebner S, Hennig A, Pukall R, Schulz S (2005) Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem.* 6: 2195–2206.
- Weiner JH, Maclsaac DP, Bishop RE, Bilous PT (1988) Purification and properties of *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase, an iron-sulfur molybdoenzyme with broad substrate specificity. *J. Bacteriol.* 170: 1505–1510.
- Zhang R, Liu B, Lau SCK, Ki JS, Qian PY (2007) Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61: 496–508.
- Zhang R, Lau SCK, Ki JS, Thiyagarajan V, Qian PY (2009) Response of bacterioplankton community structures to hydrological conditions and anthropogenic pollution in contrasting subtropical environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69: 449–460.
- Zhao H, Chen D, Li Y, Cai B (2005) Overexpression, purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Microbiol. Res.* 160: 307–313.

-
- Zhao Y, Wang K, Budinoff C, Buchan A, Lang A, Jiao N, Chen F (2009) Gene transfer agent (GTA) genes reveal diverse and dynamic *Roseobacter* and *Rhodobacter* populations in the Chesapeake Bay. *ISME J.* 3: 364–373.
- Zhou NY, Al-Dulayymi J, Baird MS, Williams PA (2002) Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: a monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* 184: 1547–1555.
- Zhou NY, Fuenmayor SL, Williams PA (2001) *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* 183: 700–708.
- Ziemke F, Höfle MG, Lalucat J, Rosselló-Mora R (1998) Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 179–186.

ANEXO I.
FIGURAS SUPLEMENTARIAS

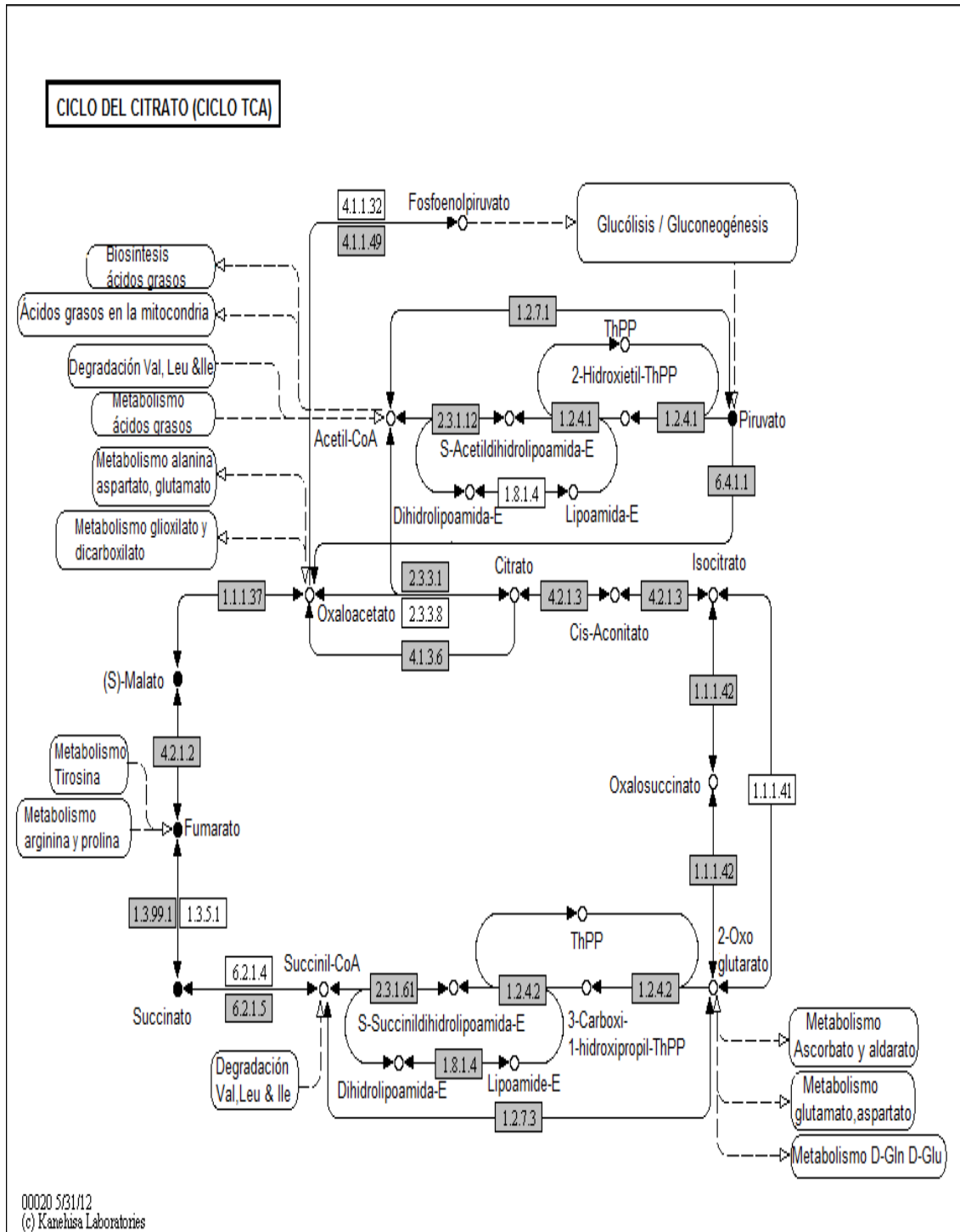


Figura S1. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos de *Citreicella aestuarii* 357. Las proteínas ubicadas en cajas grises son las identificadas en el genoma de la cepa 357. En la Tabla Suplementaria S9 se puede consultar el número de acceso de las mismas en la base de datos RefSeq del NCBI, así como el producto asignado atendiendo al sistema automático de anotación del NCBI. Esquema modificado de KAAS de KEGG.

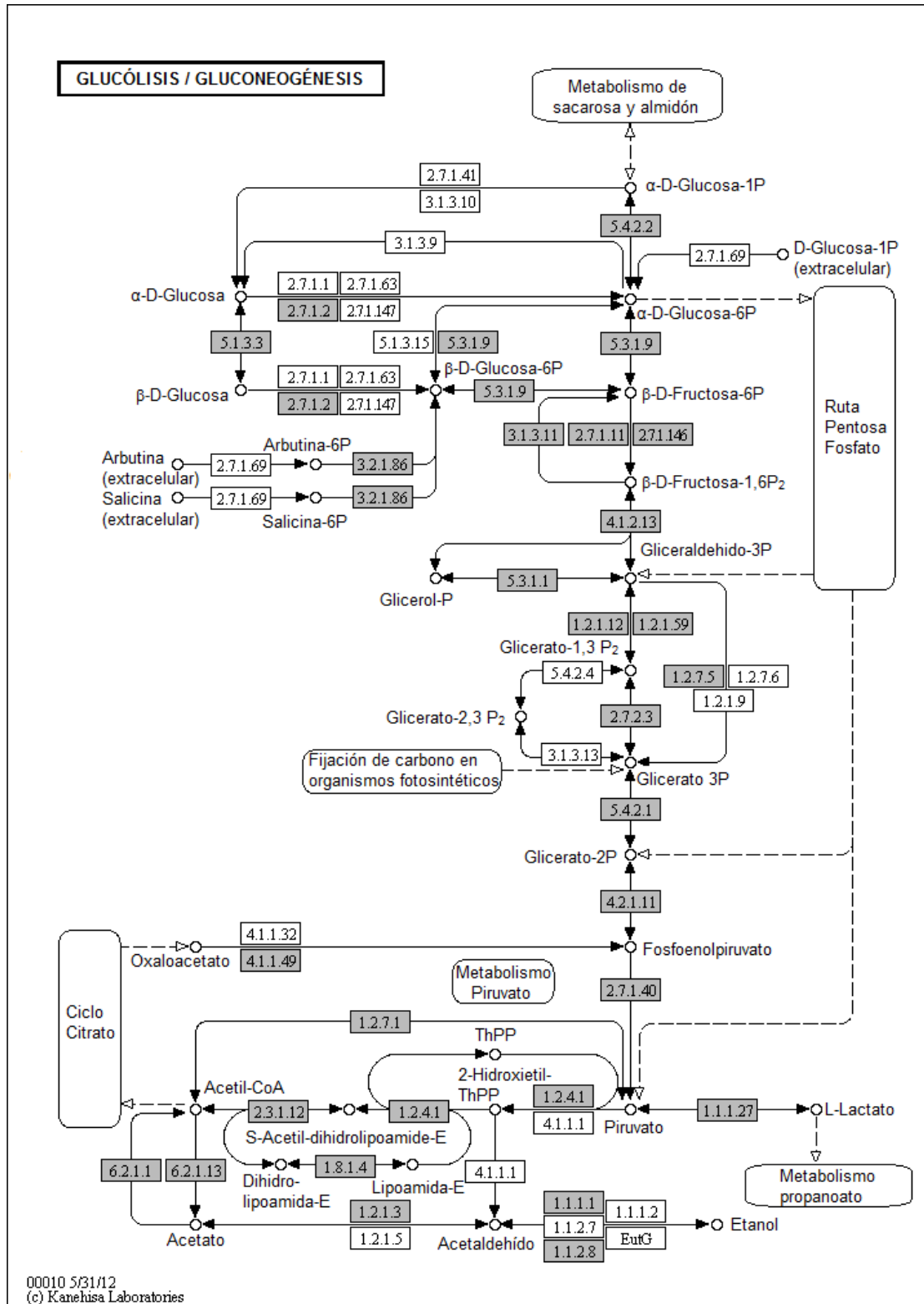


Figura S2. Glucólisis/gluconeogénesis de *Citreicella aestuarii* 357. Las proteínas ubicadas en cajas grises son las identificadas en el genoma de la cepa 357. En la Tabla Suplementaria S9 se puede consultar el número de acceso de las mismas en la base de datos RefSeq del NCBI, así como el producto asignado atendiendo al sistema automático de anotación del NCBI. Esquema modificado de KAAS de KEGG.

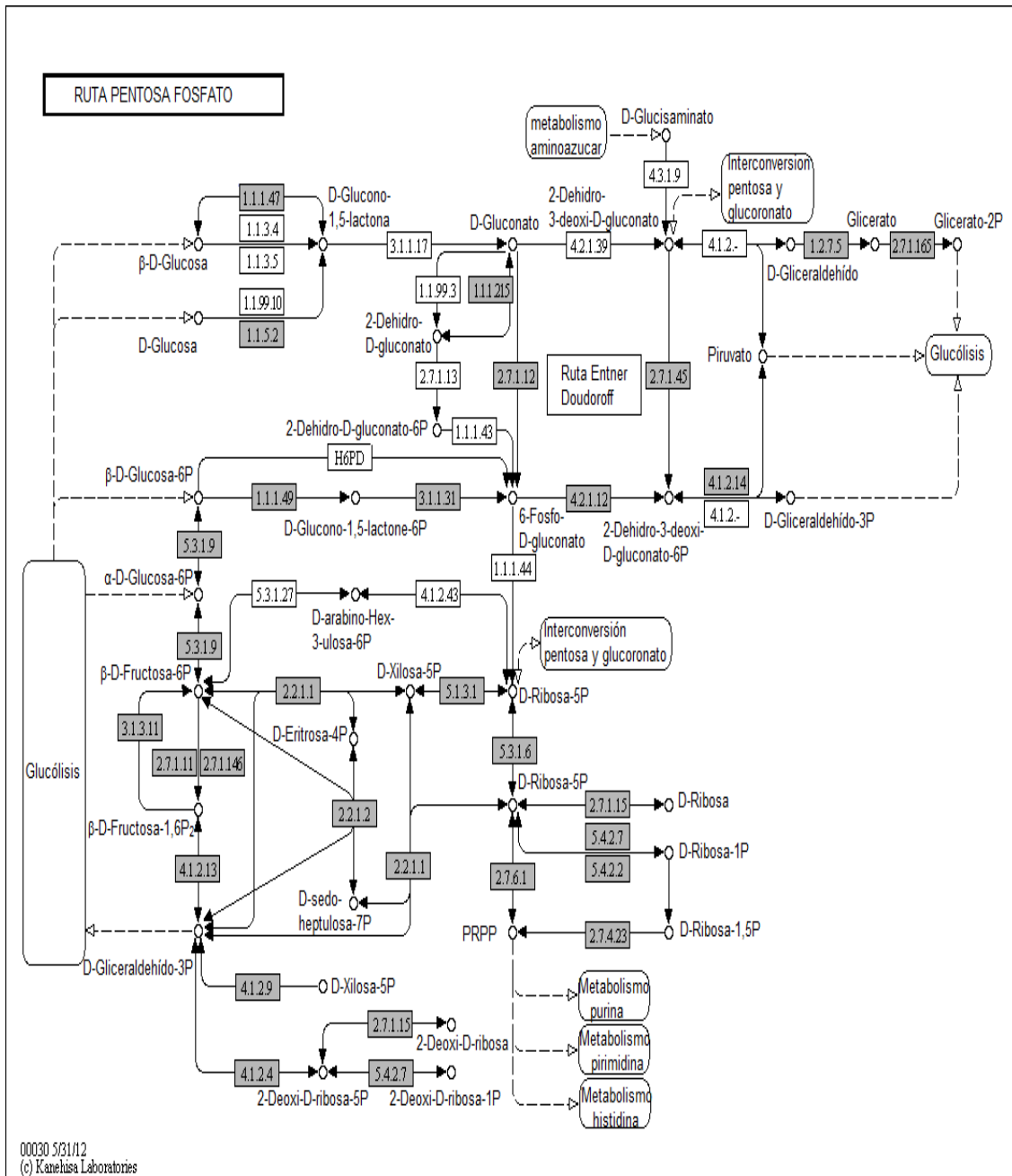


Figura S3. Ruta de las pentosas fosfato y ruta de Entner-Doudoroff de *Citreicella aestuarii* 357. Las proteínas ubicadas en cajas grises son las identificadas en el genoma de la cepa 357. En la Tabla Suplementaria S9 se puede consultar el número de acceso de las mismas en la base de datos RefSeq del NCBI, así como el producto asignado atendiendo al sistema automático de anotación del NCBI. Esquema modificado de KAAS de KEGG.

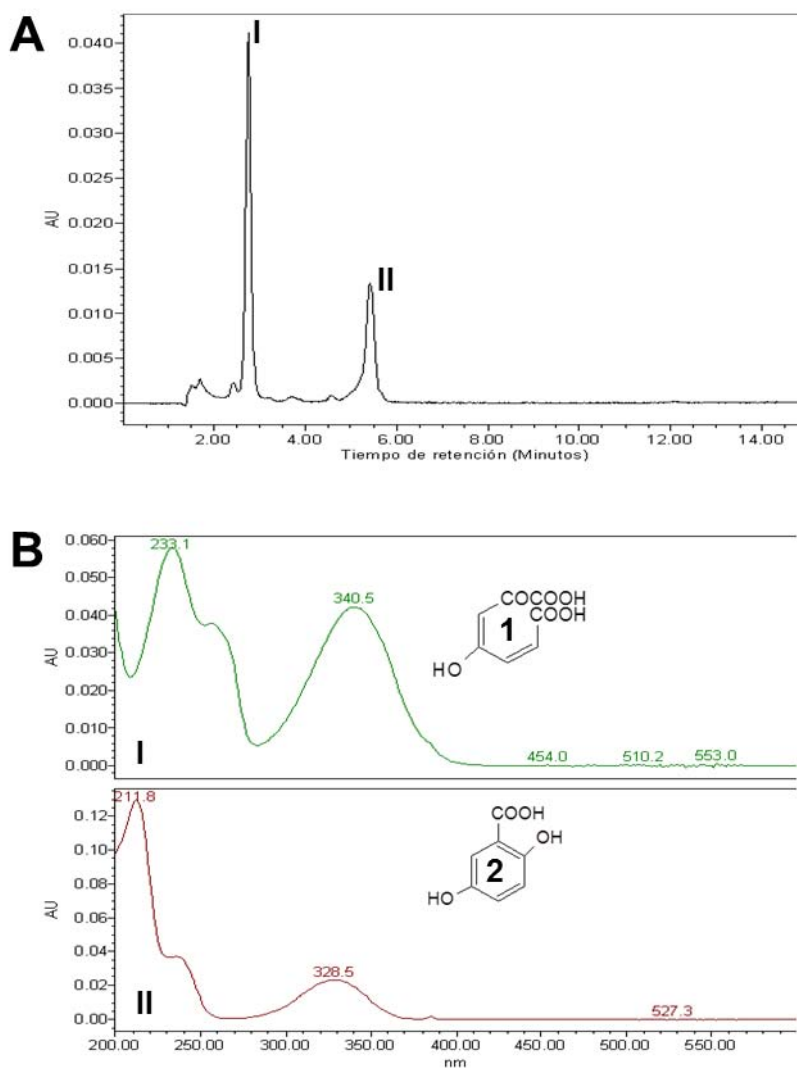


Figura S4. Identificación de metabolitos intermediarios de la degradación de gentisato por *Citricella aestuarii* 357. A) Cromatograma a una absorbancia de 330 nm. Pico I: tiempo de retención, 2,7 min; pico II: tiempo de retención, 5,8 min. B) espectro de absorción correspondiente a los picos I, característico de 3-maleilpiruvato (1), y II, característico de gentisato (2).

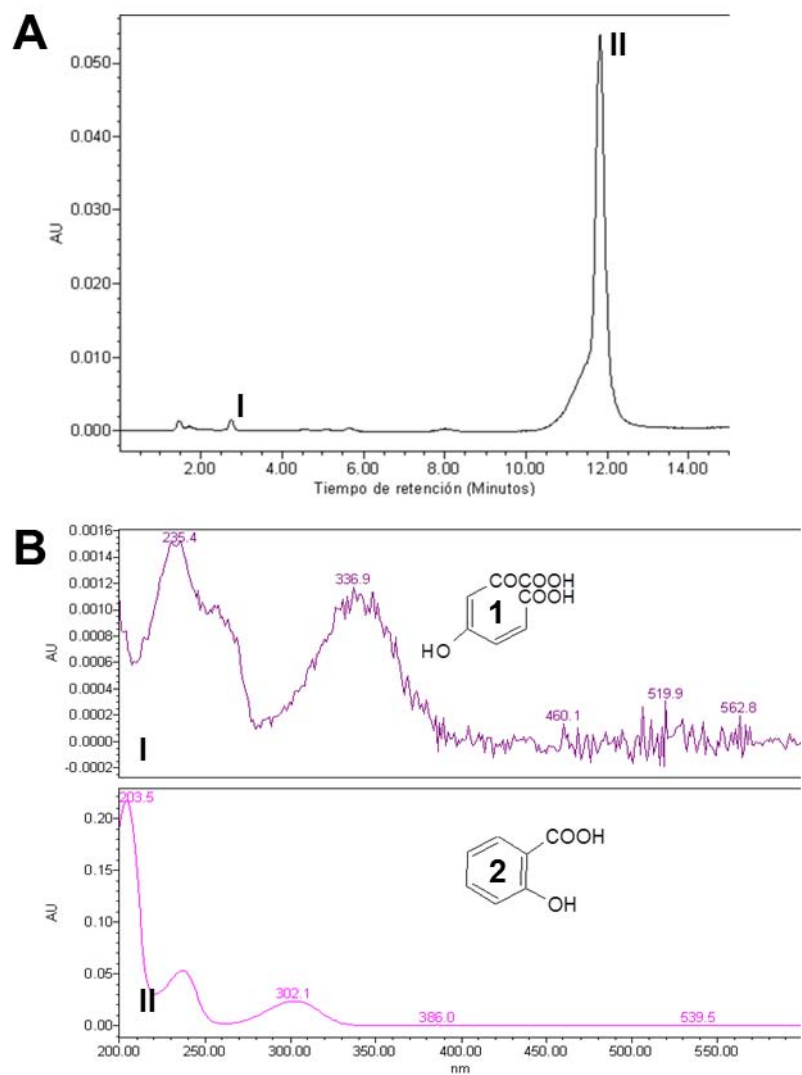


Figura S5. Identificación de metabolitos intermedios de la degradación de salicilato por *Citricella aestuarii* 357. A) Cromatograma a una absorbancia de 330 nm. Pico I: tiempo de retención, 2,7 min; pico II: tiempo de retención, 11,7 min. B) Espectro de absorción correspondiente a I, característico de 3-maleilpiruvato (1); y II, característico de salicilato (2).

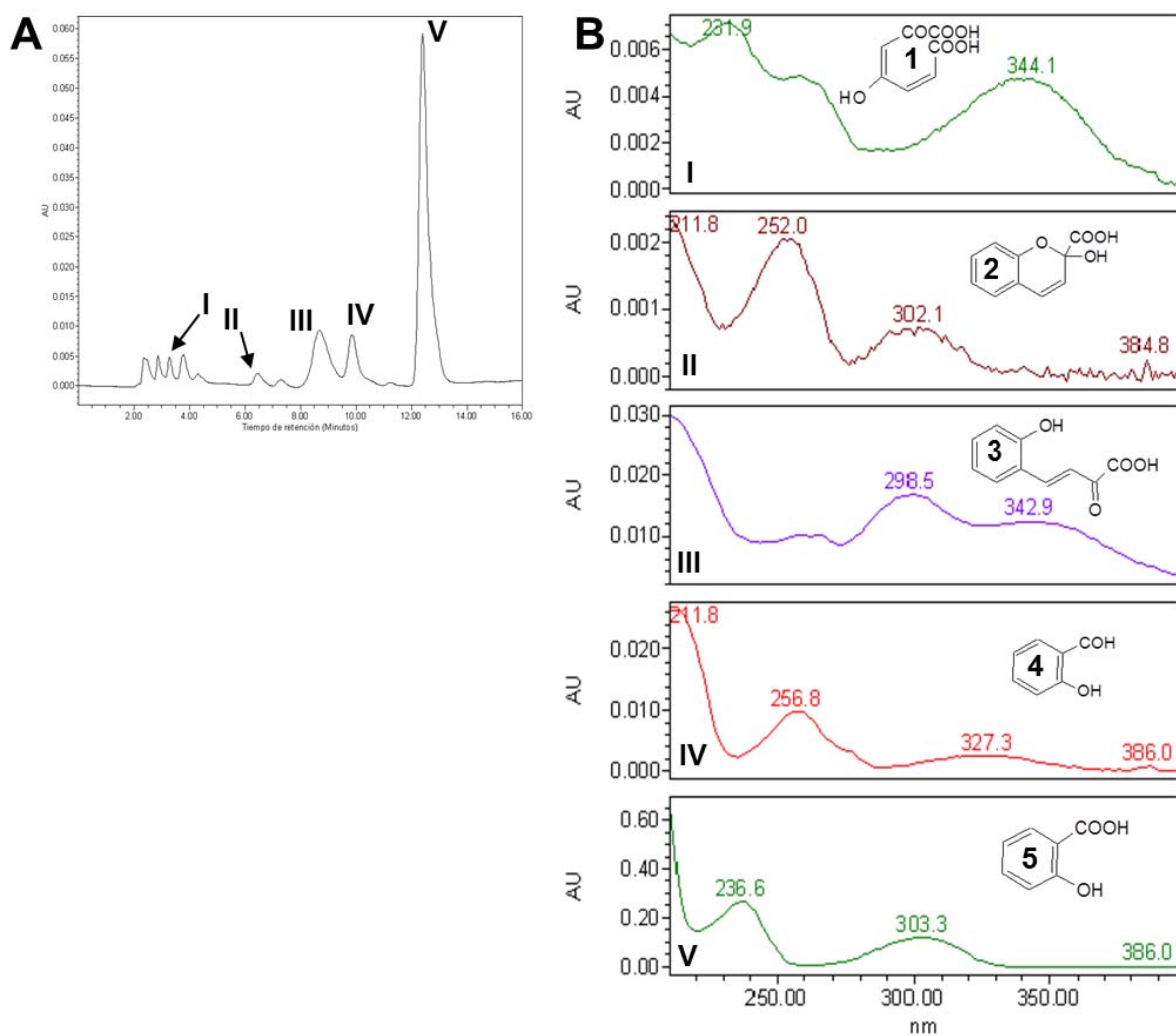


Figura S6. Identificación de metabolitos intermedios de la degradación de naftaleno por *Citreicella aestuarii* 357. A) Cromatograma a una absorbancia de 330 nm. Pico I: tiempo de retención, 3,3 min; pico II: tiempo de retención, 6,5 min; pico III: tiempo de retención, 8,7 min; pico IV: tiempo de retención, 9,9 min; pico V: tiempo de retención, 12,4 min. B) Espectro de absorción correspondiente a los picos I, característico de 3-maleilpiruvato (1); II, característico de 2-hidroxicromeno-2-carboxilato (2); III, característico de trans-o-hidroxibenzilideno piruvato (3); IV, característico de salicilaldehido (4); y V, característico de salicilato (5).

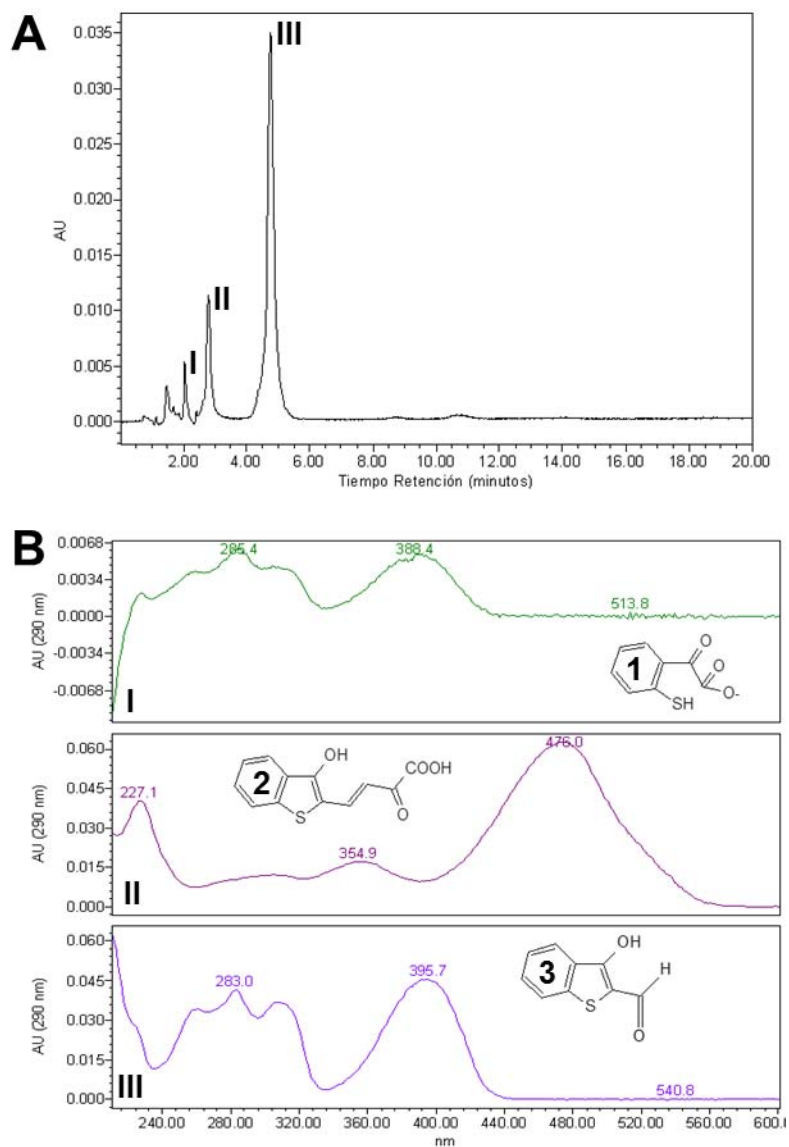


Figura S7. Identificación de metabolitos intermediarios de la degradación de dibenzotiofeno por *Citreicella aestuarii* 357. A) Cromatograma a una absorbancia de 290 nm. Pico I: tiempo de retención, 2,0 min; pico II: tiempo de retención, 2,8 min; pico III: tiempo de retención, 4,8 min. B) Espectro de absorción correspondiente a los picos I, característico del 2-mercaptofenilgloxalato (1); II, característico del trans-4-[2-(3-hidroxi)-tionafeni]-2-oxo-3-butenoato (2); y III, característico del 3-hidroxi-2-formil-benzotieno (3).

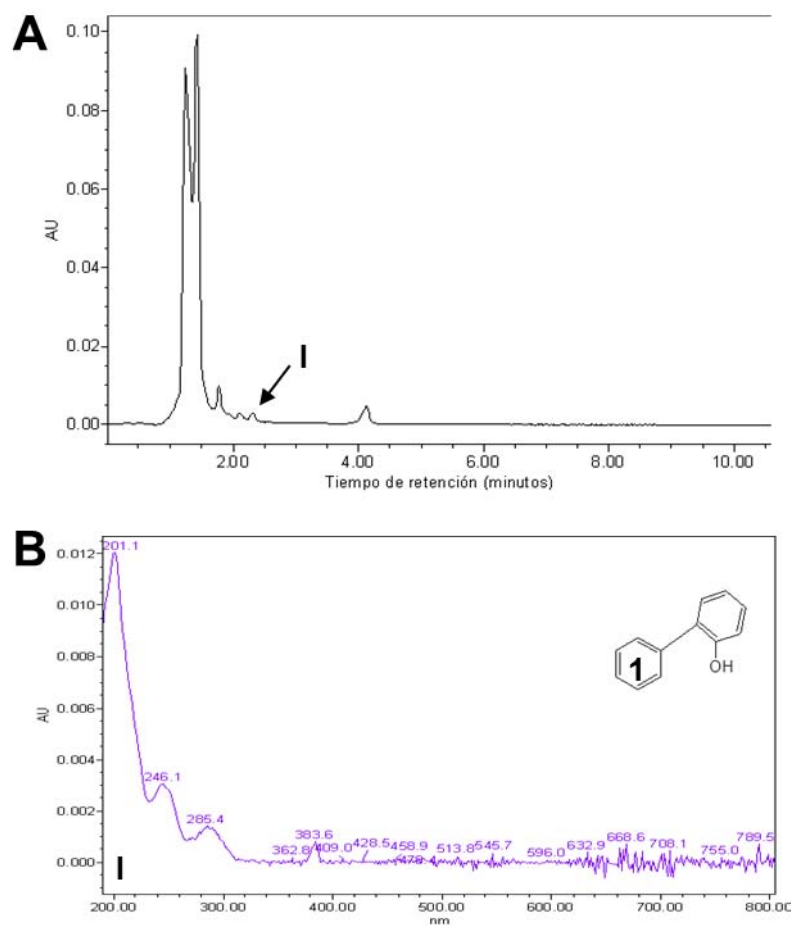


Figura S8. Identificación de metabolitos intermedarios de la desulfurización de dibenzotiofeno por *Citricella aestuarii* 357. A) Cromatograma a una absorbancia de 220 nm. Pico I: tiempo de retención, 2,3 min. B) Espectro de absorción correspondiente al pico I, característico del 2-hidroxibifenilo (1).

ANEXO II
TABLAS SUPLEMENTARIAS

ANEXO II. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Todas las tablas suplementarias, en formato Excel, se encuentran en el CD adjunto a la tesis

Tabla S1. Datos genómicos de miembros del clado *Roseobacter* obtenidos de la base de datos IMG/JGI.

Tabla S2. Anotación del genoma de *Citricella aestuarii* 357.

Tabla S3. Tabla resumen asignación a COGs del NCBI de las CDSs de *C. aestuarii* 357.

Tabla S4. Genes utilizados para el análisis filogenómico de *C. aestuarii* 357.

Tabla S5. Homología entre las CDSs de *C. aestuarii* 357 y las proteínas presentes en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI.

Tabla S6. Búsqueda de homología entre las CDSs del GTA de *C. aestuarii* 357 y las cepas más próximas a ella atendiendo al análisis filogenómico.

Tabla S7. Transposasas de *C. aestuarii* 357.

Tabla S8. Maquinaria flagelar, quimiotáctica y secretora de *Citricella aestuarii* 357.

Tabla S9. Proteínas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos por *C. aestuarii* 357.

Tabla S10. Búsqueda del mejor homólogo en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI para cada una de las CDSs codificadas en el contig C357_151 de *C. aestuarii* 357.

Tabla S11. Homología entre las CDSs del contig C357_151 de *C. aestuarii* 357 y las CDSs del genoma de *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1.

Tabla S12. Búsqueda de GTA en *P. gilvum* SL003-B26A1T por homología con el GTA de *R. capsulatus* B10.

Tabla S13. Homología entre las CDSs del contig C357_151 de *C. aestuarii* 357 con las CDSs implicadas en la degradación de naftaleno y dibenzotiofeno de las cepas *Ralstonia* sp. U2, *X. polyaromaticivorans* 127W y *P. stutzeri* CCUG29243 (AN10).

Tabla S14. Mejores homólogos a ZP_10018797.1 de *C. aestuarii* 357 en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI.

Tabla S15. Enzimas utilizados en la filogenia de las salicilato hidroxilasas del grupo *Roseobacter* y otras monooxigenasas FAD-dependientes bioquímicamente bien caracterizadas.