

# XIII REUNIÓN DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE LA SEM

Granada, 7-9 de septiembre de 2022



UNIVERSIDAD DE GRANADA



Diseño logo: M<sup>a</sup> Isabel Aranda Olmedo.  
spainbio@gmail.com



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
**MICROBIOLOGÍA**



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

# **XIII REUNIÓN DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE LA SEM**

**Granada, 7-9 de septiembre de 2022**

**Patrocinador**

**E.KAMYR**





**Josep Casadesús Pursals (1951-2022)**

*In memoriam*



## **Comité Organizador**

**María Trinidad Gallegos Fernández**  
Estación Experimental del Zaidín, CSIC

**Silvia Marqués Martín**  
Estación Experimental del Zaidín, CSIC

**Maximino Manzanera Ruíz**  
Universidad de Granada

**José Ignacio Jiménez Zurdo**  
Estación Experimental del Zaidín, CSIC

**Marian Llamas Lorente**  
Estación Experimental del Zaidín, CSIC

**Juan Luis Ramos Martín**  
Estación Experimental del Zaidín, CSIC

## **Comité Científico**

**Adela González de la Campa**  
Instituto de Salud Carlos III

**Alicia M. Muro Pastor**  
CSIC-Universidad Sevilla

**Francisco Ramos Morales**  
Universidad de Sevilla

**M<sup>a</sup> Trini Gallegos Fernández**  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

**Josep Casadesús Pursals**  
Universidad de Sevilla

**Bruno González Zorn**  
Universidad Complutense de Madrid

**Alejandro Mira Obrador**  
Centro Superior de Investigación en Salud Pública,  
Valencia

**Alejandro Toledo Arana**  
CSIC-Universidad Pública de Navarra

**José Antonio Escudero García-Calderón**  
Universidad Complutense, Madrid

**Jesús Gonzalo Asensio**  
Universidad de Zaragoza

**José Antonio Ainsa Claver**  
Universidad de Zaragoza

**Silvia Marqués Martín**  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

**Elizabet Aranda Ballesteros**  
Universidad de Granada

**Abdelali Daddaoua**  
Universidad de Granada

**Maximino Manzanera Ruiz**  
Universidad de Granada

**José Ignacio Jiménez-Zurdo**  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

**Marian Llamas Lorente**  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

**Juan L. Ramos Martín**  
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)





## Información práctica

### Sede de la Reunión

Todas las sesiones y actividades tendrán lugar en el **Hotel Abades Nevada Palace**, calle de la Sultana, 3, 18008-Granada

<https://www.abadeshoteles.com/es/hotel-abades-nevada-palace-en-granada/>

**Dirección:** C/ de la Sultana, 3 – Granada

**Código Postal:** 18008

**Coordenadas:** 37.152152, -3.591546

**Teléfono:** (+34) 958 80 99 99

**Fax:** +(34) 958 80 99 97

**Correo electrónico:** reservasnevada@abades.com

### Pósteres

En el Programa de la Reunión, cada comunicación (orales y pósteres) lleva asociado un **número (Pn)** que corresponde con el panel en el que se instalará el poster correspondiente. Los posters se instalarán en la sala contigua al salón principal.

### Visita turística

El viernes 9 de septiembre está programada una visita guiada al Albaicín. El autobús recogerá a todos los que lo hayan solicitado en el hotel Abades a las 19:30 para llevarlos al Albaicín. La visita acabará en el Carmen de la Victoria para la cena.

### Cena de clausura

La cena de clausura (Viernes 9 de septiembre 2022 a las 21:00 h) tendrá lugar en el **Carmen de la Victoria**, en el Albaicín, con unas maravillosas vistas a la Alhambra:

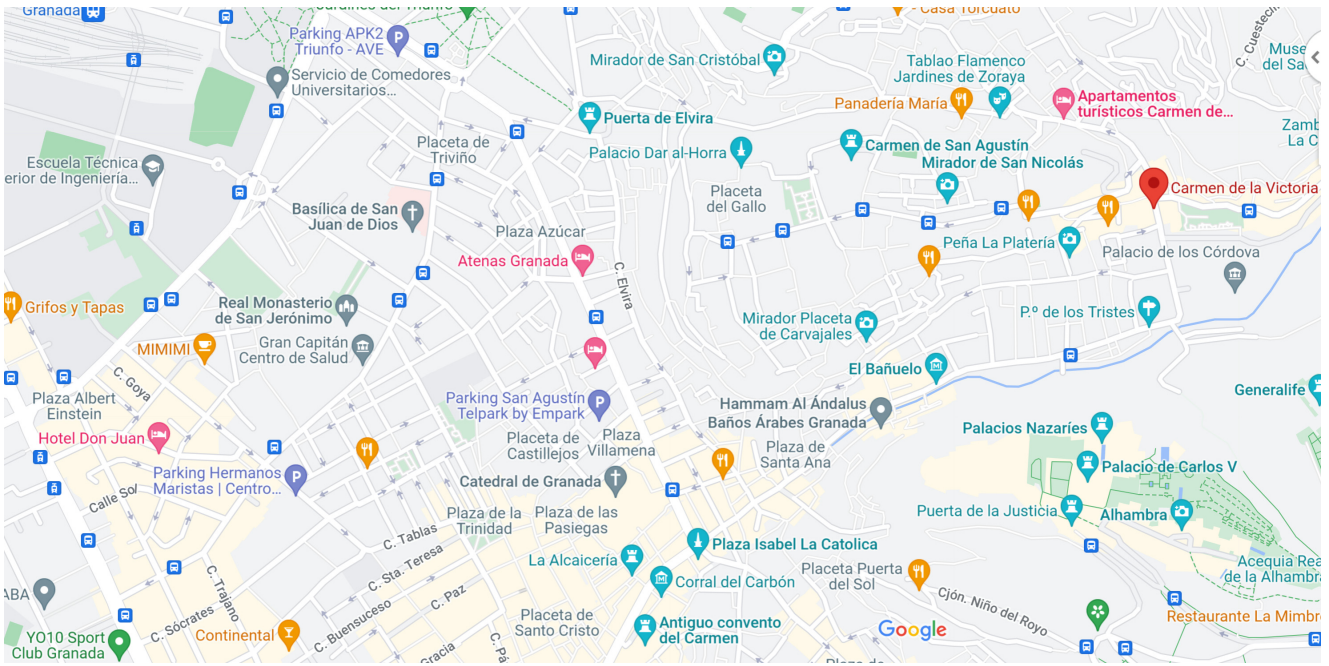
Carmen de la Victoria

Cuesta del Chapiz, 9

18010-Granada

Teléfonos 958248701 - 958248700

Las personas que realicen la visita turística la terminarán en el Carmen. Los que no hagan la visita turística pueden acceder en autobús de línea (C31, C32), taxi o andando.



# XIII REUNIÓN DEL GRUPO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR

Granada, 7-9 de septiembre de 2022

## Programa

### Miércoles, 7 de septiembre de 2022

15:00 Entrega de documentación y colocación de paneles

16:30 Ceremonia de inauguración

17:00 Homenaje al profesor Josep Casadesús Pursals – *In memoriam*

17:30 Conferencia inaugural

Desentrañando la función biológica de una banda de Northern blot de 80 nucleótidos de *Sinorhizobium meliloti*

Claudio Valverde

Laboratorio de Fisiología y Genética de Bacterias Beneficiosas para Plantas

Centro de Bioquímica y Microbiología del Suelo

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes, Argentina

18:30 **Café y colocación de paneles**

### Sesión I: Antimicrobianos y resistencia a antibióticos

Moderadores: José Antonio Escudero, Facultad de Veterinaria y VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense de Madrid,  
Luís Ángel Fernández, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC

19:00 Evolution of habitat-dependent antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

Pablo Laborda, José Luis Martínez, Sara Hernando-Amado – P1

19:15 Deciphering the molecular mechanism behind plasmid-associated collateral sensitivity.

Cristina Herencias, Jerónimo Rodríguez-Beltrán and Álvaro San Millán – P2

19:30 Movilización interbacteriana de aac(3)-IV en el microbioma intestinal.

Bosco R. Matamoros, Carlos Serna, Gabriel Moyano, Emilia Wedel, Irene Sánchez Méndez, Natalia Montero, Bruno Gonzalez-Zorn – P3

19:45 Análisis de la resistencia a antibióticos mediante encapsulación de células individuales de *Salmonella enterica*.

María Antonia Sánchez-Romero, Rocío Carvajal-Holguera, Marina Cabas-Santos, María Candel-Pecellín, Rocío Fernández-Fernández, Josep Casadesús – P4

20:00 A mutation accumulation assay to evaluate the effect of rifampicin on the evolution of the *Mycobacterium smegmatis* genome.

Esmeralda Cebrián-Sastre; Chiner-Oms, A.; Torres-Pérez, R.; Comas, I.; Oliveros, J.C.; Blázquez, J., Castañeda-García, A. – P5

20:15 La bomba ABC de la enterocina MR10A/B podría ser responsable de grupos de resistencia cruzada entre distintas bacteriocinas.

Claudia Teso-Pérez, Manuel Martínez-Bueno, Juan Manuel Peralta-Sánchez, Eva Valdivia, Mercedes Maqueda, María Esther Fárez-Vidal, Antonio M. Martín-Platero - P6

- 20:30 Rol de la transposición de ISCR1 en la dinámica de mantenimiento y diseminación del gen de la carbapenemasa NDM-1.  
Mario Pulido-Vadillo, José F Delgado-Blas, Emilia Wedel, Irene Sánchez Méndez, Bosco R. Matamoros, Natalia Montero, Bruno González-Zorn. – P8

## 21:00 Cóctel de bienvenida

## Jueves, 8 de septiembre de 2022

### Sesión II: Regulación génica

Moderadores: Tino Krell, Estación Experimental del Zaidín, CSIC  
Marta Martín, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

- 9:00 HsbA regula negativamente la formación de biofilm en *Pseudomonas putida*.  
Elisa Montero-Beltrán, Marta Pulido-Sánchez, Aroa López-Sánchez, Fernando Govantes – P28
- 9:15 Riboregulation of metabolism in nitrogen-fixing symbiotic  $\alpha$ -rhizobia.  
Natalia I. García-Tomsg, Marta Robledo, George C. diCenzo, Alessio Mengoni, Vicenta Millán, Sabina K. Guedes-García, José I. Jiménez-Zurdo – P29
- 9:30 A protease-mediated mechanism regulates the cytochrome c6/ plastocyanin switch in cyanobacteria.  
Raquel M García-Cañas, Joaquín Giner-Lamia, Encarnación Díaz-Santos, Luis G. Heredia-Martínez, José M. Ortega, Manuel Hervás, Mercedes Roncel, José A. Navarro, Francisco J. Florencio, Luis López-Maury – P30
- 9:45 Regulación de la síntesis y remodelación del peptidoglucano durante la diferenciación de heterocistos en *Nostoc* sp. PCC 7120.  
Sara B. Hernández, Alicia M. Muro-Pastor, Agustín Vioque – P31
- 10:00 El regulador metabólico CfrA adapta el flujo de carbono a la deficiencia de nitrógeno en cianobacterias.  
Laura Pérez-Rodríguez, Miguel Roldán, F. Javier Florencio, M. Isabel Muro-Pastor – P32
- 10:15 Topoisomerasa I y RNA polimerasa de *Streptococcus pneumoniae* interactúan durante el proceso de transcripción.  
María José Ferrándiz, Pablo Hernández, Adela González de la Campa – P33
- 10:30 The Hfq protein activates the expression of the transposase gene of the *Pseudomonas putida* KT2440 IS<sub>Ppu9</sub> insertion sequence.  
Elena Parés, Luis Yuste, Fernando Rojo, Renata Moreno – P34

## 11:00 Café y sesión de pósters

### Sesión III: Señalización celular

Moderadores: Fernando Rojo, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC  
Alicia Muro Pastor, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC y Universidad de Sevilla.

- 11:30 Arbitrium system. Más allá de la decisión lisis-lisogenia en bacteriófagos.  
Alberto Marina, Francisca Gallego del Sol, Sara Zamora-Caballero, Alonso Felipe, Javier Mancheño, Nuria Quiles-Puchalt, Aisling Brady, José R. Penadés – P57
- 11:45 *Pseudomonas aeruginosa* non-phosphorylated AlgR induces ribonucleotide reductase expression under oxidative stress conditions.  
Alba Rubio-Canalejas, Joana Admella, Lucas Pedraz, Eduard Torrents – P58

- 12:00 Transcriptional regulators and chemoreceptors that respond to phytohormones in plant-associated bacteria.  
Miriam Rico-Jiménez, Amalia Roca, Tino Krell, Miguel A. Matilla – P59
- 12:15  $\sigma^{ECF}$ -mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the anti- $\sigma$  domain (ASD) of the anti- $\sigma$  factor in the signalling pathway.  
Ana Sánchez-Jiménez, Francisco J. Marcos-Torres, María A. Llamas – P60
- 12:30 Definition of the quaternary amines specific sub-family of dCache sensor domains using bioinformatics and wet lab experimentation.  
Cerna-Vargas, J.P., Gumerov, V., Monteagudo-Cascales, E., Genova, R., Velando, F., Matilla, M., Zhulin, I., Krell, T. – P61
- 12:45 The different roles of TasA and CalY in the biofilm formation of *Bacillus cereus*.  
Ana Álvarez-Mena, Luis Díaz-Martínez, Joaquín Caro-Astorga, Oscar P. Kuipers, Antonio de Vicente, Diego Romero – P62
- 13:00 Implicación de la histidina quinasa híbrida HK1635 en la producción de compuestos de interés biomédico en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens*.  
García-Valero, R., Rodríguez-Carrión, C., Nieto, J.J., Vargas, C., Argandoña M. – P63

### 13:30 Almuerzo

### Sesión IV: Genómica comparada y comunidades microbianas

Moderadores: Montserrat Argandoña, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla  
Javier López Garrido, Max Planck Institute for Evolutionary Biology, Plön, Alemania

- 16:00 Mapping the interactions in the pig nasal microbiota using a rationally designed microbial consortium.  
Laura Bonillo, Pau Obregón, Florencia Correa-Fiz, Karl Kochanowski, Virginia Aragón – P74
- 16:15 Tell me what you eat and I will tell you how your microbiota evolves  
Tanja Dapa, Ricardo S Ramiro, Miguel F Pedro, Isabel Gordo, Karina B Xavier – P75
- 16:30 Correlación entre la expresión de genes de la raíz de olivo y sus comunidades microbianas asociadas  
Fernández-González, A. J., J. A. Ramírez-Tejero, M. Nevado-Berzosa, F. Luque, J. Mercado-Blanco, M. Fernández-López – P76
- 16:45 Analysis of toxin-antitoxin systems in mobile genetic elements of *Anabaena* sp. PCC 7120  
Alicia Segura-Mejías and Rocío López-Igual – P77
- 17:00 Genomic characterization of *Listeria* spp. isolated from dairy ruminants using WGS  
Carla Palacios-Gorba, Alexandra Moura, Yuval Markovich, Nathalie Tessaud-Rita, Ángel Gómez-Martín, Hélène Bracq-Dieye, Jesús Gomis, Guillaume Vales, María Pastor-Martín, Pierre Thouvenot, Carles Escrig, Alexandre Leclercq, Marc Lecuit, Juan J. Quereda – P78
- 17:15 Disentangling the effects of segregational drift and mutational supply on plasmid evolution  
Ramiro-Martínez, P., Jaraba, L, Rodríguez-Beltrán, J – P79
- 17:30 Deleting the *Vibrio cholerae* superintegron as a tool for the study of chromosomal integrons.  
Paula Blanco, Filipa Trigo da Roza, Ester Vergara, Alberto Hipólito, Lucía García-Pastor, Céline Loot, Didier Mazel, José Antonio Escudero – P80

### 18:00 Café y sesión de pósteres

## Sesión V: Interacción planta-bacteria

Moderadores: Miguel Ángel Matilla, Estación Experimental del Zaidín, CSIC  
Carmen Beuzón, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea,  
Universidad de Málaga - CSIC

- 18:30 Exploring the aggregation potential of RepA-WH1 domains from *Xylella fastidiosa* plasmids.  
Lucero, L., Giraldo, R – P93
- 18:45 *Pseudomonas putida* KT2440 type VI secretion systems mediate adaptation to the rhizosphere.  
David Vázquez-Arias, Cristina Civantos, David Durán, Patricia Bernal, Rafael Rivilla, Marta Martín – P94
- 19:00 Funciones de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en bacterias que interaccionan con plantas.  
A. Casas-Román, M. J. Lorite, S. Muñoz, M.T. Gallegos, J. Sanjuán – P95
- 19:15 *Pseudomonas putida* KT2400 como posible agente de control biológico frente a *Xylella fastidiosa*.  
María Pilar Velasco-Amo, Cristina Civantos, Carlos Quiles-Pando, Jaime López-Alcalá, Paula Tomás-Viejo, Blanca B. Landa, Patricia Bernal – P96
- 19:30 Metilasas y metilación en la regulación génica de *Pseudomonas syringae*.  
Mancera-Miranda, L., López-Pagán, N, Gutiérrez-Pozo, G, Spröer, C, Bunk, B, Sánchez-Romero, MA, Ruiz-Albert, J, Beuzón C – P97
- 20:00 Beer poster session

## Viernes, 9 de septiembre de 2022

### Sesión VI: Patogénesis

Moderadores: Fernando Govantes, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo. Universidad Pablo de Olavide, Sevilla  
Eduard Torrents, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology; and Faculty of Biology, University of Barcelona

- 9:00 Respuesta transcripcional bacteria-huésped durante la infección de válvula cardíaca por *Staphylococcus aureus*.  
Begoña García, Carmen Gil, Nahiara Garmendia, Cristina Solano, Daniel Mouzo, Rafael Sádaba, Aritza Conte, Virginia Alvarez, Amaya Fernández, Ana Navascues, Carmen Ezpeleta, David Gomez, Natalia López, Iñigo Lasa – P102
- 9:15 *Salmonella* modifica el ubicuitinoma de las células hospedadoras.  
Andrea Bullones-Bolaños, Joaquín Bernal-Bayard, Francisco Ramos-Morales – P103
- 9:30 Inhibición selectiva de la actividad lipasa por una mini-proteína altamente conservada en el género *Staphylococcus*.  
Ane Muruzabal-Galarza, Arancha Catalán-Moreno, Pedro Dorado-Morales, Alejandro Toledo-Arana – P104
- 9:45 El dominio N-terminal de la gasdermina D provoca alteraciones en el ciclo celular, el tráfico endosomal y las mitocondrias en *Saccharomyces cerevisiae*.  
Marta Valenti, María Molina, Víctor J. Cid – P105

- 10:00 Type III secretion system effectors form robust and flexible intracellular virulence networks.  
David Ruano-Gallego, Julia Sánchez-Garrido, Elena Núñez-Berruero, Massiel Cepeda-Molero, Luis Ángel Fernández, Alfonso, Rodríguez-Paton, Gad Frankel – P106
- 10:15 La pérdida de la proteína fijadora de penicilina 3 (PBP3) en respuesta a señales propias del fagosoma y su contribución a la evolución de *Salmonella* como patógeno intracelular.  
David López-Escarpa, Sónia Castanheira, Francisco García-del Portillo – P107
- 10:30 *In vivo* genome-wide fitness analysis uncovers *Haemophilus influenzae* metabolic network requirements during airway infection: study of the tryptophan-serine metabolic axis.  
Javier Asensio-López, Begoña Euba, Celia Gil-Campillo, Beatriz Rapún-Araiz, Goizeder Almagro, Nahikari López-López, Irene Rodríguez-Arce, María Lázaro, Mariette Barbier, Jeroen Langereis, Alejandro Toledo-Arana, Saioa Burgui, Junkal Garmendia – P108
- 10:45 La interacción hospedador-patógeno en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* reinterpretada en base a un metabolito presente en sus hospedadores.  
Elena Campos-Pardos, Santiago Uranga, Ana Picó, Jesús Gonzalo-Asensio – P109

## 11:00 Café y sesión de pósteres

### Sesión VII: Biotecnología

Moderadores: Junkal Garmendia, Instituto de Agrobiotecnología, CSIC - Gobierno de Navarra; y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, Madrid  
Alejandro Toledo Arana, Instituto de Agrobiotecnología, CSIC - Gobierno de Navarra

- 11:30 Response of *Pseudomonas putida* to noxious compounds susceptible of synthesis by *Pseudomonas putida*.  
Ana García Franco, Patricia Godoy Alba, Rocío Palacios Ferrer, Estrella Duque Martín de Oliva, Juan Luis Ramos Martín – P116
- 11:45 Improved colonization of human tumor spheroids by *E. coli* bacteria with synthetic adhesins binding cell-surface receptors of tumor cells.  
Alba Cabrera Fisac, Carmen Mañas-Torres, Eva Pico-González, Elena M. Seco, Luis Ángel Fernández – P117
- 12:00 El papel de los metales en la depredación bacteriana.  
Francisco Javier Contreras-Moreno, Juana Pérez, María José Soto, Aurelio Moraleda-Muñoz, José Muñoz-Dorado – P118
- 12:15 Optimization of bacterial recombineering by *in vivo* production of single-stranded DNA.  
Alejandro González-Delgado, Alfonso Matías Rojas-Montero, Seth L. Shipman – P119
- 12:30 The genetic basis of fast-growth adaptation in cyanobacteria, revealed by long term evolution.  
Alfonso Mendaña, María del Mar Santos-Merino, Raquel Gutiérrez-Lanza, Carlos Díaz, Ana González-Guerra, Víctor Campa, Rocío López-Igual, Daniel Volke, Pablo I. Nikel, Didier Mazel, Fernando de la Cruz, Raúl Fernández-López – P120
- 12:45 Diseño de nuevas herramientas moleculares útiles en la prevención de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en plantas de tratamiento de aguas residuales.  
David Correa Galeote, Lizandra Pérez Bou, Belén Rodelas, Alejandro González Martínez, Jesús González López – P121
- 13:00 Producción de nanocelulosa bacteriana por *Starkeya* sp. STN1A.  
Inés Castillo-Rodríguez, Rocío Fernández-González, Sophie-Marie Martirani-von Abercron, Patricia Marín, Jaccoline Zegers, Daniel Pacheco, Silvia Marqués – P122

13:15 Expresión heteróloga de proteasas virales en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*.  
Óscar A. Barbero, Elba del Val, Marta Valenti, María Molina, Víctor J. Cid, Teresa Fernández-Acero – P123

#### **14:00 Almuerzo**

16:00 Entrega de premios a las mejores comunicaciones

16:30 Entrega de los premios MicroMol Granada

16:30 Arancha Catalán-Moreno, Marta Cela, Pilar Menéndez-Gil, Naiara Irurzun, Carlos J. Caballero, Isabelle Caldelari y Alejandro Toledo-Arana  
RNA thermoswitches modulate *Staphylococcus aureus* adaptation to ambient temperatures

17:00 Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Vidar Sørum, Macarena Toll-Riera, Carmen de la Vega, Rafael Peña-Miller y Álvaro San Millán  
Genetic dominance governs the evolution and spread of mobile genetic elements in bacteria

17:30 Asamblea del Grupo de Microbiología Molecular

#### **19:30 Visita turística**

#### **21:00 Coctel de clausura – Carmen de la Victoria**

Ver mapa del sitio en P. II.



## COMUNICACIONES EN PÓSTER

### Antimicrobianos y resistencia a antibióticos

**P9 - Conjugation ability/permmissiveness and acquired resistance level shape the distribution of a carbapenem resistance plasmid**

Aída Alonso-del Valle, Laura Toribio-Celestino, Álvaro San Millán

**P10 - RNase HI as a dual target for anti-virulence and anti-resistance strategies**

Roberto Balbontín, Joaquín Bernal-Bayard and Francisco Ramos-Morales

**P11 - Ecología, conservación y microbiología molecular en Costa Rica: valorando el impacto del ser humano en ecosistemas silvestres.**

Cristina Calvo-Fernandez<sup>1</sup>, Marta M. Dolcet Negre<sup>1</sup>, Emilia Wedel<sup>1</sup>, Jose Francisco Delgado-Blas<sup>1</sup>, Irene Sánchez Méndez<sup>1</sup>, Natalia Montero<sup>1</sup>, Encarnación García Vila<sup>2</sup>, Roger Such Basiana<sup>2</sup>, Bruno Gonzalez-Zorn<sup>1</sup>.

**P12 - Análisis de la actividad antimicrobiana de un clon con ADN metagenómico proveniente de una pila de compostaje de una refinería**

Luis Andreo Andreu, Cynthia Alías Villegas, Sebastián Acosta Jurado, Amando Flores Díaz, Eva M<sup>a</sup> Camacho Fernández

**P13 - Contribución de la heterogeneidad fenotípica a la resistencia a los antibióticos ertapenem y amikacin en *Salmonella enterica***

Rocío Carvajal-Holguera, Marina Cabas-Santos, Josep Casadesús y María Antonia Sánchez-Romero

**P14 - Within-patient evolution of plasmid-mediated antimicrobial resistance**

Javier DelaFuente, Laura Toribio-Celestino, Alfonso Santos-López, Ricardo León-Sampedro, Aida Alonso-del Valle, Coloma Costas, Marta Hernández-García, Lun Cui, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, David Bikard, Rafael Canton, Álvaro San Millán

**P15 - Evolución de la resistencia a carbapenemas y aminoglucósidos en aguas residuales hospitalarias de Ghana**

Jose F. Delgado-Blas, Marta M. Dolcet-Negre, Mario Pulido-Vadillo, Natalia Montero, Cristina Calvo-Fernandez, Carlos Serna, Courage K. S. Saba, Bruno Gonzalez-Zorn

**P16 - Role of O-antigen length controlled by phase variation in antibiotic resistance**

Fernández-Fernández Rocío, Blanco Paula, Sánchez-Romero María Antonia, Escudero José Antonio and Casadesús Josep

**P17 - Evaluation of lytic phages efficiency for the treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in pigs**

Nahiara Garmendia, Begoña García, Carmen Gil, Cristina Solano, Rafael Sádaba, Aritza Conte, Virginia Alvarez, Amaya Fernández, Natalia López, Cindy Fevre, Guy-Charles F. De la Horie e Iñigo Lasa

**P18 - Caracterización de las dinámicas evolutivas de los cassettes de resistencia en integrones**

Alberto Hipólito; Filipa Trigo da Roza; Lucía García-Pastor; Paula Blanco; Ester Vergara Thomas Jové; Álvaro San Millán; José Antonio Escudero.

**P19 - Caracterización de bacterias ambientales productoras de antibióticos**

Beatriz Beriaín, Asier Domínguez, Ainhoa Lucía

**P20 - Non-canonical mismatch repair protein NucS modulates the emergence of antibiotic resistance in *Mycobacterium abscessus***

Isabel Martín-Blecua, Rosilene Fressatti Cardoso, Vanessa Pietrowski Baldin, Jean Eduardo Meneguello, José Ramón Valverde, Jesús Blázquez, Alfredo Castañeda-García

**P21 - Análisis de endosimbiontes de insectos para el estudio de interacciones hospedador huésped y su uso en el control de enfermedades de transmisión por vectores**

Pol Nadal-Jiménez, Stefanos Siozios, Gregory D.D. Hurst

**P22 - Identification of a novel cacaoidin derivative obtained by the heterologous expression of the *cao* biosynthetic gene cluster**

Fernando Román-Hurtado, Marina Sánchez-Hidalgo, Jesús Martín, Francisco Javier Ortiz-López, Olga Genilloud

**P23 - Nuevo modelo murino para el estudio de la transmisión de *Klebsiella pneumoniae* nosocomial multirresistente**

Irene Sánchez Méndez, Cristina Calvo Fernández, Natalia Montero, Javier Fernández-Favieres, Marta Dolcet, Bruno González Zorn.

**P24 - Los plásmidos IncR y la metiltransferasa del ARNr 16S *armA*: una asociación exitosa en el mantenimiento de la pan-resistencia a aminoglucósidos en un entorno hospitalario**

Carlos Serna, Bosco R. Matamoros, Jose F. Delgado-Blas, F. Javier Fernández-Favieres, Cristina Calvo-Fernández, Natalia Montero, Bruno González-Zorn

**P25 - Neutralization of ionic interactions by dextran-based single-chain nanoparticles improves tobramycin diffusion into a mature biofilm**

Núria Blanco-Cabra, Julie Movellan, Marco Marradi, Raquel Gracia Cristian Salvador, Damien Dupin, Iraida Loinaz, Eduard Torrents

**P26 - Resistencia a antibióticos de *Streptococcus suis* aislados en España**

Cristina Uruén, Carla Garcí, Marina Sanz, Ana Fernandez, José Luis Arnal, Mateo del Pozo, Luisa Amoribieta, María Casas, Lorenzo Fraile, Clara Marín, Jesús Arenas

**P27 - Identification of a novel peptide that determines plasmid host-species specificity**

Emilia Wedel, Mario Pulido-Vadillo, Bosco R. Matamoros, F. Javier Fernández-Favieres, Natalia Montero, Bruno González-Zorn

## Regulación génica

**P35 - Análisis de posibles reguladores transcripcionales de la diferenciación de heterocistos**

Isidro Álvarez-Escribano, Manuel Brenes-Álvarez, Ana Sousa-Ortega, Agustín Vioque y Alicia M. Muro-Pastor

**P36 - WhpR, un regulador transcriptional de la virulencia en el patógeno de huéspedes leñosos *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi***

Antonio Arroyo-Mateo, Jesús Leal-López, Eloy Caballo-Ponce, Cayo Ramos

**P37 - Structural and Functional analysis of *Salmonella* Typhimurium T6SS**

Joaquín Bernal, Cristina Civantos, Patricia Bernal, Francisco Ramos Morales

**P38 - Co-option of alanine racemase during spore formation in *Bacillus subtilis***

Alejandro David Bonive Boscan and Javier López Garrido

**P39 - An acyl-homoserine-lactone acylase in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical model strain K279a with both quorum quenching and Beta-lactamase activity**

Marc Bravo, Xavier Coves, Òscar Conchillo-Solé, Celeste Gómez, Xavier Daura, Daniel Yero and Isidre Gibert

**P40 - Characterization of the transcriptional repressor TetR of *Myxococcus xanthus* required for *Sinorhizobium meliloti* predation**

Cabello-Alemán, L., Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Contreras-Moreno, F.J.

**P41 - Characterization of the *yebEFG* gene cluster (aka *yebGFE* operon) in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

Ángela Mérida-Floriano and Josep Casadesús

**P42 - The carbon regulator PhaR exerts a pleiotropic control in *Bradyrhizobium diazoefficiens***

Rocío Díaz-Peña, Juan. J. Cabrera, Germán Tortosa, María J. Delgado, Elías Mongiardini, Marcelo Müller-Santos, Julia Pettinari, Socorro Mesa, Juan I. Quelas

**P43 - The *VgrG5a* cluster associated to the type VI secretion systems in *Pseudomonas fluorescens* F113 mediate bacterial killing**

David Durán, David Vázquez, Patricia Bernal, Miguel Redondo-Nieto, Rafael Rivilla and Marta Martín

**P44 - Papel de FleN en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000**

Laura Martínez-Rodríguez, Andrea García Alcaide, Aroa López Sánchez, Fernando Govantes, M<sup>a</sup> Trini Gallegos

**P45 - El mantenimiento de los niveles de Topoisomerasa I es esencial para la viabilidad celular en *Streptococcus pneumoniae***

M. García-López, M. J. Ferrándiz, A. G. de la Campa

**P46 - Fotoproducción de amonio a partir de N<sub>2</sub> por cianobacterias con bajos niveles de glutamina sintetasa. Hacia un sistema sostenible de producción de fertilizantes nitrogenados.**

Alba M. Gutiérrez-Diáñez, Laura Pérez-Rodríguez, M. Isabel Muro-Pastor, Francisco J. Florencio

**P47 - Estudio del sensor de DNA citosólico cGAS en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae***

Sara López-Montesino, Julia María Coronas-Serna, María Molina Martín y Víctor J. Cid.

**P48 - Unraveling the roles of three uncharacterized extracytoplasmic function sigma ( $\sigma^{ECF}$ ) of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa***

Francisco J. Marcos-Torres, Alicia García-Puente, and María A. Llamas.

**P49 - Análisis transcriptómico de la respuesta de *Bradyrhizobium diazoefficiens* a la limitación de cobre en condiciones desnitrificantes**

Juan J. Cabrera, Andrea Jiménez-Leiva, Pedro J. Pacheco, Raquel A. Juárez, Eulogio J. Bedmar, Socorro Mesa, María J. Delgado.

**P50 - Regulación mediada por RNAs antisentido**

Manuel Brenes-Álvarez, Isidro Álvarez-Escribano, Agustín Vioque y Alicia M. Muro-Pastor

**P51 - Implicación de los metalorreguladores Fur en la homeostasis del hierro en la bacteria extremófila *Chromohalobacter salexigens* en función de la salinidad y temperatura**

Emilia Naranjo, Montserrat Argandoña, Carmen Vargas, Joaquín J. Nieto

**P52 - Role of *Thermus thermophilus* AddAB in DNA repair and defense mechanisms**

Patricia Pérez-Arnaiz, Carlos Verdú Cano, Mario Mencía Caballero, José Berenguer Carlos

**P53 - Role of GacS in biofilm formation by the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas stutzeri* MJL19**

Verónica Pérez Padilla, María Isabel Ramos González and Manuel Espinosa Urgel

**P54 - La interacción entre FimV, ParC y FlhF coordina la localización polar del aparato flagelar y los complejos de quimiotaxis en *Pseudomonas putida***

Marta Pulido-Sánchez, Antonio Leal-Morales, Aroa López-Sánchez, Fernando Govantes

**P55 - Regulation of extracellular matrix components by AmrZ is mediated by c-di-GMP in *Pseudomonas ogarae* F113**

Esther Blanco-Romero<sup>1</sup>, Daniel Garrido-Sanz<sup>1,2</sup>, David Durán<sup>1</sup>, Marta Martín<sup>1</sup>, Miguel Redondo-Nieto<sup>1</sup> and Rafael Rivilla<sup>1\*</sup>

**P56 - PrimPol: una primasa – polimerasa termófila relacionada con la entrada de DNA exógeno y la maquinaria de recombinación**

Carlos Verdú Cano, Patricia Pérez-Arnaiz, Ali Gera, Alba Blesa, Mario Mencía Caballero y José Berenguer Carlos

## Señalización celular

**P64 - Hacia una visión global del sistema de virulencia PhoPR en el género *Mycobacterium***

Estefanía Crespo Yuste, Juan Calvet Seral y Jesús Gonzalo Asensio

**P65 - Two-component system MifS/MifR modulate the resistance of  $\beta$ -lactams antibiotic in *Pseudomonas aeruginosa* strain.**

Kelsey Aguirre Schilder, José Canto Mangana, Diego-Ceacero Heras, Fermín Sánchez de Medina, Martínez-Augustin O and Abdelali Daddaoua.

**P66 - Identification of a chemoreceptor for agmatine**

Roberta Genova, Elizabet Monteagudo Cascales, Jean Paul Cerna Vargas, Felix Velando, Miguel A. Matilla and Tino Krell

**P67 - Molecular mechanism of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR transcription factor: Influence of heme in NO sensing**

Andrea Jiménez-Leiva, Juan J. Cabrera, María J. Torres, David J. Richardson, Eulogio J. Bedmar, Andrew J. Gates, María J. Delgado, S. Mesa

**P68 - Chemotaxis to acetylcholine in human and plant pathogenic bacteria**

Miguel A. Matilla, Félix Velando, Ana Tajuelo, David Martín-Mora, Wenhao Xu, Victor Sourjik, José A. Gavira, Tino Krell.

**P69 - The transcriptional regulator ArgR links cellular arginine pools and c-di-GMP signaling in *Pseudomonas putida* KT2440**

María Antonia Molina-Henares, Laura Barrientos-Moreno, María Isabel Ramos-González, Manuel Espinosa-Urgel

**P70 - Bioinformatic prediction and experimental validation of signals recognised by sensor domains in bacterial receptors: the case of amino acid specific dcache\_1AA domain**

Elizabet Monteagudo-Cascales, Vadim M. Gumerov, Ekaterina P. Andrianova, Miguel A. Matilla, Karen M. Page, Annette C. Dolphin, Tino Krell and Igor B. Zhulin.

**P71 - Role of the two-component system CfcA/CfcR in biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* MJL19**

Rafael Nisa-Martínez, Manuel Espinosa-Urgel and María Isabel Ramos-González

**P72 - Tse1 mobilized by T6SS of *Pseudomonas* induces sporulation of *Bacillus* via  $\sigma^W$**   
Pérez-Lorente, A.I., Molina-Santiago, C, de Vicente, A and Romero, D

**P73 - Amino acids as key chemotactic signals in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043**  
Félix Velando, Tino Krell and Miguel A. Matilla

## Genómica comparada y comunidades microbianas

**P81 - Comparative transcriptomics of model strains ATCC 14028 and 4/74 of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

Ángela Mérida-Floriano, Francine Piubeli, Rocío Canals, Will P. M. Rowe, Karsten Hokamp, Alistair C. Darby, Jay C. D. Hinton, Josep Casadesús

**P82 - Species- and strain-level assessment of bacterial communities through nanopore-based sequencing targeting nearly-full ribosome RNA genes**

Alfonso Benítez-Páez

**P83 - Metagenomic insights into microbial consortia degrading emerging pollutants**

Zaki Saati-Santamaría, Jorge Rodríguez-Grande, Maitane Juárez-Mugarza, Pilar Navarro-Gómez, Amando Flores and Inés Canosa

**P84 - Characterisation of Type IV CRISPR/Cas-carrying plasmids in *Klebsiella* spp.**

F. Javier Fernández-Favieres, Carlos Serna, Marta M. Dolcet-Negre, Mario Pulido-Vadillo, Natalia Montero, Riccardo Rosselli, Francisco JM Mojica, Bruno Gonzalez-Zorn

**P85 - Efecto del manejo agrícola sobre el microbioma de la raíz de olivo**

Fernández-López M., N. M. Wentzien, A. J. Fernández-González, P. J. Villadas, A. Valverde-Corredor, J. Mercado-Blanco.

**P86 - I2 domain is not essential for the ancestral function of integrases**

Lucía García-Pastor, Alberto Hipólito, Francisco Manuel Ojeda-García, Filipa Trigo da Roza, Ester Vergara and José Antonio Escudero

**P87 - Modular system for constructing plasmids and analysis on their stability in filamentous cyanobacteria**

Alicia Segura-Mejías, Rafael Salas-Aparicio, Ignacio Luque and Rocío López-Igual

**P88 - Explorando la diversidad genómica de sedimentos de la laguna de Fuente de Piedra: buscando bacterias productoras de metabolitos secundarios de interés.**

Sophie-Marie Martirani-Von Abercron, Patricia Marín & Silvia Marqués

**P89 - El análisis de pangenomas bacterianos ilumina la materia oscura de los sistemas CRISPR-Cas**

Alejandro Rubio, Maximilian Sprang, Maria Eugenia Pachón-Ibáñez, Jerónimo Pachón, Miguel A. Andrade-Navarro, Andrés Garzón, Antonio J. Pérez-Pulido

**P90 - Heterogeneidad fenotípica en el superintegrón de *Vibrio cholerae***

Amalia Prieto Nieto, Lucía García-Pastor, José Antonio Escudero,

**P91 - The black sheep: dividing in a non-canonical way**

Elena Rivas-Marín, David Moyano-Palazuelo, Damien P. Devos

**P92 - Comprobación del genotipo de especies leñosas y dinámica estacional de las comunidades bacterianas de la rizosfera**

Lasa, A.V., M.A Guevara, P.J. Villadas; M.D. Vélez, A.J. Fernández-González; N. de María, M. López-Hinojosa, M.T. Cervera, M. Fernández-López.

## Interacción planta-bacteria

### **P98 - Fengycin and the amyloid TasA of *Bacillus subtilis* stimulates the growth and immunization of plants by targeting the seed storages**

María Victoria Berlanga Clavero, Carlos Molina Santiago, Luis Díaz Martínez, Alejandro Pérez García, Antonio de Vicente y Diego Romero.

### **P99 - Improvement of *Bacillus velezensis* UMAF6639 as a biocontrol agent**

Montserrat Grifé-Ruiz, Jesús Hierrezuelo, David Vela-Corcía, Alejandro Pérez-García, Antonio de Vicente, Diego Romero.

### **P100 - Interacción positiva entre la planta del trébol y la bacteria *Novosphingobium* sp. HR1a en el contexto de la rizorremediación.**

Lázaro Molina, Ana Segura

### **P101 - Heterogeneidad fenotípica en el Sistema de Secreción tipo III de *Pseudomonas syringae* durante la interacción con la planta**

José S. Rufián, Nieves López-Pagán, Laura Mancera-Miranda, Javier Ruiz-Albert y Carmen R. Beuzón

## Patogénesis

### **P110 - Identificación y caracterización funcional del proteoma oculto de *Staphylococcus aureus***

Aranca Catalan-Moreno, Ane Muruzabal-Galarza, Pedro Dorado-Morales y Alejandro Toledo-Arana

### **P111 - Análisis de la respuesta inmunológica natural de cerdos contra antígenos subcapsulares de *Streptococcus suis***

Carla García, Cristina Uruen, Luis Saralegui, Lorenzo Fraile, Mateo del Pozo, Clara Marín, Jesús Arenas

### **P112 - Genome-wide analysis of *Haemophilus influenzae* genes required for bacterial fitness during respiratory infection reveals a key role for Dam methylation epigenetic regulation of the FNR regulon**

Celia Gil-Campillo, Gabriel Gutiérrez, Begoña Euba, Irene Rodríguez-Arce, Joshua C. Mell, María Antonia Sánchez-Romero, Junkal Garmendia

### **P113 - SNRPD2 es un sustrato de la actividad ligase de ubicuitina del efector SirP de *Salmonella enterica***

Andrea Bullones Bolaños, Juan Luis Araujo Garrido, Jesús Fernández García, Joaquín Bernal Bayard, Francisco Ramos Morales

### **P114 - Diseño y puesta a punto de un sistema diagnóstico de tuberculosis bovina mediante amplificación isoterma LAMP- PCR**

Nelson Alejandro Sierra Cortés, Danna Sofía Camelo Gómez, Nelson Enrique Arenas, Carlos Y. Soto

### **P115 - Characterization of invasion during infection in *Salmonella enterica*'s effectors SirP, SspH1 and SspH2**

Claudia Vallejo Grijalba, Paula Martín Muñoz, Joaquín Bernal Bayard, Francisco Ramos Morales

## Biotecnología

### **P124 - Optimization of the *in vivo* mutagenesis system T7-DIVA for directed evolution of proteins**

Álvarez, B., Crespo, D., Fernández, L.A.

**P125 - Diseño *in silico* y obtención de cepas mejoradas en la producción de ectoínas en *Chromohalobacter salexigens* mediante ingeniería metabólica de sistemas**

Martínez-Martínez, L., Salvador, M., Nieto J.J., Argandoña M., Vargas, C.

**P126 - Identificación y análisis de clusters biosintéticos de biosurfactantes y sideróforos en bacterias halófilas moderadas**

Arranz A., Antón T, Nieto JJ, Vargas C, Argandoña M

**P127 - Bacterias promotoras del crecimiento de plantas asociadas al aumento en concentración de metano.**

Adoración Barros-Rodríguez, Carlos García-Gálvez, Yasmira Enrique-Cruz, María García-Toledo, Pamela Pacheco, Antonio Castellano-Hinojosa, Maximino Manzanera.

**P128 - Desarrollo de un biosensor de proteínas amiloides basado en la porina OmpF ensamblada en nanodiscos**

M. Luz Blasco-Santamaría, Rafael Giraldo

**P129 - A fast and reliable genetic barcoding strategy to confirm antibiotic resistance genotype-phenotypes in *Mycobacterium abscessus***

J. Calvet-Seral; E. Crespo-Yuste; C. Martín; A. Martín; J. Gonzalo-Asensio

**P130 - La región N-terminal de TasA es esencial en proceso de amiloidogénesis y formación de biofilm en *B. subtilis***

Laura Domínguez García, Jesús Cámara-Almirón, Antonio de Vicente y Diego Romero.

**P131 - Isolation and characterisation of microbial consortia for the degradation of emerging pollutants**

Maitane Juárez-Mugarza, Pilar Navarro-Gómez, José Manuel Garrido, Amando Flores, Inés Canosa

**P132 - pETS-IBECGLOW: A new generation of bacteria promoter-probe and transposon-delivery plasmids**

Domingo Marchan del Pino, Eduard Torrents

**P133 - Desarrollo de un sistema de edición genómica CRISPR-Cas de aplicación generalizada en bacterias Gram-negativas**

Guadalupe Martín Cabello, Andrea García Alcaide, Estela Sanz Martí, Sergio Serrano Corral, Marta Pulido Sánchez, Aroa López Sánchez y Fernando Govantes

**P134 - Transcriptionally-dependent plasmid DNA interference mediated by a native type III-D CRISPR-Cas system in the pathogen *Vibrio vulnificus***

Alejandro González-Delgado, Eva Sanjuán, Nicolás Toro, Carmen Amaro, Daniel Cabrerizo & Francisco Martínez-Abarca

**P135 - Assembly and disassembly of a bacterial killing machine. The importance of recycling the sheath of the Type VI secretion system**

Marina Murillo-Torres, Cristina Civantos, Joaquín Bernal-Bayard, Despoina A.I. Mavridou and Patricia Bernal

**P136 - Developing competition assays in *Bacillus subtilis***

Octavio Reyes-Matte, Javier López-Garrido

**P137 - Enhancement of *Phaeodactylum tricornutum* cell growth under iron deficiency conditions by the heterologous expression of a green algal plastocyanin**

Carmen Castell, Encarnación Díaz-Santos, Luis G. Heredia-Martínez, Luis López-Maury, José M. Ortega, Manuel Hervás, José A. Navarro, Mercedes Roncel

**P138 - Discovering novel c-di-GMP activated EPS in bacteria**

Daniel Perez-Mendoza, Manuel Döring, Broder Rühmann, Volker Sieber, Juan Sanjuán, Jochen Schmid



# **RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES**





## Conferencia inaugural

### **Desentrañando la función biológica de una banda de Northern blot de 80 nucleótidos de *Sinorhizobium meliloti***

Claudio Valverde

Laboratorio de Fisiología y Genética de Bacterias Beneficiosas para Plantas, Centro de Bioquímica y Microbiología del Suelo, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina

*Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* (Sm) es una  $\alpha$ -proteobacteria que habita en el suelo y que puede establecer un estilo de vida endosimbiótico como un bacteroide altamente diferenciado y dedicado a la fijación biológica de nitrógeno dentro de los nódulos de la raíz de alfalfa y de especies relacionadas de Medicago. De un hábitat a otro, Sm enfrenta cambios significativos en la expresión génica que requieren un ajuste fino en diferentes niveles. Una capa importante de regulación está determinada por small RNAs (o sRNAs), que son ARNs pequeños no codificantes que actúan en trans sobre ARNs mensajeros. Como en otros microorganismos, los sRNAs son actores protagónicos en el control postranscripcional de la expresión génica, a menudo con la ayuda de proteínas de unión a ARN como Hfq o ProQ, controlando la tasa traduccional y/o estabilidad de mRNAs a través de apareamiento de bases imperfecto alrededor del sitio de unión a ribosomas. El genoma tripartito de Sm expresa cientos de sRNAs, pero sólo se ha caracterizado la función biológica de apenas una decena de ellos. En esta oportunidad, se ilustrará el camino experimental que en nuestro grupo hemos recorrido para aprender sobre la función biológica de un sRNA de Sm, partiendo de la identificación de su secuencia por genómica comparativa de rizobios y de su detección como una banda de 80 nucleótidos en *Northern blot*, hasta la reciente caracterización de su interactoma.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Primera Mención Honorífica PREMIO DE INVESTIGACIÓN MICROMOL 2022

### RNA thermoswitches modulate *Staphylococcus aureus* adaptation to ambient temperatures

Aranca Catalán-Moreno, Marta Cela, Pilar Menéndez-Gil, Naiara Irurzun, Carlos J. Caballero, Isabelle Caldelari y Alejandro Toledo-Arana  
Nucleic Acids Research, 2021, Vol. 49, No. 6: 3409–3426

Thermoregulation of virulence genes in bacterial pathogens is essential for environment-to-host transition. However, the mechanisms governing cold adaptation when outside the host remain poorly understood. Here, we found that the production of cold shock proteins CspB and CspC from *Staphylococcus aureus* is controlled by two paralogous RNA thermoswitches. Through *in silico* prediction, enzymatic probing and site-directed mutagenesis, we demonstrated that *cspB* and *cspC* 5'UTRs adopt alternative RNA structures that shift from one another upon temperature shifts. The open (O) conformation that facilitates mRNA translation is favoured at ambient temperatures (22°C). Conversely, the alternative locked (L) conformation, where the ribosome binding site (RBS) is sequestered in a double-stranded RNA structure, is folded at host-related temperatures (37°C). These structural rearrangements depend on a long RNA hairpin found in the O conformation that sequesters the anti-RBS sequence. Notably, the remaining *S. aureus* CSP, CspA, may interact with a UUUGUUU motif located in the loop of this long hairpin and favour the folding of the L conformation. This folding represses CspB and CspC production at 37°C. Simultaneous deletion of the *cspB/cspC* genes or their RNA thermoswitches significantly decreases *S. aureus* growth rate at ambient temperatures, highlighting the importance of CspB/CspC thermoregulation when *S. aureus* transitions from the host to the environment.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Segunda Mención Honorífica PREMIO DE INVESTIGACIÓN MICROMOL 2022

### **Genetic dominance governs the evolution and spread of mobile genetic elements in bacteria**

Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Vidar Sørum, Macarena Toll-Riera, Carmen de la Vega, Rafael Peña-Miller y Álvaro San Millán

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2020, Vol. 117, No. 27: 15755–15762

Mobile genetic elements (MGEs), such as plasmids, promote bacterial evolution through horizontal gene transfer (HGT). However, the rules governing the repertoire of traits encoded on MGEs remain unclear. In this study, we uncovered the central role of genetic dominance shaping genetic cargo in MGEs, using antibiotic resistance as a model system. MGEs are typically present in more than one copy per host bacterium, and as a consequence, genetic dominance favors the fixation of dominant mutations over recessive ones. In addition, genetic dominance also determines the phenotypic effects of horizontally acquired MGE-encoded genes, silencing recessive alleles if the recipient bacterium already carries a wild-type copy of the gene. The combination of these two effects governs the catalog of genes encoded on MGEs. Our results help to understand how MGEs evolve and spread, uncovering the neglected influence of genetic dominance on bacterial evolution. Moreover, our findings offer a framework to forecast the spread and evolvability of MGE-encoded genes, which encode traits of key human interest, such as virulence or antibiotic resistance.





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Evolution of habitat-dependent antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

Pablo Laborda, José Luis Martínez, Sara Hernando-Amado

Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Darwin 3. 28049-Madrid. Spain  
[plaborda@cnb.csic.es](mailto:plaborda@cnb.csic.es)

*Pseudomonas aeruginosa* is a human opportunistic pathogen which usually causes difficult-to-treat infections due to its low intrinsic antibiotic susceptibility and outstanding capacity of becoming resistant to antibiotics. In addition, it has a remarkable metabolic versatility, being able to grow in different habitats, from natural niches to different and changing in-patient environments. In this work, we addressed the extent to which the evolutionary routes towards antibiotic resistance (AR) may vary depending on nutrients' availability, mimicking conditions that can be encountered during infection. Specifically, we studied the evolution of *P. aeruginosa* towards resistance to tobramycin, ceftazidime and ceftazidime-avibactam in urine and synthetic sputum and compared them with the ones previously performed in the commonly used laboratory rich medium.

We found that tobramycin, ceftazidime and ceftazidime-avibactam resistance evolution is contingent on the medium in which the selection pressure is applied. Changes in the susceptibility to the selective antibiotic and to other drugs -cross-resistance and collateral sensitivity patterns- differed depending on whether the populations evolved in urine, synthetic sputum or rich laboratory media. This occurred because some of the mutations acquired were specific of each environment. We observed that fitness costs and AR associated with particular mutations was different in each medium, being some genetic modifications the optimal solution to the selective force exerted by the antibiotic in the respective environment. This indicates that the bacterial metabolic state rendered by each habitat modifies the phenotype associated with each genetic modification and, therefore, the selection of AR mutations is environment-dependent.

Predicting evolution towards AR and its associated trade-offs, as collateral sensitivity, could lead to evolution-based strategies to tackle AR. However, evolutionary trade-offs associated with resistance to a drug may be distinct in different environments, hence the design of these strategies should take into account the restrictions imposed in each particular infection in different body locations. Here we show that simply the use of rich laboratory medium for the prediction of AR evolution is not enough to fully understand the evolutionary pathways of bacteria causing infections in body locations with different nutritional composition. This information is needed for the clinical exploitation of such evolution-based anti-infection procedures.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **Deciphering the molecular mechanism behind plasmid-associated collateral sensitivity**

Cristina Herencias, Jerónimo Rodríguez-Beltrán and Álvaro San Millán

Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS)  
[cherodr@gmail.com](mailto:cherodr@gmail.com)

Collateral sensitivity (CS) occurs when the acquisition of resistance to one antibiotic produces increased susceptibility to a second antibiotic. CS can be used as an alternative strategy to constraint antibiotic resistance development during bacterial evolution. We recently reported that the acquisition of complete ABR plasmids induces CS several antibiotics, including the clinically relevant, conjugative plasmid pOXA-48. We used classic genetic approaches to dissect the pOXA-48 plasmid and determine which specific genes are responsible for the CS phenotype. In addition, taking advantage of transcriptomic analysis, we sought to unveil plasmid-specific regulatory and metabolic networks contributing to the CS phenotype. Deciphering the molecular mechanism behind CS will be crucial to understanding the complex effects that antibiotics cause on bacterial metabolism and will allow us to rationally design à la carte therapies for specific bacterial infections.





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### **Movilización interbacteriana de *aac(3)-IV* en el microbioma intestinal**

Bosco R. Matamoros, Carlos Serna, Gabriel Moyano, Emilia Wedel, Irene Sánchez Méndez, Natalia Montero, Bruno Gonzalez-Zorn

Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

[bosrodri@ucm.es](mailto:bosrodri@ucm.es)

Pese a haber sido ampliamente usada en medicina veterinaria desde los años 70, la apramicina ha emergido en los últimos años como una gran alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos. En la actualidad se están realizando ensayos clínicos para evaluar la eficacia y seguridad de la apramicina para su uso en humanos. Sin embargo, su uso también ha llevado asociado la aparición de mecanismos de resistencia. A día de hoy se conocen pocas enzimas que confieran resistencia a apramicina, entre las que destaca *aac(3)-IV* por ser la de mayor prevalencia. Sin embargo, de acuerdo a la literatura, la prevalencia de este gen sigue siendo baja, aunque este hecho podría cambiar cuando la apramicina sea aprobada para su uso en humanos.

Para evaluar los efectos del consumo de apramicina en el microbioma intestinal, analizamos datos metagenómicos de veinte granjas de pollo con datos de consumo de antibióticos accesibles. En base a los análisis de  $\alpha$  y  $\beta$ -diversidad, las granjas que usan apramicina y las no tratadas no presentan composiciones taxonómicas diferentes. No obstante, las granjas tratadas con apramicina demuestran una mayor diversidad de determinantes de resistencia y sus composiciones de genes de resistencia son significativamente diferentes de las de las granjas no tratadas. El análisis de abundancia diferencial demuestra que entre los genes que explican de manera más probable esta diferencia observada se encuentra el gen *aac(3)-IV*. El estudio del entorno cercano de este determinante de resistencia en las distintas granjas revela que está altamente asociado a otro gen de resistencia a aminoglucósidos, a una secuencia de inserción y a una transposasa truncada formando una unidad de movilización que puede ser encontrada en diferentes especies bacterianas. Con este estudio hemos demostrado que el uso de la apramicina no parece tener un efecto importante en la composición taxonómica del microbioma intestinal de pollo, pero sí que parece ejercer un efecto remodelador de su resistoma. Además, el tratamiento con apramicina parece seleccionar el gen *aac(3)-IV* mediante la promoción de la movilización de la unidad transposable en la que se encuentra entre diferentes elementos genéticos y especies bacterianas.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Análisis de la resistencia a antibióticos mediante encapsulación de células individuales de *Salmonella enterica***

María Antonia Sánchez-Romero, Rocío Carvajal-Holguera, Marina Cabas-Santos, María Candel-Pecellín, Rocío Fernández-Fernández y Josep Casadesús

Dpto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.  
[mtsanchez@us.es](mailto:mtsanchez@us.es)

La resistencia a los antibióticos sigue siendo una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo, debido al aumento de la morbilidad y la mortalidad. La mayoría de los mecanismos de resistencia a los antibióticos son genéticamente estables, donde todas las células de una población de un aislado específico muestran el mismo fenotipo de resistencia. Sin embargo, ocasionalmente se observan aislamientos en los que diferentes subpoblaciones dentro de un aislado en particular exhiben diferentes susceptibilidades a un agente antimicrobiano en particular. El conocimiento de los mecanismos responsables de la resistencia a antibióticos es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan encontrar tratamientos más eficaces contra las infecciones bacterianas. Nosotros hemos empleado las nuevas tecnologías basadas en microencapsulación unicelular, que facilita el aislamiento y análisis de colonias microscópicas, para estudiar la contribución de la heterogeneidad fenotípica a la resistencia antibiótica. Hemos desarrollado un protocolo para encapsular células individuales de *S. enterica* que nos permite estudiar subpoblaciones derivadas de una única célula. Este protocolo, fácilmente reproducible en los laboratorios, permite monitorizar el crecimiento bacteriano y estudiar la proliferación y viabilidad bacteriana bajo exposición a antibióticos.

Los resultados de este trabajo revelan la existencia de heterogeneidad fenotípica en presencia de varios antibióticos con diferentes mecanismos de acción (carbanémicos como el ertapenem, aminoglicósidos como el amikacin y polimixinas como la colistin). En las poblaciones de *S. enterica* derivadas de una sola célula se han detectado una enorme diversidad en los niveles de supervivencia/resistencia en presencia de estos antibióticos, siendo estos fenotipos reversibles con una alta frecuencia. Aunque la resistencia mutacional no puede descartarse, la alta frecuencia de formación de poblaciones resistentes es un indicio de resistencia no mutacional. Parece obvio que la heterogeneidad fenotípica podría explicar el fracaso de muchos tratamientos de infecciones bacterianas con antibióticos. Por lo tanto, este estudio abre la posibilidad de utilizar las microcápsulas de alginato como un método novedoso, alternativo y complementario a los métodos tradicionales de estudio de la resistencia a antibióticos.



## **A mutation accumulation assay to evaluate the effect of rifampicin on the evolution of the *Mycobacterium smegmatis* genome**

Cebrián-Sastre, E.<sup>1</sup>; Chiner-Oms, A.<sup>2</sup>; Torres-Pérez, R.<sup>3</sup>; Comas, I.<sup>2</sup>; Oliveros, J.C.<sup>3</sup>; Blázquez, J.<sup>1</sup> and Castañeda-García, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Departamento de Biotecnología Microbiana. Centro Nacional de Biotecnología (CNB – CSIC), 28049 Madrid, Spain

<sup>2</sup>. Unidad de Genómica de la Tuberculosis, Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV – CSIC), 46010 Valencia, Spain

<sup>3</sup>. Servicio de Bioinformática para Genómica y Proteómica. Centro Nacional de Biotecnología (CNB–CSIC), 28049 Madrid, Spain

[esmeralda.cebrian@cnb.csic.es](mailto:esmeralda.cebrian@cnb.csic.es)

Rifampicin is the most important first-line antibiotic against tuberculosis (TB), a disease that today remains one of the top causes of death worldwide. Rifampicin-resistant and multidrug-resistant TB constitute a major global public health problem that makes the control of the disease more difficult. Thus, studies to understand antibiotic resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* and to develop new treatments are crucial. With the aim of exploring the effect of rifampicin on mutation rate and studying the evolutionary adaptation to this antibiotic in mycobacteria, in this work we have performed a mutation accumulation (MA) assay in presence of increasing concentrations of rifampicin in a wild type and a hypermutator  $\Delta nucS$  strain of the nonpathogenic model species *Mycobacterium smegmatis*. Genomic DNA of the MA lines was extracted and sequenced by whole genome sequencing (WGS). When compared with a previous MA experiment in absence of antibiotic (Castañeda-García *et al.*, 2020), we determined that the treatment with rifampicin generated an increase in mutation rate, more marked in the wild type strain, where the mutation rate was doubled. Moreover, by sequencing the *rpoB* gene and analyzing the rifampicin resistant level of the MA lines during the different weeks of evolution, we observed that the absence of *nucS* accelerated the acquisition of *rpoB* mutations and led to higher levels of resistance. Lastly, the use of the *nucS*-deficient strain has proved to be helpful to search for new *rpoB*-independent mechanisms involved in rifampicin resistance, being remarkable the presence of mutations in several genes encoding transmembrane transport proteins and metabolic enzymes. This work is the first one exploring the total mutations of the genome by MA/WGS under rifampicin selective pressure in a wild type mycobacterium and its hypermutator derivative, putting the focus on mutation rate and the evolutionary trajectory to drug resistance in mycobacteria.

### **References**

Castañeda-García, A.; Martín-Blecua, I.; Cebrián-Sastre, E.; Chiner-Oms, A.; Torres-Puente, M.; Comas, I.; Blázquez, J. Specificity and mutagenesis bias of the mycobacterial alternative mismatch repair analyzed by mutation accumulation studies. *Sci Adv.* 2020, 6(7):eaay4453. doi: 10.1126/sciadv.aay4453.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**La bomba ABC de la enterocina MR10A/B podría ser responsable de grupos de resistencia cruzada entre distintas bacteriocinas**

Claudia Teso-Pérez, Manuel Martínez-Bueno, Juan Manuel Peralta-Sánchez, Eva Valdivia, Mercedes Maqueda, María Esther Fárez-Vidal, Antonio M. Martín-Platero.

Dpto. Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada  
[claudiatp@ugr.es](mailto:claudiatp@ugr.es)

Las bacterias producen frecuentemente péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) frente a sus competidores. Estas son inofensivas para la bacteria productora gracias a determinantes genéticos que confieren autoinmunidad. Hasta qué punto esta inmunidad puede conferir resistencia a otras bacteriocinas es algo desconocido. La autoinmunidad puede estar mediada por un transportador ABC, como es el caso de la enterocina As-48, que presenta dos sistemas de transporte ABC: *as-48C<sub>1</sub>D* (Transportador-1), implicado en la secreción, y *as-48EFGH* (Transportador-2), implicado en la eliminación de la enterocina. Este último muestra una alta identidad con el transportador ABC de las enterocinas MR10A y MR10B. La resistencia cruzada entre dos tipos de enterocina, pertenecientes a clases diferentes Clase II (MR10A/B) y Clase I (As-48) no ha sido descrita hasta el momento. El objetivo fue dilucidar el papel del Transportador-2 en la resistencia a otras bacteriocinas mediante: (1) análisis de la sensibilidad a MR10A/B de una colección de mutantes del *cluster as-48*; y (2) análisis de la distribución de este transportador en otras especies microbianas y su asociación a la producción de bacteriocinas.

Sólo los mutantes de *as-48* que contenían el Transportador-2 completo mostraron resistencia a MR10A/B. Se determinó así mismo un alto grado de identidad entre el Transportador-2 de la enterocina As-48 y el transportador ABC de las enterocinas MR10A/B. Estos resultados indicaron el papel de este transportador ABC en la resistencia cruzada entre ambas bacteriocinas.

Este transportador se encontró exclusivamente en enterococos sp. y mayoritariamente asociado a alguna de las variantes de L50 (p.e. MR10) y a variantes de la familia circularina A/uberolisina (p.e. AS-48). Además, se detectó con baja frecuencia sin asociación a producción de bacteriocina.

Dada la resistencia cruzada entre bacteriocinas, y su presencia en múltiples enterocinas, esta bomba ABC podría estar implicada en la resistencia cruzada entre un grupo amplio de productores de bacteriocinas, incluso en la resistencia en cepas no productoras de bacteriocina. Esto podría significar que los mecanismos de resistencia cruzada podrían intervenir en interacciones multilaterales en lugar de interacciones bilaterales, lo que implica un gran impacto en la visión actual de las dinámicas de los patrones de producción y resistencia en las comunidades microbianas.

### Referencias

Claudia Teso-Pérez et al, 2021. Enterocin Cross-Resistance Mediated by ABC Transport System. *Microorganisms* 2021, 9(7), 1411; <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071411>

Claudia Teso-Pérez et al, *In prep.* Cross-resistance groups in enterococcal populations by means of ABC-transporter immunity.

### Financiación

Financiado por el proyecto A-BIO-083-UGR18 del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014–2020 (Junta de Andalucía). C.T.-P. ha sido beneficiaria del Plan Estatal de Garantía Juvenil (Fondo Social Europeo, Gobierno de España, Ref. PEJ2018-003019-A).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Cancelado**



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **Rol de la transposición de ISCR1 en la dinámica de mantenimiento y diseminación del gen de la carbapenemasa NDM-1**

Mario Pulido-Vadillo, Jose F Delgado-Blas, Emilia Wedel, Irene Sánchez Méndez, Bosco R. Matamoros, Natalia Montero, Bruno Gonzalez-Zorn.

Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

[mpulid02@ucm.es](mailto:mpulid02@ucm.es)

La resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la Salud Pública global. Las carbapenemasas son enzimas que confieren resistencia a los carbapenemas, antibióticos de “último recurso” reservados para el tratamiento de infecciones multirresistentes. El gen que codifica una de estas enzimas, *bla*<sub>NDM-1</sub>, está presente en multitud de aislados bacterianos de todo el mundo, y se encuentra frecuentemente asociado a Elementos Genéticos Móviles (EGMs) como plásmidos y transposones, que condicionan su movilización. Por ello, este trabajo se basa en el estudio de uno de los EGMs que más han influido en el mantenimiento y diseminación de *bla*<sub>NDM-1</sub> y del que poco se conoce acerca de su comportamiento biológico, la secuencia de inserción ISCR1.

Se llevó a cabo el análisis genómico de 25 aislados productores de carbapenemasas de aguas residuales de hospitales de Tamale (Ghana) mediante secuenciación masiva con tecnología Illumina y Nanopore. Entre ellos, 17 aislados de la familia *Enterobacterales* portaban el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> flanqueado por una estructura conservada asociada a elementos transponibles ISCR1. Esta estructura, integrada en un plásmido de tipo IncC, se encontró en múltiples copias por bacteria. Esto podría ser consecuencia del supuesto mecanismo de transposición replicativa de ISCR1, el cual conduciría a un incremento en el número de copias del gen *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Para estudiar el papel de la transposición de ISCR1 sobre la resistencia a carbapenemas mediada por el gen *bla*<sub>NDM-1</sub>, se transformó una cepa laboratorial *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido común IncC portador de la estructura ISCR1\_*bla*<sub>NDM-1</sub>. A partir de esta construcción, se llevaron a cabo experimentos de evolución en presencia/ausencia de carbapenemas, y se analizaron los efectos en el perfil fenotípico de resistencia y en el número de copias de *bla*<sub>NDM-1</sub>, mediante determinación de la CMI en ensayos de microdilución en placa y PCR cuantitativa, respectivamente. Los resultados revelaron el comportamiento biológico de la estructura ISCR1\_*bla*<sub>NDM-1</sub> en función de la presión de selección. El conocimiento de la dinámica de los EGMs y su papel en el mantenimiento y diseminación de la resistencia a carbapenemas mediada por *bla*<sub>NDM-1</sub> es clave para preservar la efectividad de estos antibióticos de último recurso.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Conjugation ability/permmissiveness and acquired resistance level shape the distribution of a carbapenem resistance plasmid**

[Aída Alonso-del Valle](#)<sup>1</sup>, Laura Toribio-Celestino<sup>1</sup>, Álvaro San Millán<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Biotecnología-CNB-CSIC, Madrid, Spain  
[aalonso@cnb.csic.es](mailto:aalonso@cnb.csic.es)

The distribution of plasmids across bacterial hosts is not random in nature. Certain associations between antimicrobial resistance (AMR) plasmids and bacteria become particularly successful, creating “superbugs” that disseminate uncontrollably in clinical settings. An example is the strong association observed between certain clones of *Klebsiella pneumoniae* and the clinically relevant carbapenem-resistance conjugative plasmid pOXA-48. In a previous study, we showed that plasmid distribution was not explained by the plasmid-associated fitness effects in the bacterial hosts. In this study we analyzed the (i) AMR level to different  $\beta$ -lactam antibiotics conferred by pOXA-48 and (ii) the ability to receive the plasmid through conjugation *in vitro* and *in vivo*, in wild-type, ecologically compatible enterobacterial isolates from the human gut microbiota. Our results showed that pOXA-48 confers significantly higher antibiotic resistance levels and a higher permmissiveness for plasmid uptake by conjugation in *Klebsiella* spp. compared to *E. coli*. Genomic and transcriptomic analysis revealed differences in the plasmid copy number and in the expression level of carbapenemase between species. These results help to explain the occurrence and prevalence of these successful plasmid-bacteria associations, which are of particular concern in clinical settings.



## RNase HI as a dual target for anti-virulence and anti-resistance strategies

Roberto Balbontín, Joaquín Bernal-Bayard and Francisco Ramos-Morales

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla  
[rbalbontin@us.es](mailto:rbalbontin@us.es)

Bacterial pathogenesis and antibiotic resistance are increasing threats with the capacity to synergize, multiplying their combined detrimental effects on global health and economy<sup>1-3</sup>. Two promising approaches recently proposed to tackle this dual challenge are non-biocidal inhibition of virulence traits (anti-virulence strategy)<sup>4,5</sup>, and the use of eco-evolutionary dynamics to limit the spread of antibiotic resistance in bacterial populations (anti-resistance strategy)<sup>6,7</sup>. These strategies require the identification of bacterial factors involved in gene expression, bacterial fitness and evolution. The so-called R-loops (RNA-DNA hybrids formed during transcription) strongly influence these traits<sup>8-14</sup>. Thus, RNase HI, the enzyme responsible for R-loop degradation, is a potential target for anti-virulence and anti-resistance approaches. We recently showed that the absence of RNase HI causes a significant reduction in the fitness of *Escherichia coli* carrying antibiotic resistance mutations, driving resistant bacteria to extinction even in populations with high initial frequency of resistance, both under laboratory conditions and during gut colonization<sup>15,16</sup>. Interestingly, we observed that lack of RNase HI can also influence the expression levels of virulence genes in *Salmonella enterica*, suggesting that RNase HI could serve as dual target for simultaneous implementation of anti-virulence and anti-resistance strategies.

1. GLASS | Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. *WHO* <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2017-2018/en/>.
2. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **0**, (2022).
3. Cepas, V. & Soto, S. M. Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)* **9**, E719 (2020).
4. Ogawara, H. Possible drugs for the treatment of bacterial infections in the future: anti-virulence drugs. *J Antibiot (Tokyo)* **74**, 24–41 (2021).
5. Hotinger, J. A., Morris, S. T. & May, A. E. The Case against Antibiotics and for Anti-Virulence Therapeutics. *Microorganisms* **9**, 2049 (2021).
6. Baquero, F., Coque, T. M. & de la Cruz, F. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 3649–3660 (2011).
7. Andersson, D. I. *et al.* Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS Microbiol Rev* **44**, 171–188 (2020).
8. Cheng, B. *et al.* RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 237–242 (2003).
9. Poteete, A. R. Expansion of a chromosomal repeat in *Escherichia coli*: roles of replication, repair, and recombination functions. *BMC Mol Biol* **10**, 14 (2009).
10. Shen, Y., Koh, K. D., Weiss, B. & Storici, F. Mismatched rNMPs in DNA are mutagenic and are targets of mismatch repair and RNases H. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 98–104 (2011).
11. Naka, K., Koga, M., Yonesaki, T. & Otsuka, Y. RNase HI stimulates the activity of RnIA toxin in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **91**, 596–605 (2014).
12. Maduiké, N. Z., Tehranchi, A. K., Wang, J. D. & Kreuzer, K. N. Replication of the *Escherichia coli* chromosome in RNase HI-deficient cells: multiple initiation regions and fork dynamics. *Mol Microbiol* **91**, 39–56 (2014).
13. Tannous, E., Kanaya, E. & Kanaya, S. Role of RNase H1 in DNA repair: removal of single ribonucleotide misincorporated into DNA in collaboration with RNase H2. *Sci Rep* **5**, 9969 (2015).
14. Drolet, M. & Brochu, J. R-loop-dependent replication and genomic instability in bacteria. *DNA Repair (Amst)* **84**, 102693 (2019).
15. Moura de Sousa, J., Balbontín, R., Durão, P. & Gordo, I. Multidrug-resistant bacteria compensate for the epistasis between resistances. *PLoS Biol* **15**, e2001741 (2017).
16. Balbontín, R., Frazão, N. & Gordo, I. DNA Breaks-Mediated Fitness Cost Reveals RNase HI as a New Target for Selectively Eliminating Antibiotic-Resistant Bacteria. *Mol Biol Evol* **38**, 3220–3234 (2021).





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Ecología, conservación y microbiología molecular en costa rica: valorando el impacto del ser humano en ecosistemas silvestres.**

Cristina Calvo-Fernandez<sup>1</sup>, Marta M. Dolcet Negre<sup>1</sup>, Emilia Wedel<sup>1</sup>, Jose Francisco Delgado-Blas<sup>1</sup>, Irene Sánchez Méndez<sup>1</sup>, Natalia Montero<sup>1</sup>, Encarnación García Vila<sup>2</sup>, Roger Such Basiana<sup>2</sup>, Bruno Gonzalez-Zorn<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

<sup>2</sup> Jaguar Rescue Center, Puerto Viejo de Talamanca, Costa Rica  
[crical02@ucm.es](mailto:crical02@ucm.es)

La resistencia a los antibióticos es un grave problema sanitario a nivel mundial. Gran número de bacterias resistentes son de origen zoonótico y numerosos trabajos se han realizado en animales domésticos y de producción. Sin embargo, los estudios en fauna silvestre son escasos, a pesar de jugar un papel fundamental en la transmisión de dichos patógenos.

El objetivo principal de este estudio fue analizar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de 47 aislados de *Escherichia coli* obtenidos de hisopos rectales en Costa Rica de dos especies de perezosos silvestres, los perezosos de tres dedos, *Bradypus variegatus* (3D), n=15; y perezosos de dos dedos. *Choloepus hoffmanni* (2D), n=32. Las muestras fueron obtenidas entre septiembre de 2019 y enero de 2020. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron mediante difusión en disco y microdilución en placas comerciales Sensititre™. Los aislados fueron secuenciados con tecnología Illumina para su caracterización genómica. Se seleccionaron los antibióticos frente a los que se detectó resistencia y se analizó la relación del perfil de resistencia con la proximidad a núcleos poblacionales teniendo en cuenta también las diferencias ecológicas entre especies.

Los estudios fenotípicos revelaron niveles destacadamente bajos de resistencia. En 3D solo se observó resistencia frente a sulfametoxazol en el 40% de los aislados. La especie 2D presentó resistencia frente a sulfametoxazol (25%), tetraciclina (9,37%), cloranfenicol (6,25%), ampicilina (6,25%), trimetoprim (3,12%) y ciprofloxacino (3,12%). A nivel genético, no se identificaron genes de resistencia en 3D. Además, el 40% de secuenciotipos eran nuevos. En la especie 2D se identificaron genes de resistencia en un 9,37% encontrando los genes *tet(A)*, *tet(B)*, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *aph(3'')-IId*, *aph(6)-IId*, *sul2*, *qnrS1*, *floR*, *dfrA8*. Los aislados restantes no poseían genes de resistencias (90,63%). En esta especie solo el 6,25% eran secuenciotipos nuevos. Respecto al contenido plasmídico, en ambas especies se identificaron plásmidos, 93,33% en 3D y 59,37% en 2D, siendo los replicones más frecuentes: ColRNAI, IncFIB, IncFII.

Este estudio demuestra la existencia de la relación entre la proximidad y mayor nivel de resistencia, evidenciando el riesgo de la cercanía a la población humana en la emergencia y diseminación de bacterias resistentes y los mecanismos que portan.



## **Análisis de la actividad antimicrobiana de un clon con ADN metagenómico proveniente de una pila de compostaje de una refinería**

Luis Andreo Andreu, Cynthia Alías Villegas, Sebastián Acosta Jurado, Amando Flores Díaz, Eva M<sup>a</sup> Camacho Fernández

Nombre del Centro o Institución: Universidad Pablo de Olavide  
[emcamfer@upo.es](mailto:emcamfer@upo.es)

La expansión de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos actuales entre las bacterias patógenas está dando lugar a bacterias multirresistentes que suponen un grave problema de salud pública y se estima que, de no tomarse las medidas adecuadas, el número de muertes debidas a microorganismos resistentes en 2050 podría superar las debidas al cáncer.

Para combatir estas bacterias multirresistentes es necesario encontrar nuevos antimicrobianos (AM) efectivos frente a las mismas. Los antibióticos que usamos en la actualidad derivan de AM naturales, muchos de ellos producidos por bacterias. Sin embargo, la extraordinaria diversidad microbiana aún permanece oculta en la naturaleza debido a la imposibilidad de cultivar la mayor parte de los microorganismos naturales en el laboratorio. Una alternativa para solventar este tipo de limitaciones son los estudios metagenómicos en los que se accede directamente al ADN ambiental sin necesidad de cultivar el microorganismo del que procede.

La metagenómica funcional se basa en la expresión heteróloga de ADN ambiental en una bacteria hospedadora y la posterior detección de un determinado fenotipo debido a la adquisición de un clon con ADN metagenómico que posee una función o actividad particular. En nuestro laboratorio disponemos de varias metagenotecas y estirpes especializadas que aumentan las posibilidades de expresar el ADN metagenómico (1, 2). Actualmente estamos escrutando estas metagenotecas en busca de nuevas actividades antimicrobianas.

El clon UPO15 es uno de los clones con este tipo de actividad, aislado a partir de una metagenoteca de una pila de compostaje de una refinería. El clon presenta actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* MRSA, uno de los patógenos multirresistentes que más preocupan a las instituciones sanitarias europeas. El análisis de la secuencia de UPO15 indica que no contiene ningún gen relacionado anteriormente con la producción de antimicrobianos. En este trabajo presentamos la caracterización inicial de la actividad antimicrobiana de UPO15, así como la identificación de los genes responsables de dicha actividad.

1. Terrón-González L, Martín-Cabello G, Ferrer M, Santero E. 2016. Functional metagenomics of a biostimulated petroleum-contaminated soil reveals an extraordinary diversity of extradiol dioxygenases. *Appl Environ Microbiol* 82:2467–2478.
2. Terrón-González L, Medina C, Limón-Mortés MC, Santero E. 2013. Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Sci Rep* 3.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y por la Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad, de la Junta de Andalucía, en marco del programa operativo FEDER Andalucía 2014-2020. UPO-1380700



## **Contribución de la heterogeneidad fenotípica a la resistencia a los antibióticos ertapenem y amikacin en *Salmonella enterica***

Rocío Carvajal-Holguera, Marina Cabas-Santos, Josep Casadesús y María Antonia Sánchez-Romero

Dpto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.  
[rociocarvajal06@gmail.com](mailto:rociocarvajal06@gmail.com)

En el siglo XX, los antibióticos revolucionaron el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, su eficacia y la prescripción frecuente han llevado a su uso excesivo, con la selección concomitante de variantes bacterianas resistentes a estos medicamentos. El conocimiento de los mecanismos responsables de la resistencia a antibióticos es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan encontrar tratamientos más eficaces contra las infecciones bacterianas. La tecnología “flow focusing” permite encapsular células en microcápsulas de una forma rápida y simple. La encapsulación de células se lleva a cabo a través de la mezcla del cultivo celular con alginato (un precursor de gel) que al entrar en contacto con cloruro cálcico permite la formación de las cápsulas de alginato cálcico.

En este trabajo se ha desarrollado un protocolo que permite la encapsulación de una única célula de *Salmonella enterica* en microcápsulas de alginato. La encapsulación de células individuales de *S. enterica* nos permite monitorizar la proliferación celular y estudiar cómo le afecta la presencia de los antibióticos. Los estudios se realizaron con dos antibióticos con diferentes mecanismos de acción: ertapenem (carbapenémico) y amikacin (aminoglicósido). En primer lugar, se han descrito ensayos para analizar la susceptibilidad de *S. enterica* a ambos antibióticos, determinando las concentraciones subinhibitorias e inhibitorias del antibiótico en diferentes condiciones. En segundo lugar, se han optimizado algunos parámetros para encapsular células individuales de *Salmonella* en microcápsulas de alginato para estudiar linajes celulares. En tercer lugar, se han estudiado los efectos del ertapenem y amikacin sobre el crecimiento y la proliferación de células individuales de *Salmonella* “encerradas” en microcápsulas.

Los resultados de este trabajo revelan la existencia de heterogeneidad fenotípica en presencia de ertapenem y amikacin y se han detectado niveles variados de resistencia en las poblaciones de *S. enterica* derivadas de una sola célula. La alta frecuencia y la diversidad de niveles de supervivencia/resistencia en células expuestas a antibióticos son argumentos a favor de la resistencia no mutacional. Así mismo, este trabajo contribuye a la puesta a punto de una nueva metodología para estudiar la heterogeneidad celular y cómo ésta contribuye a la resistencia a antibióticos.



### **Within-patient evolution of plasmid-mediated antimicrobial resistance**

Javier DelaFuente<sup>1,\*</sup>, Laura Toribio-Celestino<sup>1</sup>, Alfonso Santos-Lopez<sup>1,2,3</sup>, Ricardo Leon-Sampedro<sup>4</sup>, Aida Alonso-del Valle<sup>1</sup>, Coloma Costas<sup>1</sup>, Marta Hernandez-Garcia<sup>2,6</sup>, Lun Cui<sup>5</sup>, Jeronimo Rodriguez-Beltran<sup>2,6</sup>, David Bikard<sup>5</sup>, Rafael Canton<sup>2,6</sup>, Alvaro San Millan<sup>1,3,\*</sup>

1. Centro Nacional de Biotecnología (CNB), CSIC. Madrid, Spain.
2. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramon y Cajal-IRYCIS. Madrid, Spain.
3. Centro de Investigación Biológica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
4. Institute of Integrative Biology, Department of Environmental Systems Science, ETH Zurich, Switzerland
5. Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS UMR 6047, Synthetic Biology, 75015 Paris, France
6. Centro de Investigación Biológica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Antibiotic resistance (AMR) in bacteria is a major threat to public health, and one of the key elements in the spread and evolution of AMR in clinical pathogens is the transfer of conjugative plasmids. The drivers of AMR evolution have been extensively studied *in vitro*, but the evolution of plasmid-mediated AMR *in vivo* remains poorly explored. Here, we tracked the evolution of the clinically-relevant plasmid pOXA-48, which confers resistance to the last-resort antibiotics carbapenems, in a large collection of enterobacterial clones isolated from the gut of hospitalised patients. Combining genomic and experimental approaches, we first characterized plasmid diversity and the genotypic and phenotypic effects of multiple plasmid mutations on a common genetic background. Second, using cutting-edge genomic editing in wild-type multidrug resistant enterobacteria, we dissected three cases of within-patient plasmid-mediated AMR evolution. Our results revealed, for the first time, compensatory evolution of plasmid-associated fitness cost, as well as the evolution of enhanced plasmid-mediated AMR, in bacteria evolving within the gut of hospitalised patients. Crucially, we observed that the evolution of plasmid-mediated AMR *in vivo* involves a pivotal trade-off between resistance levels and bacterial fitness. This study highlights the need to develop new evolution-informed approaches to tackle plasmid-mediated AMR dissemination.



## **Evolución de la resistencia a carbapenemas y aminoglucósidos en aguas residuales hospitalarias de Ghana**

Jose F. Delgado-Blas<sup>1</sup>, Marta M. Dolcet-Negre<sup>1</sup>, Mario Pulido-Vadillo<sup>1</sup>, Natalia Montero<sup>1</sup>, Cristina Calvo-Fernandez<sup>1</sup>, Carlos Serna<sup>1</sup>, Courage K. S. Saba<sup>2</sup>, Bruno Gonzalez-Zorn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University for Development Studies, Tamale, Ghana

En 2017, realizamos un estudio en canalizaciones de aguas residuales de Tamale (Ghana), determinando que la estrecha interacción entre poblaciones bacterianas clínicas y ambientales favorecía la emergencia y diseminación de mecanismos de resistencia a carbapenemas y aminoglucósidos a través de diversas rutas biológicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la evolución de este escenario después de cuatro años.

En 2021, se recolectaron nueve muestras de aguas residuales de canalizaciones dentro y alrededor de tres hospitales muestreados en 2017. Se aislaron bacterias productoras de carbapenemasas y metiltransferasas del ARNr 16S en placas con imipenem y gentamicina+amikacina, respectivamente. Se identificaron hasta tres aislados por placa mediante MALDI-TOF y se evaluó la resistencia fenotípica a múltiples antibióticos siguiendo las guías del EUCAST. Estos aislados fueron secuenciados mediante tecnología Illumina y Nanopore, realizándose posteriormente análisis de ensamblado (Unicycler), contenido genético (ABRicate) y pangenoma (Roary), entre otros.

Se seleccionaron 19 aislados resistentes a carbapenemas/aminoglucósidos, pertenecientes a *Pseudomonas* spp. (7), *Aeromonas caviae* (5) y *Enterobacterales* spp. (4). Se identificaron aislados de *Pseudomonas* resistentes a carbapenemas en canalizaciones posteriores a todos los hospitales, los cuales portaban diferentes variantes de *bla*<sub>VIM</sub>, similar al escenario de 2017. Sin embargo, la presencia de *bla*<sub>VIM</sub> en diferentes especies contrasta con la situación anterior, donde *P. putida* era el portador predominante. Todos los demás aislados albergaban el gen de la carbapenemasa NDM-1, junto con el gen de metiltransferasa del ARNr 16S *armA*, *rmtB* o *rmtC*. El gen *bla*<sub>NDM-1</sub> también se detectó hace cuatro años, pero estaba presente principalmente en *Citrobacter* spp., mientras que no se identificaron aislados de *Aeromonas* spp. Además, también se encontró el plásmido IncC responsable de la diseminación de *bla*<sub>NDM-1</sub> en 2017, pero muchos aislados de 2021 carecían de este plásmido.

Las múltiples especies de *Pseudomonas* que portan variantes de *bla*<sub>VIM</sub> sugieren la movilización genética y diversificación de este mecanismo de resistencia. Asimismo, la presencia de *bla*<sub>NDM-1</sub> en nuevos hospedadores de entornos clínicos y ambientales revela que el ambiente de aguas residuales favorece el mantenimiento y la diseminación de genes específicos, actuando como reservorio y generador de bacterias resistentes a los antibióticos de último recurso en la región.



## Role of O-antigen length controlled by phase variation in antibiotic resistance

Fernández-Fernández Rocío<sup>1</sup>, Blanco Paula<sup>2</sup>, Sánchez-Romero María Antonia<sup>3</sup>, Escudero José Antonio<sup>2</sup> and Casadesús Josep<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

<sup>2</sup>Departamento de Sanidad Animal and VISAVET, Universidad Complutense de Madrid

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

[rocio-ff@us.es](mailto:rocio-ff@us.es)

The bacterial cell envelope is the first line of defense against external stresses, and its structure and composition can influence the outcome of bacteriophage infections, the susceptibility to chemicals and the battles against the immune system (Bertani & Ruiz, 2018). In *Salmonella*, the lipopolysaccharide (LPS) constitutes the major component of the outer membrane, and it is essential for many aspects of its lifestyle including resistance to serum (Kintz et al., 2017), bile (Crawford et al., 2012), and cationic peptides (Hölzer et al., 2009). The LPS is also a common receptor for bacteriophages (Lindberg, 1973). The LPS can be divided into three structural regions: the lipid A, the core saccharide, and the O-antigen. The O-antigen is located in the outermost surface of the LPS, and it is formed by sugar repeats. Previous work reported that subtle differences in sugar composition of O-antigen alter colistin susceptibility in *S. enterica* (Ricci et al., 2020). Based on the above antecedents, we considered the possibility that major changes in O-antigen, such as those due to programmed variation in chain length, might also alter susceptibility to antibiotics. This hypothesis was investigated in the *opvAB* operon of *Salmonella enterica*, which encodes modifiers of the O-antigen length. Expression of this operon undergoes phase variation and occurs only in 0.2% of the population under laboratory conditions. In our assays, three strains of *Salmonella* were used: a strain which produces only cells with normal O-antigen length ( $\Delta opvAB$ ), a strain with shorter O-antigen ( $OpvAB^{ON}$ ) and a wild type strain that produces subpopulations of both types of cells. To test growth in the presence of antibiotics in rapid and highly sensitive tests, Biolog microplate-based assays were carried out. Of 236 tested compounds, 19 did cause differences in growth, and 13 of them were antibiotics. Differences in growth observed in the presence of antibiotics were validated by independent tests. A tentative conclusion is that cells with shorter O-antigen are more resistant to certain antibiotics.

### References

- Bertani, B., & Ruiz, N. (2018). Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0001–2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>
- Crawford, R. W., Keestra, A. M., Winter, S. E., Xavier, M. N., Tsolis, R. M., Tolstikov, V., & Bäumlner, A. J. (2012). Very Long O-antigen Chains Enhance Fitness during Salmonella-induced Colitis by Increasing Bile Resistance. *PLoS Pathogens*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002918>
- Hölzer, S. U., Schlumberger, M. C., Jäckel, D., & Hensel, M. (2009). Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 77(12), 5458–5470. <https://doi.org/10.1128/IAI.00871-09>
- Kintz, E., Heiss, C., Black, I., Donohue, N., Brown, N., Davies, M. R., Azadi, P., Baker, S., Kaye, P. M., & Woude, M. van der. (2017). *Salmonella enterica* serovar Typhi lipopolysaccharide O-antigen modification impact on serum resistance and antibody recognition. *Infection and Immunity*, 85(4). <https://doi.org/10.1128/IAI.01021-16>
- Lindberg, A. A. (1973). Bacteriophage Receptors. *Annual Review of Microbiology*, 27(1), 205–241. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.001225>
- Ricci, V., Zhang, D., Teale, C., & Piddock, L. J. V. (2020). The O-antigen epitope governs susceptibility to colistin in *Salmonella enterica*. *mBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02831-19>



## Evaluation of lytic phages efficiency for the treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in pigs

Nahiara Garmendia<sup>1</sup>, Begoña García<sup>1</sup>, Carmen Gil<sup>1</sup>, Cristina Solano<sup>1</sup>, Rafael Sádaba<sup>2</sup>, Aritza Conte<sup>2</sup>, Virginia Alvarez<sup>2</sup>, Amaya Fernández<sup>2</sup>, Natalia López<sup>2</sup>, Cindy Fevre<sup>3</sup>, Guy-Charles F. De la Horie<sup>3</sup> e Iñigo Lasa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Patogénesis Microbiana. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain

<sup>2</sup>Unidad de Cardiología Traslacional. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain

<sup>3</sup>Pherecydes, 102 Avenue Gaston Roussel - 93230 Romainville. FRANCE

[nahiara.garmendia@unavarra.es](mailto:nahiara.garmendia@unavarra.es)

Infective endocarditis is an invasive human disease with an hospital mortality rate of 20%. *Staphylococcus aureus* is the most frequent etiologic agent of endocarditis in developed countries and is associated with an aggressive disease course, and complications such as local destruction of valve tissue, septic emboli, and persistent bacteremia. Antibiotic resistance is widespread among clinical *S. aureus* isolates, and bacteremia due to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) often requires the use of expensive or less effective antibiotics.

Lytic bacteriophages (phages) are viruses that selectively infect bacteria and replicate resulting in bacterial death. Lytic phages are increasingly being evaluated for therapeutic use in difficult-to-treat infections. The general idea is to use phages and antibiotic combinations to decrease/eliminate/delay the emergence of antibiotic and/or phage resistance or to re-sensitize resistant strains. Here, we evaluate the efficiency of a lytic phage cocktail provided by the Pherecydes company either alone or in combination with vancomycin to treat *S. aureus* in a pig model of experimental endocarditis. The cocktail provided proved to be efficient against a *S. aureus* strain isolated from a pig endocarditis in an in vitro assay. Groups of three pigs underwent surgery with placement of a catheter in the left side of the heart. At day three, the pigs were inoculated intravenously with *S. aureus*, 10<sup>7</sup> cfu/kg body weight. Clinical examination, echocardiography and bacterial blood cultures were used to diagnose and monitor the development of endocarditis. Pigs were treated with vancomycin (30 microgram/kg body weight), 10<sup>9</sup> pfu of the phage cocktail or a combination of both. After four days of treatment, animals were euthanized and heart valves were collected for bacteriological and histopathological analysis. The results of the efficiency of the different treatments will be discussed in the presentation.



## Caracterización de las dinámicas evolutivas de los cassettes de resistencia en integrones

Alberto Hipólito (alberhip@ucm.es)<sup>1,2</sup>; Filipa Trigo da Roza<sup>1,2</sup>; Lucía García-Pastor<sup>1,2</sup>; Paula Blanco<sup>1,2</sup>; Ester Vergara<sup>1,2</sup>; Thomas Jové<sup>3</sup>; Álvaro San Millán<sup>4</sup>; José Antonio Escudero<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> MBA Laboratory, Animal Health Department, Veterinary Sciences Faculty, UCM, Madrid.

<sup>2</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Madrid.

<sup>3</sup> CBRS, Faculté de Médecine, Limoges.

<sup>4</sup> Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid.

La resistencia a antibióticos se ha convertido en una de las mayores amenazas para la salud mundial. Los integrones son una de las principales causas de multirresistencias en bacterias Gram negativas. Estas plataformas genéticas capturan, almacenan y reordenan más de 130 *cassettes* que codifican genes de resistencia contra 12 familias de antibióticos<sup>1,2</sup>. Si bien la prevalencia de esta plataforma es notoria, el éxito evolutivo de cada *cassette* es variable así como su prevalencia en aislados clínicos.

El objetivo de este trabajo es cuantificar las fuerzas que rigen el éxito evolutivo de todos los *cassettes* de resistencia. Consideramos que estas fuerzas son: el perfil de resistencia, el coste biológico y el impacto en la expresión de la colección de *cassettes* posterior.

Hemos clonado cada *cassette* en un plásmido diseñado con el propósito de simular su entorno genético natural: la primera posición de un integrón de clase 1. La caracterización del perfil de resistencias frente a diversos antibióticos muestra especificidad por familias de genes pero con variaciones entre sus miembros; siendo este el primer estudio que permite conocer de manera comparativa los niveles de resistencia que aportan los diferentes *cassettes* al hospedador. Adicionalmente, el estudio del efecto de cada *cassette* en la expresión de la colección muestra una variación de más de 100x *cassette*-dependiente, reprimiendo o intensificando la expresión del resto de la colección de *cassettes*. Estos hechos podrían explicar fenómenos de co-selección durante el transcurso de tratamientos antibióticos. Asimismo, observamos grandes diferencias en coste biológico entre *cassettes*; siendo algunos incluso beneficiosos para la bacteria en ausencia de presión selectiva. Esto sugiere un posible rol metabólico secundario con valor adaptativo.

Nuestros datos aportan una visión general y comparable del valor adaptativo de los integrones en el entorno clínico y nativo, siendo de gran utilidad para diseñar estrategias que limiten la propagación de las multirresistencias.

1. Escudero JA, Loot C, Nivina A MD (2014) The integron: Adaption on demand. *Microbiol Spectr*: 25–32

2. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E & Iredell JR (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33: 757–784





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Caracterización de bacterias ambientales productoras de antibióticos

Beatriz Beriaín<sup>1</sup>, Asier Domínguez<sup>1</sup>, [Ainhoa Lucía<sup>1\\*</sup>](#)

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

\*[ainhoalq@unizar.es](mailto:ainhoalq@unizar.es)

MicroMundo es un proyecto científico, educativo y divulgativo, que se realiza en más de 30 Universidades españolas, y que tiene como objetivo concienciar a los estudiantes de ESO y Bachillerato del problema de las resistencias a los antibióticos despertando su interés por carreras científicas, y al mismo tiempo aislar microorganismos productores de sustancias antimicrobianas en muestras ambientales (Pernaute and Jimenez Cid, 2014). Durante las sesiones experimentales, los alumnos recogen una muestra de tierra, y de ella aíslan diferentes colonias bacterianas para ensayar por medio de un experimento de antibiosis si son capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos.

En la Universidad de Zaragoza, estamos generando un biobanco de cepas ambientales posibles productoras de antibióticos a nivel autonómico con las bacterias positivas encontradas en el marco del proyecto MicroMundo, que cuenta a día de hoy con más de 500 aislados.

Este biobanco puede ser una herramienta muy útil para el descubrimiento de nuevas sustancias antimicrobianas. producidas por microorganismos ambientales.

Se ha realizado un primer estudio con 159 bacterias de la colección, determinándose su espectro de acción frente a cepas bacterianas de especial relevancia a nivel clínico (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*), veterinario (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli* enteropatógenos, *Pasteurella multocida*) y de interés en la industria alimentaria (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*). Esto se ha llevado a cabo por medio de un ensayo de antibiosis mediante co-cultivo de las cepas ambientales y las cepas de interés. Los candidatos más prometedores han sido identificados por métodos de biología molecular basados en el ARNr 16S, entre los cuales se ha encontrado una alta proporción de especies del género *Pseudomonas* y del género *Bacillus*. Cabe destacar la cepa Z-VAL-14-04, con tan solo un 79% de homología con *Pseudomonas putida* o *taiwanensis*, podría tratarse de una nueva especie de este género.

Al mismo tiempo se han optimizado las condiciones de crecimiento y producción para estas cepas y se ha establecido un protocolo de cribado para futuros análisis sistematizados a mayor escala de los nuevos microorganismos que serán obtenidos en el marco de MicroMundo@UniZar en futuras ediciones.



## **Non-canonical mismatch repair protein NucS modulates the emergence of antibiotic resistance in *Mycobacterium abscessus***

Isabel Martín-Blecua<sup>a†</sup>, Rosilene Fressatti Cardoso<sup>b†</sup>, Vanessa Pietrowski Baldin<sup>b</sup>, Jean Eduardo Meneguello<sup>b</sup>, José Ramón Valverde<sup>c</sup>, Jesús Blázquez<sup>a\*</sup>, Alfredo Castañeda-García<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC, C/ Darwin, 3, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Computación Científica, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC, C/ Darwin, 3, 28049 Madrid, Spain

[imartin@cnb.csic.es](mailto:imartin@cnb.csic.es)

NucS/EndoMS-dependent non-canonical mismatch repair (MMR) ensures the stability of genomic DNA in mycobacteria and acts as a guardian of the genome by preventing the emergence of point mutations. A  $\Delta nucS$  strain was here constructed and explored in the multidrug resistant pathogen *Mycobacterium abscessus* to address whether the inactivation of non-canonical MMR could raise the acquisition of drug resistance by mutation. The deletion of *nucS* resulted in a mutator phenotype with increased acquisition of drug resistance to macrolides and aminoglycosides, the two main groups of antimycobacterial agents for *M. abscessus* treatment, and also to second-line drugs as fluoroquinolones. Inactivation of the non-canonical MMR in *M. abscessus* led to increases of 10 to 22-fold in the appearance of spontaneous mutants resistant to the macrolide clarithromycin and the aminoglycosides amikacin, gentamicin and apramycin, as compared with the wild-type strain. Furthermore, detectable fluoroquinolone (ciprofloxacin) resistance was generated by a *nucS* deficient strain but not by a wild-type *M. abscessus* strain. Acquired drug-resistance to macrolides and aminoglycosides was analyzed through sequencing of the 23S rRNA gene *rrl* and the 16S rRNA gene *rrs* from independent drug-resistant colonies of both strains. Lastly, a dataset of genomic assemblies of *M. abscessus* clinical strains was screened to detect *nucS* naturally occurring polymorphisms. To summarize, *M. abscessus* relies on the NucS-dependent non-canonical MMR to control the rise of drug-resistant isolates by mutation. To our knowledge, this is the first breakthrough that reveals NucS role in an emerging human pathogen, having potential implications for the treatment of *M. abscessus* infections.

This research was funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033, grant PID2020-112865RB-I00.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Análisis de endosimbiontes de insectos para el estudio de interacciones  
hospedador huésped y su uso en el control de enfermedades de transmisión por  
vectores**

Pol Nadal-Jiménez, Stefanos Siozios, Gregory D.D. Hurst

Departamento de evolución, ecología y comportamiento. Universidad de Liverpool, Liverpool. UK  
[polnadal@liverpool.ac.uk](mailto:polnadal@liverpool.ac.uk) / [polnadal@gmail.com](mailto:polnadal@gmail.com)

Las enfermedades de transmisión por vectores (como el dengue, la malaria, o la filariasis) son responsables de 800.000 muertes anuales en el mundo. Varias estrategias de prevención y cura de estas enfermedades han sido desarrolladas de forma exhaustiva desde la segunda mitad del siglo XX, pero aún queda mucho por hacer si queremos erradicar estas pandemias que azotan a grupos muy vulnerables (niños de poca edad) dentro de comunidades muy desfavorecidas (comunidades con poco acceso a tratamiento en países subdesarrollados). Una estrategia prometedora que se ha ido desarrollando con mayor intensidad en los últimos años consiste en usar un reducido número de bacterias que habita en más del 50% de los insectos y que son cruciales para el correcto desarrollo o supervivencia de estos. Estas bacterias, llamadas endosimbiontes, habitan en el interior de células o órganos de insectos donde ejercen varias funciones que van desde el aporte de compuestos esenciales (p.ej.: aminoácidos o vitaminas), la protección ante depredadores/parásitos o la tolerancia a un mayor rango de temperaturas. Algunos de estos endosimbiontes tienen también la capacidad de alterar la reproducción normal de sus hospedadores, y como tal son llamados parásitos reproductivos. En mi línea de investigación, pretendo usar métodos tradicionales y modernos de microbiología molecular para entender los mecanismos por los que estas bacterias desarrollan esta estrecha relación con sus hospedadores y los mecanismos responsables de alterar su reproducción. El principal problema con el que nos encontramos en este trabajo es que la gran mayoría de estas bacterias endosimbiontes tienen genomas muy reducidos y una relación muy intrínseca con su hospedador. Estas dos propiedades hacen que su cultivo en medios tradicionales (para poder manipular genes, estudiarlas y reintroducirlas en su hospedador) para analizar la función de sus distintos genes no sea posible. Para atacar este problema, he puesto a punto un modelo entre la bacteria endosimbionte *Arsenophonus nasoniae* y la avispa parasitoide *Nasonia vitripennis*. Con este trabajo pretendo elucidar nuevas dianas para el desarrollo de nuevos fármacos y desarrollar nuevas estrategias sostenibles que permitan disminuir, eliminar o sustituir poblaciones de insectos infectadas por parásitos/bacterias y/o virus de transmisión por vectores.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por una beca del programa de la Unión Europea Horizon 2020 a través de una beca Marie Skłodowska-Curie (Nº: 708232) a PNJ y un proyecto BBSRC (Nº: BB/R012415/1) a GDDH, JCDH y AD.



## Identification of a novel cacaoidin derivative obtained by the heterologous expression of the *cao* biosynthetic gene cluster

Fernando Román-Hurtado, [Marina Sánchez-Hidalgo](mailto:marina.sanchez@medinaandalucia.es), Jesús Martín, Francisco Javier Ortiz-López, Olga Genilloud

Fundación MEDINA, Granada  
[marina.sanchez@medinaandalucia.es](mailto:marina.sanchez@medinaandalucia.es)

The increasing emergence of antibiotic resistant pathogenic strains has renewed the interest to discover novel antibiotics, taking advantage of state-of-the-art analytic, metabolomic and genomic tools<sup>1</sup>. Historically, actinomycetes, especially the genus *Streptomyces*, have been one of the most prolific sources of novel antibiotics<sup>2</sup>.

The strain *Streptomyces cacaoi* CA-170360, from Fundación MEDINA microbial collection, produces cacaoidin, the first member of the new class V lanthipeptides RiPP family<sup>3</sup>, with bioactivity against Gram-positive pathogens, such as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Clostridioides difficile*. The molecule presents unprecedented structural features: an unusually high number of D-amino acids, an *N,N*-dimethyl lanthionine and an O-glycosylated tyrosine carrying a non-previously reported disaccharide formed by  $\alpha$ -L-rhamnose and  $\beta$ -L-6-deoxygulose<sup>3</sup>. The genome of this strain was sequenced and analyzed, and the biosynthetic gene cluster encoding cacaoidin was identified and successfully expressed in the heterologous host *S. albidoflavus* J1074<sup>4</sup>. In this work, we describe the identification of a new variant of cacaoidin in the fermentations of the heterologous host which harbors a different attached disaccharide. We also describe the generation of knockouts that allowed to assign the functions of several proteins of the cluster: Cao4 is involved in the *N,N*-dimethylation of the N-terminal Ala residue and the glycosyltransferases Cao8 and Cao16 work cooperatively to O-glycosylate the tyrosine residue.

### References

1. Miethke, et al (2021). *Nat. Rev. Chem.* 5, 726–749.
2. De Simeis et al (2021). *Antibiotics* 10, 483
3. Ortiz et al (2020). *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 12654-12658
4. Román-Hurtado et al., (2021). *Antibiotics (Basel)*. 10, 403.



## **Nuevo modelo murino para el estudio de la transmisión de *Klebsiella pneumoniae* nosocomial multirresistente**

Irene Sánchez Méndez<sup>1,2</sup>, Cristina Calvo Fernández<sup>1,2</sup>, Natalia Montero<sup>1,2</sup>, Javier Fernández-Favieres<sup>1,2</sup>, Marta Dolcet<sup>1,2</sup>, Bruno González Zorn<sup>1,2</sup>.

1: Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, 2: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

[iresan06@ucm.es](mailto:iresan06@ucm.es)

A pesar de la gran importancia de los modelos animales, existen pocos modelos para estudiar la transmisión por contacto directo de microorganismos patógenos. *K. pneumoniae* multirresistente, se caracteriza por generar brotes de alta morbilidad y mortalidad en hospitales. Estos brotes son difíciles de controlar, en gran parte debido a que *K. pneumoniae* es capaz de colonizar de forma silente las mucosas y el tracto gastrointestinal humano, lo que provoca que su transmisión pase desapercibida.

En este trabajo, se ha desarrollado un sistema de alojamiento para el estudio de la transmisión de *K. pneumoniae* nosocomial multirresistente, el cual consta de una cámara central hexagonal en la que se aloja el animal donador, y cinco cámaras periféricas para los receptores. Los animales se encuentran separados físicamente entre sí conectando únicamente por unos agujeros de 0,5cm de diámetro. Durante los periodos de transmisión, de 48h, el donador colonizado contacta con las cinco receptoras susceptibles. Definimos un contacto directo como el momento en el que el donador y la receptora introducen de forma simultánea sus hocicos en el agujero que conecta sus cámaras. Se utilizó una cámara en posición cenital para grabar el comportamiento de los animales y poder definir el número de contactos, el momento en el que se producen y su duración. Estas variables, junto con la colonización del animal donador son las que se utilizaron para definir los factores que influyen en la transmisión.

Los resultados obtenidos indican que tanto los contactos con el receptor como el grado de colonización del donador afectan a la transmisión de *K. pneumoniae*. Animales con una alta carga bacteriana no eran capaces de transmitir la bacteria si el número de contactos era bajo. De igual forma, animales con una baja carga bacteriana pero un alto número de contactos, no conseguían transmitir la bacteria. Esto nos indica que es necesaria una elevada carga y un alto número de contactos para que se produzca la transmisión. Es necesario continuar en esta línea de trabajo en la transmisión de *K. pneumoniae*. Sin embargo, el sistema de alojamiento diseñado ha conseguido una transmisión cuantitativa y controlada del patógeno.



## Los plásmidos IncR y la metiltransferasa del ARNr 16S *armA*: una asociación exitosa en el mantenimiento de la pan-resistencia a aminoglucósidos en un entorno hospitalario

Carlos Serna, Bosco R. Matamoros, Jose F. Delgado-Blas, F. Javier Fernández-Favieres, Cristina Calvo-Fernández, Natalia Montero, Bruno González-Zorn

Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España)

[carlsern@ucm.es](mailto:carlsern@ucm.es)

La transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos desempeña un papel crucial en el problema de la resistencia a los antimicrobianos, siendo el entorno hospitalario un importante reservorio de bacterias portadoras de plásmidos multirresistentes. Las metiltransferasas del ARNr 16S, enzimas capaces de conferir altos niveles de resistencia a aminoglucósidos, se suelen encontrar codificadas en plásmidos, poniendo en peligro el uso de esta clase de antibióticos en la práctica clínica. En este trabajo identificamos por primera vez plásmidos IncR portadores de la metiltransferasa *armA* en cepas clínicas de *Enterobacter xiangfangensis* aisladas de caballos en un único hospital.

Durante 2015 y 2019, se identificaron tres cepas del complejo *Enterobacter cloacae* altamente resistentes a aminoglucósidos aisladas en caballos en un hospital veterinario. Los aislados fueron secuenciados por tecnología Illumina y Nanopore para su caracterización genómica completa. Tras el ensamblado de los genomas mediante SPAdes y Unicycler, se llevó a cabo la tipificación multilocus de secuencias y la identificación de genes de resistencia y replicones plasmídicos *in silico* con las herramientas mlst y ABRicate. La identificación a nivel de especie y relación clonal entre los aislados se llevó a cabo mediante análisis filogenéticos. Los plásmidos portadores del gen *armA* fueron extraídos y anotados, y se compararon con MUMmer. Los análisis de genómica comparativa fueron visualizados con gggenomes y Proksee.

Los tres aislados correspondían a *E. xiangfangensis* ST171, un clon implicado en infecciones humanas y estaban estrechamente relacionados según los análisis filogenéticos. Los aislados portaban el gen *armA* en un plásmido IncR de aproximadamente 70kbp. Todos los plásmidos IncR presentaban una región de multirresistencia que contenía los genes *armA*, *bla<sub>DHA-1</sub>* y *qnrB4*, flanqueada por dos IS26 formando la estructura Tn1548-like. Curiosamente, estos plásmidos IncR mostraban gran similitud con plásmidos IncR identificados diez años antes en el mismo hospital en cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de animales de compañía, lo que sugería una posible transmisión y mantenimiento plasmídico dentro del hospital.

En conclusión, en este trabajo identificamos un plásmido IncR portador de *armA* que se transfiere horizontalmente entre diferentes especies bacterianas y es responsable del mantenimiento de *armA* en un entorno clínico durante una década.



## **Neutralization of ionic interactions by dextran-based single-chain nanoparticles improves tobramycin diffusion into a mature biofilm**

Núria Blanco-Cabra<sup>1,2,\*</sup>, Julie Movellan<sup>3</sup>, Marco Marradi<sup>3</sup>, Raquel Gracia<sup>3</sup>, Cristian Salvador<sup>3</sup>, Damien Dupin<sup>3</sup>, Iraidia Loinaz<sup>3</sup>, Eduard Torrents<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology, and Statistics, Biology Faculty, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>CIDETEC, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Parque Científico y Tecnológico de Gipuzkoa, Miramon Pasealekua, 196, Donostia-San Sebastián 20014, Spain.

The extracellular matrix protects biofilm cells by reducing diffusion of antimicrobials. Tobramycin is an antibiotic used extensively to treat *P. aeruginosa* biofilms, but it is sequestered in the biofilm periphery by the extracellular negative charge matrix and loses its efficacy significantly. Dispersal of the biofilm extracellular matrix with enzymes such as DNase I is another promising therapy that enhances antibiotic diffusion into the biofilm. Here, we combine the charge neutralization of tobramycin provided by dextran-based single-chain polymer nanoparticles (SCPNS) together with DNase I to break the biofilm matrix. Our study demonstrates that the SCPNS improve the activity of tobramycin and DNase I by neutralizing the ionic interactions that keep this antibiotic in the biofilm periphery. Moreover, the detailed effects and interactions of nanoformulations with extracellular matrix components were revealed through time-lapse imaging of the *P. aeruginosa* biofilms by laser scanning confocal microscopy with specific labeling of the different biofilm components.

This study was partially supported by grants to ET from the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, MINECO, and Agencia Estatal de Investigación (AEI), Spain, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, FEDER, European Union (RTI2018-098573-B-100), the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2017SGR-1079), the European Regional Development Fund (FEDER), Catalan Cystic Fibrosis association and Obra Social “La Caixa”. CIDETEC kindly acknowledges the Basque Government for funding this work (ELKARTEK/BMG19 ref. KK-2019/00015, ELKARTEK/BMG20 ref. KK-2020/00010). MM acknowledges MIUR-Italy (“Progetto Dipartimenti di Eccellenza 2018-2022”) funding allocated to the Department of Chemistry (“Ugo Schiff”).



## Resistencia a antibióticos de *Streptococcus suis* aislados en España

Cristina Uruén<sup>1</sup>, Carla García<sup>1</sup>, Marina Sanz<sup>1</sup>, Ana Fernandez<sup>2</sup>, José Luis Arnal<sup>2</sup>, Mateo del Pozo<sup>3</sup>, Luisa Amoribieta<sup>4</sup>, María Casas<sup>4</sup>, Lorenzo Fraile<sup>5</sup>, Clara Marín<sup>6</sup>, Jesús Arenas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Microbiología e Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España; <sup>2</sup>Laboratorio de diagnóstico EXOPOL, Zaragoza, España; <sup>3</sup>Laboratorio de diagnóstico Labopat, Segovia, España; <sup>4</sup>Laboratorio de diagnóstico Ovislab, Barcelona, España; <sup>5</sup>Agrotecnio-CERCA Center, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Lleida, Lleida, España; <sup>6</sup>Departamento de Producción y Sanidad Animal, CITA, Zaragoza, España.

[jarenasbusto@gmail.com](mailto:jarenasbusto@gmail.com)

*Streptococcus suis* es una bacteria Gram positiva que vive como comensal en el tracto respiratorio superior, intestino y genitales de cerdos. No obstante, puede volverse patógena y causar una variedad de síntomas como endocarditis, artritis, septicemia y meningitis. De hecho, es una causa principal de la alta mortalidad en lechones, generando grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. Su tratamiento se basa mayoritariamente en el uso de antibióticos. Estudios realizados en diferentes áreas geográficas han mostrado la emergencia de aislados multiresistentes.

El objetivo de este estudio es analizar el patrón de resistencia a antibióticos en cepas de *S. suis* aisladas en todas las comunidades de España en los últimos 6 años. Un total de 116 cepas fueron aisladas de cerdos enfermos de la enfermedad estreptocócica. Su genotipo fue analizado mediante *Multi Locus Sequence Type*, identificando hasta 49 STs diferentes, algunos de los cuales fueron agrupados en 6 grupos filogenéticos. Posteriormente, se analizó la concentración mínima inhibitoria frente a 16 antibióticos de diferentes familias, y se determinó su patrón de susceptibilidad antimicrobiana utilizando puntos de corte clínicos establecidos (EUCAST) para *S. suis*, o en su defecto, o se extrapolaron de otros microorganismos. La tasa de resistencia fue elevada para las Tetraciclinas (94%), Macrólidos (86%) y Lincosamidas (94%), media para Fluoroquinolonas (56%), y baja para Aminoglucósidos (21%), Anfenicoles (5%) y  $\beta$ -lactámicos (2%).

Se realizaron estudios de la presencia de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) en toda la colección. Se identificaron *tet(O)*, *tet(M)*, *tet(W)*, *tet(O/W/32/O)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(40)* (asociado a resistencia a Tetraciclinas), *ermB*, *mefA/E*, *msrD* (asociado a resistencia Macrólidos) y *linB*, *lsaE* y *vgaF* (asociado a resistencia a Lincosamidas). Estos GRAs han sido hallados en los aislados resistentes, correlacionando fenotipo y genotipo. Este estudio remarca la elevada tasa de resistencias a diversas familias de antibióticos de *Streptococcus suis* en España, y sugiere la búsqueda de alternativas a los antibióticos.

Este estudio fue financiado por el proyecto TRANSIT (Ref. LMP58\_21) de I+D+i de la Dirección General de Aragón.





## Identification of a novel peptide that determines plasmid host-species specificity

Emilia Wedel<sup>1</sup>, Mario Pulido-Vadillo<sup>1</sup>, Bosco R. Matamoros<sup>1</sup>, F. Javier Fernández-Favieres<sup>1</sup>, Natalia Montero<sup>1</sup>, Bruno González-Zorn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Department of Animal Health, Veterinary School and Health Surveillance Center, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the biggest threats to Public Health worldwide. Plasmids facilitate the vertical and horizontal spread of AMR genes between different bacteria. The host range and the adaptation of a plasmid to a new host determine the possibility of resistance spread. Here, we study the adaptation of a small multicopy plasmid, pB1000 found in different bacterial species from *Pasteurellaceae*, to a species from a different bacterial family, *Escherichia coli*.

The ColE1-like plasmid pB1000 that carries the beta-lactamase ROB-1, is perfectly stable in its original host *Haemophilus influenzae*, but it is rapidly lost from *E. coli* DH5 $\alpha$  populations. To identify the factors that prevent stability and the mechanisms that are necessary for plasmid adaptation, evolution assays were carried out over the course of 500 generations, under the selective pressure of ampicillin. The evolved plasmids were extracted and transformed to the unevolved *E. coli* DH5 $\alpha$  strain in which stability assays were performed. Furthermore, the plasmids were sequenced to detect possible modifications.

The evolved plasmids were 100% stable in *E. coli* DH5 $\alpha$  and *in silico* analyses of the DNA of the evolved plasmids showed two types of modifications that increase stability and either lead to a shift or an expansion of the host range. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the origin of replication were detected and insertion sequences (ISs) had jumped from the *E. coli* chromosome always to the same region of the plasmid. Taking a closer look at the region that was interrupted by ISs, an open reading frame (ORF) was identified. The disruption of this ORF leads to a decreased biological burden and increases stability in *E. coli*. Performing Western Blots we demonstrated the expression of a small peptide from this region, that leads to reduced cell growth and cell death, if expressed in *E. coli* cells. Its hydrophobic properties, a predicted transmembrane region and membrane permeability assays, lead us to conclude, that the peptide alters the stability of the bacterial membrane.

This study gives an insight into the mechanisms of adaptation of small plasmids to understand their success in spreading resistance.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **HsbA regula negativamente la formación de biofilm en *Pseudomonas putida***

Elisa Montero-Beltrán, Marta Pulido-Sánchez, Aroa López-Sánchez y Fernando Govantes

Centro Andaluz del Biología del Desarrollo. Universidad Pablo de Olavide  
[emonbel@alu.upo.es](mailto:emonbel@alu.upo.es)

La transición entre el estado de vida planctónico y la formación de biofilm es un proceso estrictamente regulado en diferentes bacterias. En *Pseudomonas aeruginosa*, el factor anti-anti-sigma HsbA se ha descrito como un elemento clave en este proceso, ya que controla la actividad del factor  $\sigma$  de flagelo FliA a través de la inhibición del factor anti- $\sigma$  FlgM y es capaz de estimular la formación del biofilm controlando la actividad de la diguanilato ciclasa HsbD. La actividad de HsbA está controlada mediante una cascada de fosforilación mediada por HsbR y HptB. En este trabajo se ha caracterizado el papel de HsbA, HsbR y HptB en la regulación de la síntesis del flagelo y en el ciclo de desarrollo del biofilm en *Pseudomonas putida*. La transcripción de *hsbARhptB* se activa en fase estacionaria y es dependiente de  $\sigma^S$  y de la respuesta estricta. El análisis de la expresión de promotores dependientes de FliA no ha mostrado evidencia de la implicación de HsbA en la síntesis del flagelo. Sin embargo, ensayos fenotípicos de producción de exopolisacáridos, de formación de biofilm en placas multipocillo y de formación de película han revelado que HsbA regula negativamente la formación de biofilm en fase estacionaria tardía, aunque este papel parece ser independiente de la función de HsbR y HptB. Nuestras observaciones indican diferencias sustanciales en la función del sistema HsbAR-HptB entre *P. putida* y *P. aeruginosa*.



## Riboregulation of metabolism in nitrogen-fixing symbiotic $\alpha$ -rhizobia

Natalia I. García-Tomsig<sup>1</sup>, Marta Robledo<sup>1</sup>, George C. diCenzo<sup>2</sup>, Alessio Mengoni<sup>3</sup>, Vicenta Millán<sup>1</sup>, Sabina K. Guedes-García<sup>1</sup> and José I. Jiménez-Zurdo<sup>1</sup>

1. Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain.
2. Department of Biology (Queen's University), Kingston, Ontario, Canada.
3. Department of Biology (University of Florence), Sesto Fiorentino, Italy

[natalia.garcia@eez.csic.es](mailto:natalia.garcia@eez.csic.es)

Nitrogen-fixing root nodule symbioses between rhizobia and legume plants provide more than half of the combined nitrogen incorporated annually into terrestrial ecosystems, rendering plant growth independent of environmentally unfriendly chemical fertilizers. Success of symbiosis primarily depends on the capacity of rhizobia to establish competitive populations in soil and rhizosphere. To date, genetic and metabolic reprogramming of rhizobia from free-living bacteria to nitrogen-fixing bacteroids onto nodules have been studied almost exclusively from the perspective of the transcriptional control orchestrated by proteins. However, post-transcriptional regulation of gene expression by small RNAs (sRNAs) is expected to play major roles in the establishment of these mutualistic symbioses<sup>1</sup>.

Here, we deciphered a posttranscriptional network regulated by the homologous *trans*-sRNAs AbcR1 and AbcR2, which rewires metabolism of the nitrogen-fixing  $\alpha$ -rhizobium *Sinorhizobium meliloti* during pre-infection stages of symbiosis with its legume host alfalfa<sup>2</sup>. MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing unveiled exceptionally large and overlapping AbcR1/2 mRNA interactomes, jointly representing ~6% of the *S. meliloti* protein-coding genes. Most mRNAs encode transport/metabolic proteins whose translation is silenced by modifiable base-pairing to two distinct anti-Shine Dalgarno motifs that function independently in both sRNAs. A metabolic model-aided analysis of the targetomes predicted changes in AbcR1/2 expression driven by shifts in carbon/nitrogen sources, which were confirmed experimentally.

AbcR1/2 interactomes are well represented in rhizosphere-related *S. meliloti* transcriptomic signatures. Remarkably, lack of AbcR1 specifically compromised the ability of *S. meliloti* to colonize the root rhizoplane. The AbcR1 regulon likely ranks utilization of available substrates to optimize metabolism, thus conferring *S. meliloti* an advantage for efficient rhizosphere/rhizoplane colonization. Because RNA regulation relies on modifiable base-pairing interactions, our findings open unexplored avenues for engineering the legumes rhizobiome within sustainable agricultural practices.

1. Robledo M, García-Tomsig NI, Jiménez-Zurdo JI (2020) Riboregulation in Nitrogen-Fixing Endosymbiotic Bacteria. *Microorganisms* 10;8(3):384.
2. García-Tomsig NI, Robledo M, diCenzo GC, Mengoni A, Millán V, Peregrina A, Uceta A, Jiménez-Zurdo JI (2022) Pervasive RNA Regulation of Metabolism Enhances the Root Colonization Ability of Nitrogen-Fixing Symbiotic  $\alpha$ -Rhizobia. *mBio* 15;13(1):e0357621.

This work was supported by grants BFU2017-82645-P and PID2020-114782GB-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by "ERDF A way of making Europe".



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **A protease-mediated mechanism regulates the cytochrome *c<sub>6</sub>*/ plastocyanin switch in cyanobacteria**

Raquel M García-Cañas, Joaquín Giner-Lamia, Encarnación Díaz-Santos, Luis G. Heredia-Martínez, José M. Ortega, Manuel Hervás, Mercedes Roncel, José A. Navarro, Francisco J. Florencio, Luis López-Maury

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC, Sevilla. *Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.*  
[llopez1@us.es](mailto:llopez1@us.es)

After the Great Oxidation Event (GOE) iron availability was greatly reduced and photosynthetic organisms evolved several alternative proteins. One of these proteins is plastocyanin, a type I blue-copper protein able to replace cytochrome *c<sub>6</sub>* as soluble electron carrier between cytochrome *b<sub>6</sub>f* and PSI. In most cyanobacteria, expression of these two alternative proteins is regulated by copper availability but the regulatory system remained unknown. Here we provide evidence that the regulatory system is composed by a Blal/CopY family transcription factor (called PetR) and a BlaR membrane protease (called PetP). PetR represses *petE* (plastocyanin) expression and activates *petJ* (cytochrome *c<sub>6</sub>*) while PetP controls PetR levels *in vivo*. Using whole cell extracts we prove that PetR degradation requires the presence of both PetP and copper. Transcriptomic analysis has revealed that PetRP system regulates only 4 genes (*petE*, *petJ*, *slr0601* and *slr0602*) highlighting its specificity. Furthermore, the presence of *petE* and *petRP* in early branching cyanobacteria indicate that acquisition of these genes could have been an early adaptation to reduced iron bioavailability after GOE. New data on how copper is detected and how the signal is transduced by the PetRP system will be presented. In addition, we will also present evidence of the function of this system in *Anabaena* sp. PCC 7120.

Funding: Grant PID2020-112645GB-I00 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033



## Regulación de la síntesis y remodelación del peptidoglucano durante la diferenciación de heterocistos en *Nostoc* sp. PCC 7120.

Sara B. Hernández, Alicia M. Muro-Pastor, Agustín Vioque

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF, CSIC-Universidad de Sevilla), Sevilla, España

[sara.hernandez@ibvf.csic.es](mailto:sara.hernandez@ibvf.csic.es)

En condiciones limitantes de nitrógeno combinado, muchas cianobacterias (microorganismos que realizan fotosíntesis oxigénica) son capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a pesar de que la enzima que lleva a cabo este proceso es altamente sensible a oxígeno. En el caso de la cianobacteria filamentosa *Nostoc* sp. PCC 7120, esto se consigue mediante la diferenciación de un pequeño porcentaje de células vegetativas a heterocistos, células especializadas en proporcionar un ambiente microaerobio adecuado para la fijación de  $N_2$ , que se distribuyen en intervalos semirregulares a lo largo de los filamentos (1).

La formación de heterocistos está dirigida por un programa específico de expresión génica que genera patrones transcripcionales exclusivos de las células que se están diferenciando y que supone cambios morfológicos y metabólicos (2). Aunque el cambio morfológico más dramático es la síntesis de dos nuevas capas en la envoltura celular para limitar la entrada de oxígeno, la remodelación de la pared bacteriana (mureína o peptidoglucano) también se ha descrito como un factor esencial en el proceso de formación de los heterocistos: la mutación de varios genes que codifican para proteínas implicadas en la síntesis o remodelación del peptidoglucano afectan a la formación o funcionalidad de los heterocistos (3). Recientemente nuestro grupo ha caracterizado un pequeño RNA regulador implicado en la remodelación del peptidoglucano durante la diferenciación de los heterocistos (4).

Sin embargo, y a pesar de la importancia del peptidoglucano en la determinación de la morfología bacteriana y en otros procesos de diferenciación celular en bacterias, poco se sabe de los mecanismos reguladores que dan lugar a la remodelación de esta estructura durante la formación de heterocistos. Por este motivo estamos estudiando de forma concreta a qué nivel se lleva a cabo la regulación de proteínas implicadas en la síntesis y remodelación del peptidoglucano durante la diferenciación de heterocistos, con un interés especial en la búsqueda de RNAs no codificantes (tanto pequeños RNAs como RNAs antisentido) que pudieran estar implicados en este proceso.

### Referencias:

1. K. Kumar, R. A. Mella-Herrera and J. W. Golden: Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4), a000315 (2010) doi:10.1101/cshperspect.a000315
2. A. M. Muro-Pastor and W. R. Hess: Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol*, 20(11), 548-57 (2012) doi:10.1016/j.tim.2012.07.005
3. K. Nicolaisen, A. Hahn and E. Schleiff: The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Basic Microbiol*, 49(1), 5-24 (2009) doi:10.1002/jobm.200800300
4. M. Brenes-Alvarez, A. Vioque and A. M. Muro-Pastor: The integrity of the cell wall and its remodeling during heterocyst differentiation are regulated by phylogenetically conserved small RNA Yfr1 in *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *mBio*, 11(1) (2020) doi:10.1128/mBio.02599-19

### Financiación:

Financiado por US-1379643 (Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía/FEDER), PID2019-105526GB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033, FEDER) y Unión Europea-NextGenerationEU (MZAMBRANO-2021-19867).



## El regulador metabólico CfrA adapta el flujo de carbono a la deficiencia de nitrógeno en cianobacterias

Laura Pérez-Rodríguez, Miguel Roldán, F. Javier Florencio, M. Isabel Muro-Pastor

*Instituto de Bioquímica Vegetal y fotosíntesis (IBVF), CSIC-Universidad de Sevilla, Av. Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, España.*

[imuro@ibvf.csic.es](mailto:imuro@ibvf.csic.es)

Las cianobacterias no fijadoras de nitrógeno, como *Synechocystis*, son capaces de sobrevivir en ausencia de este macronutriente durante largos periodos de tiempo en un estado de latencia (clorosis), siendo capaces de revertir a su estado vegetativo muy eficazmente cuando se recupera el nitrógeno en el medio. CfrA es una proteína muy conservada en cianobacterias, regulada positivamente por el regulador global del nitrógeno NtcA y que se acumula en las células en respuesta a la deficiencia de nitrógeno. Utilizando un promotor inducible, independiente de las condiciones nitrogenadas, hemos construido y analizado estirpes que acumulan distintas cantidades de CfrA en presencia de nitrógeno. Nuestros resultados indican que la cantidad de CfrA determina la cantidad de glucógeno que se acumula y afecta a la síntesis de proteínas y de pigmentos fotosintéticos demostrando su papel en la regulación del flujo de carbono para adaptarlo a la disponibilidad de nitrógeno. Se ha identificado la interacción de CfrA con la proteína PII, reguladora global del C/N, sin embargo, el fenotipo asociado a la sobreexpresión de CfrA también se observa en estirpes carentes de PII (1). Otras investigaciones han identificado la 3-fosfoglicerato mutasa (PGAM) como diana de CfrA (PirC), limitando el flujo de carbono hacia la glucólisis y el ciclo de Krebs y por tanto su combinación con nitrógeno para la síntesis proteica, favoreciendo en cambio su acumulación en glucógeno (2).

Teniendo en cuenta que CfrA controla la acumulación de glucógeno, se ha llevado a cabo un análisis metabólico comparativo de la sobreexpresión de CfrA en fondos genéticos capaces o no de sintetizar este polímero. Los resultados indican un claro bloqueo metabólico provocado por la acumulación de CfrA en estirpes incapaces de desviar el carbono hacia glucógeno. En estas estirpes se acumulan cantidades significativas de azúcares como glucosa 6P, fructosa 6P, fructosa 1,6BP, 6-fosfogluconato, sedoheptulosa 7P, ó 3-fosfoglicerato, igualmente aminoácidos cuya síntesis tiene como precursor el piruvato o el 3-fosfoglicerato; alanina, valina, serina o leucina.

### Referencias:

- (1) Muro-Pastor MI et al. (2020) *Plant Physiol.* 184:1792. doi: 10.1104/pp.20.00802. 2020.
- (2) Orthwein T et al. (2021) *PNAS* 118 (6) doi: 10.1073/pnas.2019988118.

### Agradecimientos:

PID2019-104513GB-I00/AEI/10.13039/501100011033. Junta de Andalucía (Grupo BIO-0284).



## **Topoisomerasa I y RNA polimerasa de *Streptococcus pneumoniae* interactúan durante el proceso de transcripción**

María José Ferrándiz, Pablo Hernández, Adela González de la Campa

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III  
[mjferrandiz@isciii.es](mailto:mjferrandiz@isciii.es)

La transcripción es un proceso celular que requiere el desenrollamiento de la doble hebra del DNA y necesita un adecuado nivel de superenrollamiento que se consigue gracias a la acción de las topoisomerasas que en *S. pneumoniae* (neumococo) son principalmente girasa (introduce superenrollamiento negativo) y topoisomerasa I (Topol, relaja el DNA). En neumococo, existe correlación entre cambios en el nivel de superenrollamiento y la transcripción del gen de Topol, no observándose esta correlación para los genes de la girasa, lo que sugiere que es Topol la que modula la respuesta homeostática a cambios en la topología del DNA (1). Comprobamos por surface plasmon resonance la interacción entre Topol y RNA polimerasa (RNAP). Para ver *in vivo* esta asociación en el genoma de neumococo hicimos estudios de inmunoprecipitación de cromatina seguidos de secuenciación masiva (ChIP-seq) utilizando anticuerpos para estas dos proteínas. Además, usamos inhibidores de Topol (seconeolitsina, SCN) y de RNAP (rifampicina, RIF). Las dos enzimas colocalizaron en una estrecha región cercana al codon ATG de genes altamente expresados y, además, la RNAP también se distribuyó a lo largo de las regiones codificantes. La inhibición de RNAP con RIF evitó la unión de Topol a los promotores y de igual manera la inhibición de Topol con SCN previno la unión de RNAP a estas regiones. Esto confirmó la interacción funcional de las dos proteínas. Identificamos un motivo de unión correspondiente a un promotor -10 extendido, común a las dos proteínas. La RNAP se reclutó principalmente en aquellos genes orientados codireccionalmente con la replicación. Por su parte, Topol se localizó preferentemente en genes orientados en dirección opuesta a la replicación y en la región intergénica de pares de genes divergentes, más próxima al promotor del gen opuesto a la dirección de la replicación. El mayor reclutamiento de Topol en esta zona relajaría el superenrollamiento negativo generado por la RNAP transcribiendo de forma divergente. Todo esto sugiere un papel en la formación y estabilidad del complejo RNAP-DNA en el promotor y durante la elongación de la transcripción.

(1) Ferrándiz, M.J. *et al.* 2016. *Nucleic Acids Res.* 44: 7292. doi: 10.1093/nar/gkw602.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**The Hfq protein activates the expression of the transposase gene of the *P. putida* KT2440 ISPpu9 insertion sequence**

Elena Parés, Luis Yuste, Fernando Rojo and Renata Moreno

Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid

[epares@cnb.csic.es](mailto:epares@cnb.csic.es); [lyuste@cnb.csic.es](mailto:lyuste@cnb.csic.es); [frojo@cnb.csic.es](mailto:frojo@cnb.csic.es); [rmoreno@cnb.csic.es](mailto:rmoreno@cnb.csic.es)

Insertion sequences (ISs) are small, mobile genetic elements that only include a gene coding for a transposase and a regulatory element to control transposition frequency. ISs have an important role in the evolution of bacterial genomes, since they can generate mutations, deletions or inversions of large DNA regions. Expression of the transposase is usually low, and can be controlled by regulatory proteins or small RNAs (sRNAs). *Pseudomonas putida* KT2440, a model bacterium with many biotechnological applications, contains 36 IS elements. One of these, named ISPpu9, is present as seven copies scattered throughout the chromosome. All seven are inserted at a specific site located within short conserved sequences of the repetitive extragenic palindromic (REP) family. ISPpu9 contains a single ORF that codes for a transposase, *tnp*, belonging to the IS110/IS492 family. The expression of *tnp* is regulated by two sRNAs named Asr9 and Ssr9, which are encoded upstream and downstream of *tnp*, respectively. The *tnp* mRNA has a long 5'-untranslated region (5'-UTR) that can fold into a secondary structure that likely includes the ribosome binding site (RBS), inhibiting translation. The antisense Asr9 sRNA can pair to this region, modifying the inhibitory secondary structure and improving *tnp* translation. Ssr9 can pair to Asr9, likely counteracting its activating function (Gomez-García et al., 2021, *Nucleic Acids Res.* 49: 9219).

In addition, we will present evidence supporting that the Hfq protein of the host, which is an RNA binding protein involved in post-transcriptional regulation, strongly affects *tnp* expression. The *tnp* mRNA 5'-UTR has two regions that are likely binding sites for Hfq. Modification of the putative Hfq binding sites in a *tnp*'-'*lacZ* translational reporter fusion strongly reduced the expression of the reporter fusion when introduced in the wild type strain. This suggests that Hfq could stimulate *tnp* expression. To verify this idea, the wild type *tnp*'-'*lacZ* reporter fusion has been introduced into the Hfq-null strain KT2440 $\Delta$ hfq; the results obtained will be presented. Hfq binding to the 5'-UTR might either (a) stabilize *tnp* mRNA, (b) modify the secondary structure that inhibits translation, or (c) facilitate hybridization of the Asr9 sRNA, which improves *tnp* mRNA translation.





## **Análisis de posibles reguladores transcripcionales de la diferenciación de heterocistos**

Isidro Álvarez-Escribano, Manuel Brenes-Álvarez, Ana Sousa-Ortega, Agustín Vioque y Alicia M. Muro-Pastor

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF, CSIC-Universidad de Sevilla), Sevilla, España

[isidro.alvarez@ibvf.csic.es](mailto:isidro.alvarez@ibvf.csic.es)

Los heterocistos son células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico que se diferencian a intervalos semi-regulares en los filamentos de algunas cianobacterias. La diferenciación de heterocistos se enmarca en las respuestas a la limitación de nitrógeno combinado en el medio e implica una profunda transformación morfológica y metabólica de las células que se diferencian. En nuestro laboratorio hemos analizado a nivel transcriptómico la respuesta de una cianobacteria modelo, *Nostoc* sp. PCC 7120, a la limitación de nitrógeno a lo largo de 24 horas, el marco temporal en el que se lleva a cabo la diferenciación de heterocistos funcionales, y hemos construido una red de co-expresión que nos permite identificar nuevos elementos potencialmente implicados en la adaptación a la limitación de nitrógeno y la diferenciación de heterocistos [1].

Hemos seleccionado para su análisis dos proteínas pequeñas cuya expresión está regulada por la disponibilidad de nitrógeno y que, en base a las homologías identificadas en bases de datos, podrían actuar como reguladores transcripcionales. Al objeto de modificar la cantidad de dichas proteínas en las células de *Nostoc* hemos preparado vectores conjugativos a partir de los que se sobreexpresarían los mRNAs de interés utilizando dos promotores constitutivos, *trc* (*E. coli*) o *rnpB* (*Nostoc*). Por otro lado, utilizando los mismos vectores sobreexpresaremos la hebra antisentido de cada uno de estos mRNAs al objeto de reducir/eliminar la acumulación de los mismos y, por lo tanto, de las proteínas que codifican. Se trata de una estrategia que hemos usado previamente en *Nostoc* para eliminar pequeños RNAs y poder analizar los efectos de esta alteración sin necesidad de mutar la región cromosómica correspondiente [2]. El vector conjugativo que hemos diseñado contiene además una fusión del gen *gfp* al promotor del gen *hetR*, que se expresa específicamente en las células que inician su diferenciación como heterocistos. La expresión de esta fusión permite detectar alteraciones en el proceso de diferenciación tanto en términos temporales como en términos de frecuencia de heterocistos en los filamentos. Describiremos los resultados obtenidos mediante la aplicación de esta estrategia de sobreexpresión y depleción de las proteínas codificadas por los genes *asl1305* y *all1873*.

[1] Brenes-Álvarez, M., Mitschke, J., Olmedo-Verd, E., Georg, J., Hess, W. R., Vioque, A. and Muro-Pastor, A. M. (2019) Elements of the heterocyst-specific transcriptome unravelled by co-expression analysis in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Environmental Microbiology* 21: 2544-2558. doi: [10.1111/1462-2920.14647](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14647)

[2] Brenes-Álvarez, M., Vioque, A. and Muro-Pastor A. M. (2020) The integrity of the cell wall and its remodeling during heterocyst differentiation is regulated by phylogenetically conserved sRNA Yfr1 in *Nostoc* sp. PCC 7120. *mBio* 11: e02599-19. doi: [10.1128/mBio.02599-19](https://doi.org/10.1128/mBio.02599-19)

**Financiado por** PY20-00004 y US-1379643 (Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía/FEDER), y PID2019-105526GB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**WhpR, un regulador transcriptional de la virulencia en el patógeno de huéspedes leñosos *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi***

<sup>1,2</sup>[Antonio Arroyo-Mateo](#), <sup>1,2</sup>Jesús Leal-López, <sup>1,2</sup>Eloy Caballo-Ponce, <sup>1,2</sup>Cayo Ramos

<sup>1</sup>Área de Genética, Facultad de Ciencias, Campus Teatinos s/n, Universidad de Málaga, E-29010 Málaga

<sup>2</sup>Microbiología y Protección de Cultivos, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Extensión Campus de Teatinos, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), 29010 Málaga

[antonioam@uma.es](mailto:antonioam@uma.es)

El genoma del patógeno del olivo *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) NCPPB 3335 codifica una región de aproximadamente 15 kb denominada WHOP (del inglés, *Woody Host and Pseudomonas*), involucrada en el catabolismo de compuestos aromáticos y esencial para la virulencia de Psv en plantas de olivo [1]. Esta región también se encuentra en otros patovares de *P. savastanoi* y *Pseudomonas syringae* que infectan huéspedes leñosos, pero está ausente en las cepas que infectan plantas herbáceas. La región WHOP está organizada en cuatro operones, *antABC* (catabolismo del antranilato), *catBCA* (catabolismo del catecol), *ipoBCA* (actividad oxigenasa) y *dhoAB* (actividad desconocida), y tres genes transcritos independientemente, *antR* (regulador positivo del operón *antABC*), *PSA3335\_3206* (anotado como un receptor de aerotaxis) y *whpR* (regulador transcripcional perteneciente a la familia AraC) [2]. En este estudio, hemos identificado dos dominios en WhpR, uno DBD (del inglés, *DNA-Binding Domain*), caracterizado por un motivo HTH (del inglés, *Helix-Turn-Helix*) y otro AraC de unión a ligando. Análisis *BlastP* no identificaron homólogos ( $\geq 60\%$ ) de esta proteína fuera del complejo *P. syringae*. Para analizar el papel de WhpR en virulencia, hemos construido mutantes  $\Delta whpR$  en varias cepas de *P. savastanoi* aisladas de olivo y adelfa (*P. savastanoi* pv. *nerii*). Además, análisis de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) realizados en Psv NCPPB 3335 y su mutante  $\Delta whpR$  han revelado que WhpR es un regulador negativo de la mayoría de los operones codificados en la región WHOP. Nuestros objetivos futuros son dilucidar el mecanismo de regulación dependiente de WhpR y determinar si otros genes codificados fuera de la región WHOP también se regulan por esta proteína.

[1] Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010. Environ. Microbiol., 12, 1604-1620.

[2] Caballo-Ponce *et al.*, 2017. Mol. Plant-Microbe Interact., 30, 113-126.

**Financiado por** el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, proyecto PID2020-115177RB-C21 / AEI/10.13039/501100011033, co-financiado por FEDER



## Structural and Functional analysis of *Salmonella* Typhimurium T6SS

Joaquín Bernal<sup>1</sup>, Cristina Civantos<sup>2</sup>, Patricia Bernal<sup>2</sup>, Francisco Ramos Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

[jbayard@us.es](mailto:jbayard@us.es)

The type 6 secretion system (T6SS) is a bacterial nanomachine used to inject effectors (toxins) into eukaryotic hosts and/or other bacteria, being considered a potent antimicrobial weapon. The T6SS is a multiprotein machine assembled at the cell envelope that includes a membrane complex (TssJLM), a baseplate (TssKEFG) and a tail. The tail contains an inner tube (Hcp) that ends in a spike made of VgrG and PAAR proteins and it is surrounded by a contractile sheath (TssBC). Contraction of the sheath allows for the secretion of the effectors coupled to Hcp, VgrG and PAAR proteins. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contains a T6SS cluster which is located within the SPI-6<sup>1</sup> and that harbors the 13 core genes necessary to encode a functional T6SS and some novel accessory components of unknown function exclusively identified in this strain such as TagK. Here, we have used the BACTH system to identify the interaction network among the core and the novel accessory T6SS components to characterise their functions.

Unlike T6SS structural components that are well conserved, the regulation of these systems is complex and greatly variable among bacteria. T6SSs are tuned regulated by an assortment of regulatory systems, which enables bacteria to adapt to varied environments<sup>2,3</sup>. *Salmonella* T6SS is not active in laboratory conditions and the regulatory signals leading to an activation of the system remains unclear. In this work, we have fused the promoter of several essential genes of the T6SS cluster to the *luxCDABE* operon of *Photobacterium luminescens*. We are currently using this bioluminescent reporter to investigate the environmental as well as the genetic signals that drive the expression of *S. Typhimurium* T6SS.

1. Folkesson, A., Löfdahl, S. & Normark, S. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res. Microbiol.* **153**, 537–545 (2002).
2. Brunet, Y. R. *et al.* H-NS silencing of the *Salmonella* pathogenicity island 6-encoded type VI secretion system limits salmonella enterica serovar typhimurium interbacterial killing. *Infect. Immun.* **83**, 2738–2750 (2015).
3. Shaohui Wang, A., Denghui Yang, a Xiaojun Wu, a Zhengfei Yi, a Yang Wang, B., Suhua Xin, a Dong Wang, a Mingxing Tian, a Tao Li, a Jingjing Qi, a Chan Ding, A. & Yua, S. The Ferric Uptake Regulator Represses Type VI Secretion System Function by Binding Directly to the clpV Promoter in T6SS. 1–17 (2019).

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación/10.13039/501100011033, grant number PID2019-106132RB-I00 and The European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement N° 842629. 2020 Talent Attraction grant of the Universidad de Sevilla to PB.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Co-option of alanine racemase during spore formation in *Bacillus subtilis***

Alejandro David Bonive Boscan and Javier López Garrido

Max Planck Institute for Evolutionary Biology, Plön, Germany  
[bonive@evolbio.mpg.de](mailto:bonive@evolbio.mpg.de) [lopezgarrido@evolbio.mpg.de](mailto:lopezgarrido@evolbio.mpg.de)

*Bacillus subtilis* displays alternative life cycles depending on the environmental conditions: in the presence of nutrients, it grows vegetatively and produces progeny through binary fission. However, when nutrients are scarce, it embarks on a developmental process, called sporulation, which culminates with the formation of extremely resilient spores that are protected by a multilayered envelope. Sporulation involves the participation of two cells of different sizes that originate through an asymmetric cell division event: the smaller forespore, which becomes the spore after maturation, and the larger mother cell, which lyses once the spore is matured. When nutrients become available, spores germinate and resume vegetative growth. Germination is triggered by specific nutrient molecules, such as L-alanine, which are recognized by receptors at the innermost layer of the spore envelope. In this study, we have used fluorescence microscopy to visualize the localization of GFP-tagged essential proteins during vegetative growth and sporulation. One protein, alanine racemase (Alr), shows a dramatically different localization between the two conditions: it is distributed uniformly in the cytoplasm of vegetative cells, but it is found in the outer layers of the spore during sporulation, becoming an integral part of the spore envelope. By selectively degrading Alr in the mother cell or in the forespore, we have found that only Alr from the mother cell is relocated during sporulation, suggesting that Alr is recruited to the outer layers of the spore envelope. Alr catalyzes the interconversion of the two alanine enantiomers, L-alanine and D-alanine. D-alanine is an essential constituent of the cell wall and is also a potent competitive inhibitor of germination induced by L-Alanine. Alr might therefore play an additional role during sporulation by producing D-alanine as an inhibitor of germination. Thus it is likely that the recruitment of Alr to the spore envelope modulates spore germination under specific conditions. The relocalization of Alr to the spore envelope may therefore represent a case of co-option of an essential enzyme during spore formation.



## **An acyl-homoserine-lactone acylase in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical model strain K279a with both quorum quenching and Beta-lactamase activity**

Marc Bravo<sup>1,\*</sup>, Xavier Coves<sup>1</sup>, Òscar Conchillo-Solé<sup>1</sup>, Celeste Gómez<sup>1</sup>, Xavier Daura<sup>1,2</sup>, Daniel Yero<sup>1</sup> and Isidre Gibert<sup>1,\*</sup>

1 Grup de Patogènesi Bacteriana i Antimicrobians (PatoBAnt). Institut de Biotecnologia i Biomedicina i Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona. Edifici Mòdul B, Parc de Recerca UAB, Barcelona, Spain.

2 Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

\* [Marc.Bravo@uab.cat](mailto:Marc.Bravo@uab.cat), [Isidre.Gibert@uab.cat](mailto:Isidre.Gibert@uab.cat)

*Stenotrophomonas maltophilia* is an environmental multi-drug resistant Gram-negative organism and it is increasingly associated with nosocomial infections in humans [1]. These bacteria coexist with other relevant nosocomial pathogens in hospital environments or with other microorganisms in nature. Therefore cell-cell communication is important for these bacteria. *S. maltophilia* uses the endogenous DSF quorum sensing system to regulate virulence processes but can also respond to exogenous acyl-homoserine-lactone acylases (AHLs) signals produced by neighboring bacteria [2,3]. QS enables bacterial populations to synchronize gene expression to coordinate virulence factors production. Inactivation of QS signals is a phenomenon known as quorum quenching (QQ). *S. maltophilia* isolates have shown QQ activity against AHLs, and the genetic determinants of this activity has been proposed in environmental isolates [4]. AHL acylases are enzymes responsible for disrupting the quorum sensing communication between bacteria by hydrolysis of AHL signaling molecules. In this work, an enzyme capable of degrading AHLs in the clinical model strain *S. maltophilia* K279a has been identified by homology to AHL acylases previously described in other organisms. Heterologous expression in *Escherichia coli* of this enzyme has demonstrated its AHLs degrading activity *in vivo*, while a mutant strain of *S. maltophilia* K279a deficient for this enzyme showed a loss of this activity. During the production of the protein in *E. coli*, the enzyme was shown to consist of two subunits as described in other known acylases. Until now, the production of AHLs by *S. maltophilia* has been questioned due to the lack of homologues of known AHL synthase family genes, but the fact that detectable levels of AHLs have been identified in supernatants of *S. maltophilia* deficient for this AHL acylase could indicate the existence of a new family of synthases. In addition to having identified a quorum quenching mechanism in these bacteria, the protein heterologously expressed in *E. coli* has been found to be capable of degrading  $\beta$ -lactams, indicating that it is a bifunctional enzyme that could confer antibiotic resistance in *S. maltophilia*.

### **References:**

- [1] Brooke JS. **2021**. Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev; 34(3):e0003019.
- [2] Martínez P, Huedo P, Martinez-Servat S, Planell R, Ferrer-Navarro M, Daura X, Yero D, Gibert I. **2015**. *Stenotrophomonas maltophilia* responds to exogenous AHL signals through the LuxR solo SmoR (Smlt1839). Front Cell Infect Microbiol. 15;5:41.
- [3] Huedo P, Coves X, Daura X, Gibert I, Yero D. **2018**. Quorum Sensing Signaling and Quenching in the Multidrug-Resistant Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Front Cell Infect Microbiol. 8:122.
- [4] Reina JC, Torres M, Llamas I. **2019**. *Stenotrophomonas maltophilia* AHL-Degrading Strains Isolated from Marine Invertebrate Microbiota Attenuate the Virulence of *Pectobacterium carotovorum* and *Vibrio coralliilyticus*. Mar Biotechnol (NY). 21(2):276-290.

### **Acknowledgements:**

This work has been supported by Spanish MICINN (PID2019-111364RB-I00) and we also thank Catalan AGAUR (2017 SGR 1062).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### **Characterization of the transcriptional repressor TetR of *Myxococcus xanthus* required for *Sinorhizobium meliloti* predation**

Cabello-Alemán, L., Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Contreras-Moreno, F.J.

Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada  
[lcabello@ugr.es](mailto:lcabello@ugr.es)

*Myxococcus xanthus* is a soil predatory bacterium with a complex social behavior. It actively kills bacteria and other microorganisms to consume their biomass by using mechanisms of diverse nature. Although there are many research groups working on predation of *M. xanthus*, there is still a lack of knowledge about it. Our research group has focused on elucidating the molecular predation mechanisms of *M. xanthus* on *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium of great agricultural interest due to the symbiosis it forms with leguminous plants. A transcriptomic analysis during predation of *M. xanthus* on *S. meliloti* has identified a number of transcriptional regulators that increase their expression in an early stage of predation. We have focused on the characterization of one of them, the TetR transcriptional regulator. A variety of techniques including predation assays with deletion mutants, gene expression analyses by transcriptomic experiments and *lacZ* fusions, microscopy and bioinformatic analyses, among others, have been used. The results obtained reveal that the TetR regulator acts as repressor of at least one operon and that it has to be inactivated by a small molecule produced by *S. meliloti* to allow the expression of the genes regulated by it. This molecule is poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), an intracellular lipid granule used by the bacterium for energy and carbon storage. In addition, we have demonstrated that these genes regulated by the TetR repressor respond and use the PHB molecule produced by *S. meliloti*. The work on how these genes use and degrade this PHB molecule and how it inactivates the TetR regulator is still under research.

This work is funded by the Spanish Government (grant PID2020-112634GB-I00) and FEDER (grant A-BIO-126-UGR20) and Plan de Empleo de Garantía Juvenil).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Characterization of the *yebEFG* gene cluster (aka *yebGFE* operon) in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Ángela Mérida-Floriano and Josep Casadesús

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla  
[casadesus@us.es](mailto:casadesus@us.es)

*yebEFG* is a poorly characterized gene cluster found in the chromosome of *E. coli*, *Salmonella enterica* and other enterobacterial species. Analysis of transcripts by reverse transcription and PCR amplification indicates that the *yebEFG* cluster of *S. enterica* serovar Typhimurium is a polycistronic transcriptional unit driven by a promoter located upstream of *yebG*. Because transcription proceeds downstream through *yebF* and *yebE*, the cluster may be renamed *yebGFE* operon. In addition, transcription of *yebF* and *yebE* is driven by individual, internal promoters. In *E. coli*, the *yebG* gene has been long known to be part of the SOS regulon while information on *yebF* and *yebE* is scarce in the literature. In this communication, we show that transcription from the main *yebGFE* promoter of *Salmonella enterica* is under SOS control like its *E. coli* homolog while transcription of *yebF* and *yebE* from internal promoters is SOS-independent. A regulatory region containing a LexA box is found upstream of the main *yebGFE* promoter, thus explaining SOS dependence. Transcriptomic analysis in a  $\Delta yebGFE$  mutant suggests the involvement of *yebGFE*-encoded products in control of motility, and a combination of genetics and flow cytometry analysis indicates that YebG controls transcription of the *fliC* gene, which encodes flagellin, the major structural component of the flagellar filament. This finding unveils an unsuspected connection between the SOS response and the synthesis of flagella.

### Funding:

BIO2016-75235-P, FEDER US-1254118, PID2020-116995RB-I00



## The carbon regulator PhaR exerts a pleiotropic control in *Bradyrhizobium diazoefficiens*

Rocío Díaz-Peña<sup>1</sup>, Juan. J. Cabrera<sup>2</sup>, Germán Tortosa<sup>2</sup>, María J. Delgado<sup>2</sup>, Elías Mongiardini<sup>3</sup>, Marcelo Müller-Santos<sup>4</sup>, Julia Pettinari<sup>1</sup>, Socorro Mesa<sup>2</sup>, Juan I. Quelas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>IQUIBICEN-UBA, CABA, Argentina

<sup>2</sup>Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain

<sup>3</sup>IBBM-UNLP-CONICET, La Plata, Argentina

<sup>4</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

[rociodiazpena@gmail.com](mailto:rociodiazpena@gmail.com)

*Bradyrhizobium diazoefficiens*, the symbiotic partner of soybean, can live inside root nodules and in free-living state. In both states, when O<sub>2</sub> levels decrease, cells adjust their protein pools by gene transcription modulation. PhaR encodes a transcription factor annotated as PHA (polyhydroxyalkanoate) accumulation regulator. Previous qRT-PCR results of selected genes suggested that PhaR, under microoxic conditions (0.5% O<sub>2</sub>), not only controls the PHA cycle but also acts as a global regulator of excess carbon allocation by repressing *fixK<sub>2</sub>*, encoding a key transcription factor for microoxic and symbiotic metabolism in *B. diazoefficiens*. In this work, we expanded our knowledge about PhaR function by a multi-pronged approach that includes: (i) Analysis of the effects of *phaR* mutation on gene transcription and protein abundance under microoxic conditions; (ii) identification of direct targets for PhaR; (iii) a metabolic profile of a *phaR* mutant cultivated with different carbon sources under anoxic conditions.

A comparative transcriptome and proteome analysis of *phaR* mutant cells revealed 1,206 genes and 285 proteins regulated by PhaR. The most affected metabolic pathways were nitrogen fixation, hydrogen uptake, CO<sub>2</sub> fixation, PHA and pyruvate metabolism, Krebs cycle, and amino acid and fatty acid metabolism.

We also observed a strong consistency between transcriptomic and proteomic approaches, with an overlap of 38.5 % of genes/proteins. This set, excluding recognized targets for FixK<sub>2</sub>, was employed as a basis to identify direct targets for PhaR by performing electrophoretic mobility shift DNA assays. Among the 16 selected candidates (5 activated and 11 repressed by PhaR), purified recombinant PhaR protein interacted effectively with the promoter region of 12 of them, mostly belonging to central carbon metabolism.

Finally, the metabolic profile of a *phaR* mutant differed depending on the growth media. In minimal medium supplemented with pyruvate, the *phaR* mutant produced more citrate, succinate and formate than the wild type, but less lactate and acetate. However, in rich medium, the *phaR* mutant produced much lower amounts of all acids than those detected in the wild type.

Altogether, these findings confirm our hypothesis that PhaR is a regulator with global and pleiotropic effects on carbon flux which is currently under further investigation.

This work was supported by Programme of Scientific Cooperation for Development i-COOP, CSIC, Spain (COOPB20505), Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (PID2020-114330GB-100), and Junta de Andalucía, Spain (P18-RT-1401).





## The *VgrG5a* cluster associated to the type VI secretion systems in *Pseudomonas fluorescens* F113 mediate bacterial killing

David Durán<sup>1</sup>, David Vázquez<sup>1</sup>, Patricia Bernal<sup>2</sup>, Miguel Redondo-Nieto, Rafael Rivilla<sup>1</sup> and Marta Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin, 2, 28049 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla. Spain.

[david.duran@uam.es](mailto:david.duran@uam.es)

The Type six secretion system (T6SS) has been originally described in *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginosa*, as a protein nanomachine system that translocates specific proteins directly into target cells. T6SSs are present in more than 25% of gram-negative bacteria, mostly confined to the phylum Proteobacteria and many of them encoding more than one T6SS in their genome. It has been described that its relevance resides mainly within its anti-prokaryotic activity. The T6SS in *Pseudomonas* has been involved in biofilm formation and anti-bacterial toxins production<sup>1,2</sup>. The model organism of this study, *Pseudomonas fluorescens* F113 was isolated from the sugar-beet rhizosphere and contains three T6SS in its genomic sequence<sup>3</sup>. Generally, the core genes of the T6SSs are located in genomic clusters, which encode the structural proteins and can include accessory proteins involved in regulation of the T6SSs. Moreover, genes encoding T6SS effectors and their cognate Effector-immunity (EI) pairs proteins are commonly linked to *hcp* and/or *vgrG* genes within T6SS clusters. Genes encoding orphan VgrG proteins, not genetically linked to any T6SS structural cluster have also been described for a long number of T6SS-harboring bacteria<sup>4,5,6</sup>. We have identified an orphan *vgrG* islands in F113 (*vgrG5a*) associated with genes encoding putative T6SS-related proteins: a possible regulatory Tap protein, followed by an effector, Tfe8 and an immunity protein, Tfi8. The genetic organization of the region suggests that *tfe8* and *tfi8* may be co-transcribed. In order to test the possible antibacterial activity of this region, two insertional mutants were constructed, one affecting *vgrG5a* and another affecting the *tfe8* gene. A bacterial competition assay revealed that both mutants were affected in their capacity of killing *E. coli*. To test whether Tfe8/Tfi8 constitute an effector-immunity pair, the genes encoding Tfe8 and Tfi8 were cloned in the pT7-7 vector, as a result, the *E. coli* strain expressing *tfe8* and not *tfi8* was affected in growth. These results indicate that Tfe8 is a bacterial killing effector, while Tfi8 is its cognate immunity protein. Tfe8 may represent a novel type of T6SS effector with homology to protein family involved in drug extrusion.

<sup>1</sup> Gallique, M., et al. *PloS one* (2017).

<sup>2</sup> Tang, J.Y., et al. *The Journal of biological chemistry* (2018).

<sup>3</sup> Durán, D., et al. *Sci Rep* (2021).

<sup>4</sup> Barret, M., et al. *Microbiology* (2011).

<sup>5</sup> Abby, S.S., et al. *Scientific reports* (2016).

<sup>6</sup> Sana, T.G., et al. *Frontiers in cellular and infection microbiology* (2016).

This work has been funded by Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades FEDER/EU Grant RTI2018-093991-B-I00. David Vázquez was granted by FPI-UAM program (SFPI/2021-00458).



## Papel de FleN en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

Laura Martínez-Rodríguez<sup>1</sup>, Andrea García Alcaide<sup>2</sup>, Aroa López Sánchez<sup>2</sup>, Fernando Govantes<sup>2</sup>,  
M<sup>a</sup> Trini Gallegos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, España

<sup>2</sup>Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España  
[maritrini.gallegos@eez.csic.es](mailto:maritrini.gallegos@eez.csic.es)

*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 porta el operón *wssABCDEFGHI* para la síntesis de celulosa acetilada, cuya producción se estimula al aumentar los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP (1,2). Esto mejora la formación de biopelículas aire-líquido y genera un morfotipo de colonia arrugada en medios sólidos.

En el presente estudio avanzamos en el estudio de la regulación de la producción de celulosa analizando el papel de FleN en este proceso. Anteriormente habíamos demostrado que bajo niveles fisiológicos de c-di-GMP, los reguladores FleQ y AmrZ se unen directamente a una región adyacente en el promotor *wss* inhibiendo su expresión. Sin embargo, solo FleQ responde a la presencia de c-di-GMP liberándose de su operador en *wss* y activando la producción de celulosa (3). FleN, un conocido antiactivador de FleQ, también participa en el control de la expresión del operón *wss* uniéndose a FleQ, aunque de forma diferente a como lo hace en *Pseudomonas aeruginosa* para la regulación de otros exopolisacáridos (4-6). Hemos observado que el complejo FleQ-FleN es capaz de unirse a su operador, pero, curiosamente, el c-di-GMP provoca una remodelación de ese complejo proteico en el ADN. FleN también está implicada en otros procesos en Pto DC3000, como la motilidad, el desarrollo de biopelículas o la morfología de las colonias.

1. Pérez-Mendoza, D., Aragón, I.M., Prada-Ramírez, H.A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.T., and Sanjuán, J. (2014) Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS One* 9: e91645.
2. Prada-Ramírez, H.A., Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., Sanjuán, J., and Gallegos, M.T. (2016) AmrZ regulates cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol. Microbiol.* 99: 960-977.
3. Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Ferreiro, M.D., Sanjuán, J., and Gallegos, M.T. (2019) AmrZ and FleQ co-regulate cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Front. Microbiol.* 10: 746.
4. Hickman, J.W., and Harwood, C.S. (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* 69: 376-389.
5. Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R., and Harwood, C.S. (2012) The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* 40: 7207-7218.
6. Baraquet, C., and Harwood, C.S. (2016) FleQ DNA binding consensus sequence revealed by studies of FleQ-dependent regulation of biofilm gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 198: 178-186.

Financiado por P20\_00834, proyecto del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación. PAIDI 2020. (Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía/FEDER).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**El mantenimiento de los niveles de Topoisomerasa I es esencial para la viabilidad celular en *Streptococcus pneumoniae***

M. García-López, M. J. Ferrándiz, A. G. de la Campa

Unidad de Genética Bacteriana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III  
[miriamgarcia@isciii.es](mailto:miriamgarcia@isciii.es)

El DNA en las bacterias está compactado de una forma compatible con la replicación, la segregación cromosómica y la expresión génica. El nivel de compactación del DNA está regulado por su nivel de superenrollamiento (Sc), además de por la unión de proteínas asociadas al nucleóide. Las DNA topoisomerasas son enzimas cuya actividad modifica el Sc. En *Streptococcus pneumoniae* (SPN), la girasa (GyrA<sub>2</sub>GyrB<sub>2</sub>) introduce Sc negativo, mientras que la topoisomerasa I (TopoI, *topA*) relaja el DNA. La regulación de los niveles de estas enzimas permite la homeostasis del Sc. Con el objetivo de determinar el efecto de los niveles de TopoI en la fisiología celular, a partir de la cepa silvestre R6 se construyeron dos cepas que permiten la expresión controlada de *topA* bajo el control del promotor P<sub>Zn</sub>. R6P<sub>Zn</sub>*topA* expresa *topA* tanto a partir de P<sub>Zn</sub> como a partir de su propio promotor. ΔTopAP<sub>Zn</sub>*topA* solo expresa *topA* bajo P<sub>Zn</sub>. Se comprobó mediante *Western-blot* que en ambas cepas la expresión de *topA* era dependiente de la cantidad de Zn en el medio. Calculamos el número de moléculas de TopoI y GyrA en la cepa R6, siendo de 1.552 ± 172 y 2.381 ± 402 (promedio ± SD), respectivamente. El aumento de 2 veces en los niveles de TopoI supuso un incremento en el tiempo de duplicación desde 73 min (R6) a 161 min (R6P<sub>Zn</sub>*topA* con 300 μM de Zn). La depleción de TopoI inhibió el crecimiento y aumentó el nivel de Sc desde σ = -0.060 (R6) a σ = -0.088 (ΔTopAP<sub>Zn</sub>*topA* en ausencia de Zn). La cantidad de TopoI no puede disminuir por debajo de 2 veces (709 ± 96 moléculas, ΔTopAP<sub>Zn</sub>*topA* con 75 μM de Zn) respecto a la cantidad presente en R6 para un crecimiento óptimo. Además, el mantenimiento de una proporción adecuada (1.8 veces) entre la cantidad de GyrA y TopoI, que asegura la homeostasis del Sc, se correlaciona con la viabilidad celular.



## **Fotoproducción de amonio a partir de N<sub>2</sub> por cianobacterias con bajos niveles de glutamina sintetasa. Hacia un sistema sostenible de producción de fertilizantes nitrogenados.**

Alba M. Gutiérrez-Diáñez, Laura Pérez-Rodríguez, M. Isabel Muro-Pastor, Francisco J. Florencio

Instituto de Bioquímica Vegetal y fotosíntesis (IBVF), CSIC-Universidad de Sevilla, Av. Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, España.

[alba.gutierrez@ibvf.csic.es](mailto:alba.gutierrez@ibvf.csic.es)

El incremento de las demandas nutricionales como consecuencia del aumento de la población mundial ha puesto de manifiesto la necesidad de optimizar los procesos de producción agrícola. Dentro de esta optimización, el aporte de fertilizantes, y en concreto de nitrógeno, constituye uno de los aspectos más importantes. Actualmente, el proceso Haber-Bosch es el que se utiliza para la producción de amonio. Este método industrial requiere altas temperaturas y altas presiones, lo que implica una elevada emisión de gases de efecto invernadero, al usar gas natural, comprometiendo gravemente al medioambiente. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas más sostenibles manteniendo la productividad agrícola (1). En este contexto, se plantea el uso de cianobacterias para la obtención de biofertilizantes.

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos capaces de asimilar diferentes formas de nitrógeno, incluyendo en algunos casos el nitrógeno atmosférico, reduciéndolas todas hasta amonio. Este amonio es incorporado a esqueletos carbonados a través de la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), que constituyen el ciclo GS-GOGAT. La regulación fina de la actividad GS, mediante el uso de un promotor inducible, permite eliminarla por completo tanto en estirpes no fijadoras de nitrógeno (*Synechocystis* sp. PCC 6803) como fijadoras (*Anabaena* sp. PCC 7120). En estas condiciones el amonio no asimilado se excreta al medio y éste podría ser usado como biofertilizante nitrogenado para el crecimiento de plantas de interés agronómico (2).

Nuestros resultados demuestran la acumulación de amonio en el medio de cultivo de las cianobacterias hasta concentraciones en torno a 5-7 mM tras la pérdida total de la actividad GS al eliminar el inductor. La optimización del proceso en función de las condiciones de cultivo (iluminación, densidad celular, etc), así como los ensayos preliminares de fertilización se encuentran en curso.

### **Referencias**

- (1) Ornes S. Green ammonia could produce climate-friendly ways to store energy and fertilize farms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021;118(49):1–4.
- (2) Grizeau D, Bui LA, Dupré C, Legrand J. Ammonium photo-production by heterocytous cyanobacteria: potentials and constraints. Crit Rev Biotechnol. 2016;36(4):607–18.

### **Agradecimientos**

Junta de Andalucía (FEDER) Proyecto US- 1380453, P20\_00569 y Grupo BIO-0284.



## Estudio del sensor de DNA citosólico cGAS en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*

Sara López-Montesino<sup>1</sup>, Julia María Coronas-Serna<sup>2</sup>, María Molina Martín<sup>1</sup> y Víctor J. Cid<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS). Universidad Complutense de Madrid.

<sup>2</sup>Université de Lausanne, Switzerland.

[saralo08@ucm.es](mailto:saralo08@ucm.es)

La sintasa GMP-AMP cíclica (cGAS) es un receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos implicado en la detección de ADN citosólico. Una vez detectado, cGAS dimeriza y genera un segundo mensajero, 2',3'-GMP-AMP cíclico (cGAMP) que activa al efector STING con la subsiguiente generación de interferones y otros mediadores inflamatorios. cGAS también detecta ADN propio asociado a un daño celular, por lo que, esta ruta de señalización, además de ser esencial para el control de infecciones, también esté asociada a inmunopatologías (C. Barnett, K *et al*, 2019).

En el presente trabajo se estudian los efectos de su expresión en el modelo eucariótico *Saccharomyces cerevisiae*, tanto de la proteína humana entera como de sus diferentes dominios y de dos mutaciones G212A/S213A y R71E/R75E, que se ha descrito que inhiben su unión al ADN y a la membrana plasmática respectivamente. La toxicidad de la proteína se ensayó mediante crecimiento en medio sólido expresando los diferentes fragmentos de cGAS fusionados a GFP en un vector de expresión para levaduras bajo el promotor inducible *GAL1*. Posteriormente, para la localización subcelular se utilizaron las mismas versiones de la proteína y el mismo vector de expresión además de co-expresarla con marcadores de diferentes orgánulos celulares fusionados a proteínas fluorescentes rojas.

Los resultados mostraron que la sobreexpresión de las diferentes versiones de cGAS humana eran toleradas por la levadura. Los estudios de localización mostraron que la proteína completa se localizaba en forma de agregados citosólicos y que la región C-terminal de la proteína era necesaria para formar esos agregados, además de que la mutación de los residuos R71E/R75E minimizaban su formación. La región N-terminal mostraba una localización citosólica difusa además de impedir la entrada de la proteína al núcleo. Sin embargo, la proteína que llevaba la mutación G212A/S213A presentaba una localización nuclear. Estos resultados revelan que el modelo de levadura es útil para estudiar la contribución de los diferentes dominios a la localización subcelular de la proteína. En la actualidad estamos co-expresando cGAS y STING con la intención de desarrollar un modelo heterólogo de levadura humanizada para realizar estudios moleculares sobre esta importante ruta de señalización celular.

### Referencia:

C. Barnett, K, M. Coronas-Serna, J, Zhou, W, J. Erandes, M, Cao, A, J. Kranzusch, P and C. Kagan, J. Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA. Cell, [Volume 176, Issue 6](#), Pages 1432-1446.e11. 2019

### Agradecimientos:

Sara López Montesino está contratada por la ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (FPI) financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, España.

Esta investigación está financiada por el proyecto de investigación PID2019-105342GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación (España) y el S2017/BMD-3691 (InGEMICS-CM) de la Comunidad de Madrid y Fondos Estructurales Europeos.



## Unraveling the roles of three uncharacterized extracytoplasmic function sigma ( $\sigma^{\text{ECF}}$ ) of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*

Francisco J. Marcos-Torres, Alicia García-Puente, and María A. Llamas.

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín-CSIC, Granada, Spain.  
[franciscojavier.marcos@eez.csic.es](mailto:franciscojavier.marcos@eez.csic.es), [marian.llamas@eez.csic.es](mailto:marian.llamas@eez.csic.es)

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen responsible of many life-threatening acute and chronic infections. Its highly efficient host colonization and adaptability to changing environments stems from the presence of complex regulatory networks governed by a wide array of signal transduction mechanisms. Among them, extracytoplasmic function sigma ( $\sigma^{\text{ECF}}$ ) factors play a key role in virulence and survival of this pathogen.  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors are dissociable subunits of the RNA polymerase that respond to specific signals and initiate transcription of the response genes.  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors are often modulated by anti- $\sigma$  factors that keep them inactive in absence of the stimulus. From the 19  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors produced by the reference strain *P. aeruginosa* PAO1, the ones encoded by the PA1351, PA1363, and PA3285 genes have not been studied yet. PA1351 belongs to the ECF42 group of  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors. These regulators hold an essential C-terminal extension rich in TPR domains<sup>1</sup>. ECF42  $\sigma$  factors usually regulate the expression of YCII-related genes located in their genetic neighborhood<sup>1</sup> (PA1349 and PA1354 in PAO1). Interestingly, PA1351 shares 68.1% amino acid identity with ECF-10 from *Pseudomonas putida*, an  $\sigma^{\text{ECF}}$  conferring sensitivity to oxidative stress and antibiotics to this bacterium. The second  $\sigma^{\text{ECF}}$  factor, PA1363, is associated with a transmembrane anti- $\sigma$  factor (PA1364) and a TonB-dependent outer membrane receptor (PA1365). These proteins are part of a system known as a cell-surface signaling that in most cases regulates iron uptake in *P. aeruginosa*<sup>2</sup>. An analysis shows that PA1365 displays 68% amino acid identity with the alcaligin E receptor of *Ralstonia eutropha*, suggesting that this siderophore could be the iron carrier activating PA1363. Finally, PA3285 belongs to the ECF293 group of  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors, usually involved in oxidative stress. Our analyses indicate that PA3285 is likely regulated by a Zn-binding soluble anti- $\sigma$  factor. To start characterizing these  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors, their regulons will be identified by RNAseq. Because the inducing signal for these regulators is still unknown, we have constructed strains overexpressing the  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors. Moreover, we have obtained mutants for the  $\sigma^{\text{ECF}}$  and anti- $\sigma$  factors of each system. The activity of the  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors has been analyzed using *lacZ* transcriptional fusions to  $\sigma^{\text{ECF}}$ -regulated genes.

### REFERENCES:

1. Liu, Q., Pinto, D., & Mascher, T. (2018) Characterization of the widely distributed novel ECF42 group of extracytoplasmic function  $\sigma$  factors in *Streptomyces venezuelae*. J Bacteriol, e00437-18.
2. Otero-Asman, J. R., Wettstadt, S., Bernal, P., & Llamas, M. A. (2019). Diversity of extracytoplasmic function sigma ( $\sigma^{\text{ECF}}$ ) factor-dependent signaling in *Pseudomonas*. Mol Mic, 112, 356–373.

**Acknowledgements:** This work is funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 Spanish agency with project PID2020-115682GB-I00.



## **Análisis transcriptómico de la respuesta de *Bradyrhizobium diazoefficiens* a la limitación de cobre en condiciones desnitrificantes**

Juan J. Cabrera, Andrea Jiménez-Leiva, Pedro J. Pacheco, Raquel A. Juárez, Eulogio J. Bedmar, Socorro Mesa, María J. Delgado.

Departamento de Microbiología del suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España

[socorro.mesa@eez.csic.es](mailto:socorro.mesa@eez.csic.es)

La limitación de cobre en suelos es uno de los principales factores implicados en el incremento de la emisión del potente gas de efecto invernadero óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) [1]. En la simbiosis *Bradyrhizobium diazoefficiens*-soja, se ha demostrado una relación directa entre la disponibilidad de cobre y la emisión de N<sub>2</sub>O por los nódulos [2]. El cobre es un cofactor de las enzimas nitrato- (NirK) y óxido nitroso- (Nos) reductasas, afectando también a su expresión y la de la enzima óxido nítrico reductasa (Nor) [3]. Es bien conocido el control de la desnitrificación en respuesta a condiciones limitantes en oxígeno y óxidos de nitrógeno por una compleja red formada por las cascadas FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR y RegSR-NifA [4]. En particular, el regulador RegR, junto al sensor RegS, forman un sistema de dos componentes que activa la expresión de los genes *nor* y *nos* que codifican las enzimas Nor y Nos [5].

Para investigar el papel del cobre en la regulación de la desnitrificación en *B. diazoefficiens*, se realizó un estudio transcriptómico por RNAseq de células cultivadas en condiciones desnitrificantes y limitación de cobre. Este análisis reveló la existencia de una respuesta global que incluye 767 genes diferencialmente expresados (FC>2; Padj. val. <0,01) en comparación con condiciones estándar de cobre.

De los genes estructurales implicados en desnitrificación, la expresión de *nirK* y *norCBQD* se redujo significativamente. Sin embargo, el gen regulador *regR* resultó considerablemente inducido (FC≈7), mientras que la expresión de los genes *fixK<sub>2</sub>* y *nnrR* no se afectó. Este perfil de expresión se validó mediante PCR cuantitativa y sugiere la implicación de un papel represor de RegR sobre los genes *nirK* y *norC* en respuesta a limitación de cobre. Sin embargo, en una cepa mutante en el gen *regR* crecida en estas condiciones, se observó una reducción de la expresión de los genes *norC*, *nirK* y *nnrR*, mientras que los niveles de transcripción de *fixK<sub>2</sub>* se indujeron. Estos resultados proponen la existencia de una interrelación entre las cascadas FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR y RegSR-NifA en la cual RegR actuaría como un modulador de los genes de la desnitrificación en respuesta a limitación de cobre.

1. Richardson *et al.*, 2009. Trends Biotechnol. 27:388-397
2. Tortosa *et al.*, 2020. Environ. Exp. Bot. 180:104262
3. Pacheco *et al.*, 2022. Int. J. Mol. Sci. 23:3386
4. Fernández *et al.*, 2016. Springer ed. DOI 10.1007/978-3-319-32528-6\_6
5. Torres *et al.*, 2014. PLoS One. 9:e99011

Se agradece el apoyo económico de los proyectos AGL2017-85676-R y PID2020-114330GB-100 (cofinanciados por el Ministerio de Economía y Competitividad y FEDER) y el proyecto P18-RT-1401 (Junta de Andalucía).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### Regulación mediada por RNAs antisentido

Manuel Brenes-Álvarez, Isidro Álvarez-Escribano, Agustín Vioque y Alicia M. Muro-Pastor

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla), Sevilla, España  
[alicia@ibvf.csic.es](mailto:alicia@ibvf.csic.es)

El análisis de los transcriptomas bacterianos mediante metodologías globales revela abundante transcripción antisentido, esto es, de la hebra complementaria a las secuencias codificantes. La transcripción antisentido es en ocasiones resultado de la transcripción convergente de genes vecinos que, en ausencia de terminadores transcripcionales efectivos, resulta en extensas regiones 3' UTR (untranslated regions) solapantes. Son también habituales los casos de regiones 5' UTR solapantes. La posible relevancia fisiológica de este tipo de transcripción antisentido dependerá de la extensión del solapamiento y de la regulación de la expresión de los transcritos en cuestión. En contraste con la transcripción antisentido solapante, existen RNAs antisentido que podríamos denominar "autónomos" cuya transcripción tiene lugar en la hebra no codificante desde un promotor propio. La expresión regulada de este tipo de transcritos antisentido en respuesta a diferentes situaciones ambientales, sugiere que puedan tener un papel en la adaptación a dichas situaciones. Nuestro organismo modelo, la cianobacteria filamentosa *Nostoc* sp. PCC 7120, es capaz de diferenciar un tipo celular especializado en la fijación de nitrógeno atmosférico, los heterocistos, que se diferencian a partir de las células vegetativas dando lugar a un patrón semi-regular en los filamentos. Este fenómeno de diferenciación celular tiene lugar en respuesta a la carencia de nitrógeno combinado e implica una profunda transformación morfológica y metabólica de las células que se transforman en heterocistos.

El análisis transcriptómico de las respuestas de *Nostoc* a la limitación de nitrógeno combinado nos está permitiendo identificar numerosos transcritos antisentido cuya expresión está regulada en función de la disponibilidad de nitrógeno. Aunque en muchos casos se trata de regiones 5' UTR o 3' UTR solapantes, también hemos verificado la existencia de transcritos antisentido "autónomos" que se expresan desde promotores regulados por NtcA (regulador global de la asimilación de nitrógeno) o HetR (regulador de la diferenciación celular), en este último caso específicamente en los heterocistos y no en el resto de células del filamento. La expresión de algunos de estos RNAs antisentido únicamente en los heterocistos podría generar patrones de expresión complejos y contribuir a la reprogramación metabólica de estas células especializadas.

**Financiado por** PID2019-105526GB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) y PY20-00004 y US-1379643 (Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía/FEDER).





## **Implicación de los metalorreguladores Fur en la homeostasis del hierro en la bacteria extremófila *Chromohalobacter salexigens* en función de la salinidad y temperature**

Emilia Naranjo, Montserrat Argandoña, Carmen Vargas, Joaquín J. Nieto

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla  
[eminaranjo@us.es](mailto:eminaranjo@us.es)

*Chromohalobacter salexigens* es una bacteria halófila modelo de máximo interés y aplicabilidad en Biotecnología, al sintetizar, en respuesta a estrés osmótico y elevada temperatura, los solutos compatibles ectoína e hidroxiectoína, de gran interés en Dermofarmacia, Biología Molecular o Biomedicina. Nuestros estudios previos sobre la síntesis de ectoínas y su regulación en esta bacteria indican que el hierro juega un papel importante en dicha síntesis y su osmo- y termoadaptación (1, 2). Así, el metalorregulador global Fur es el encargado de mantener un control preciso de los niveles de hierro intracelulares así como de ectoínas, existiendo dos parálogos pertenecientes a la superfamilia Fur, Fur1 y Fur2.

En este estudio hemos analizado en detalle la regulación de la homeostasis del hierro y su relación con la salinidad (0,6 y 2,5 M NaCl) y temperatura (45°C) en *C. salexigens*. Dado que previamente (1) demostramos la implicación de Fur1 en la regulación de la síntesis de sideróforos en función de la salinidad, se ha realizado un análisis fenotípico de mutantes en ambos reguladores para dilucidar el papel de cada uno de ellos en dicha homeostasis, en diferentes condiciones de salinidad y temperatura y concentraciones de Fe<sup>3+</sup>. Para ello se ha estudiado su implicación en la producción de sideróforos (ensayo CAS), el contenido intracelular de hierro (ICP-OES) así como en la regulación de la expresión (qPCR) de los sistemas de transporte de hierro independientes de sideróforos, ZupT y EfeUOB,

Los resultados indican que los metalorreguladores Fur1 y Fur2 juegan un papel clave en la homeostasis del hierro, comportándose como activadores o inhibidores según las condiciones de salinidad, temperatura y de Fe, controlando y coordinando la expresión de los sistemas de captación de hierro ferroso ZupT y EfeUOB, así como la producción de sideróforos. Es de destacar que los mutantes *fur1* y *fur1fur2* no presentaron correlación entre la acumulación de hierro y la producción de sideróforos, a diferencia de lo observado en el mutante *fur2*, aunque únicamente en condiciones de baja salinidad. Estos datos sugieren la existencia de otro regulador adicional implicado en la regulación de la homeostasis del hierro en *C. salexigens* en las diferentes condiciones de estudio ensayadas.

### **Referencias:**

- (1) Argandoña, M., Nieto, J.J., Iglesias-Guerra, F., Calderón, M.I., García-Esteba, R., and Vargas, C. (2010) Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3575–3589.
- (2) Salvador, M., Argandoña, M., Naranjo, E., Piubeli, F., Nieto, J.J., Csonka, L.N., and Vargas, C. (2018) Quantitative RNA-seq analysis unveils osmotic and thermal adaptation mechanisms relevant for ectoine production in *Chromohalobacter salexigens*. *Front Microbiol* **9**: 1–19.

**Financiación:** Proyecto (PID2019-111273RB) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación I00/AEI/10.13039/501100011033; Programa Operativo FEDER 2014-2020 y Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad de la Junta de Andalucía (US-1380847).



## Role of *Thermus thermophilus* AddAB in DNA repair and defense mechanisms

Patricia Pérez-Arnaiz, Carlos Verdú Cano, Mario Mencía Caballero, José Berenguer Carlos

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
[patricia.pereza@uam.es](mailto:patricia.pereza@uam.es)

Homologous recombination (HR) plays key roles in fundamental processes such as repair of DNA double strand breaks (DSBs) and in bacterial horizontal gene transfer, being essential for the maintenance of genome integrity and for the generation of genetic diversity (1).

AddAB is a nuclease-helicase complex, equivalent and closely related to RecBCD that initiates the repair of DSBs by assisting the loading of the recombinase RecA onto ssDNA to initiate homologous recombination (2). In bacteria, this initiation step can also be performed by the RecFOR protein complex pathway (3).

We have studied the role of AddAB complex in *Thermus thermophilus*, the most genetically tractable extreme thermophilic bacteria with a highly efficient natural competence apparatus.

Whole genome sequencing showed that the deletion of *T. thermophilus primpol* gene, a primase-polymerase encoded within a genetic mobile element (ICETh2), often involves the inactivation of one or both *addAB* genes. In *T. thermophilus*, Primpol is not required for viability or survival after DNA damage and it has been proposed to be involved in a defense mechanism against exogenous DNA (eDNA) (4). We have constructed and analyzed a mutant lacking *addA* and *addB*. We also combined the deletion of *addAB* with *primpol* deletion and with the Primpol catalytic mutant. Cells lacking *addAB* and *addAB* in combination with *primpol* show an increase in five and three orders of magnitude in their transformation efficiency with plasmid and linear DNAs, respectively. Mutant cells lacking *addAB* alone or in combination with *primpol* exhibit lower levels of survival after treatment with DNA-damaging agents, such as ionizing radiation (IR), 4-NQO (a chemical analogue of UV radiation) and Bleomycin. In addition, the double mutant *addABppol* shows increased sensitivity to oxidative damage. Taken together, our results show that the AddAB enzymatic complex is involved, probably in interplay with Primpol, in key survival mechanisms in bacteria such as DNA repair and defense against eDNA.

(1) Kowalczykowski, S.C. *et al* (1994) Microbiological Reviews **58**: 401-465.

(2) Amundsen, S.K. and Smith G.R. (2003) Cell **112**: 741-744.

(3) Morimatsu K. *et al*. (2003) Mol. Cell **11**: 1337-1347.

(4) García-Quintans *et al*. (2020) Environmental Microbiology **22**: 4647-4657.

**Acknowledgements.** This work has been funded by project PID2019-109073RB-I00 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **Role of GacS in biofilm formation by the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas stutzeri* MJL19**

Verónica Pérez Padilla, María Isabel Ramos González and Manuel Espinosa Urgel

Department of Biotechnology and Environmental Protection. Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

[veronica.perez@eez.csic.es](mailto:veronica.perez@eez.csic.es)

*Pseudomonas stutzeri* MJL19 is a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) isolated from the rhizosphere of succulent plants (*Sesuvium portulacastrum*) growing in the Salinas Grandes salt flat in Argentina. *P. stutzeri* MJL19 forms wrinkly colonies on solid medium and thick biofilms (particularly on plant roots), phenotypes that generally correlate with elevated concentrations of the intracellular second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP). Using a fluorescence-based biosensor, it has been shown that this strain has naturally high c-di-GMP levels. We have performed random transposon mutagenesis using mini-Tn5[Km1], and screened for mutants of MJL19 that lost the wrinkly colony phenotype, potentially indicating altered c-di-GMP turnover. One of these mutants is being characterized in detail. The transposon insertion disrupts the gene encoding a sensor histidine kinase which shares 68% identical residues with GacS of *Pseudomonas putida*, and is annotated either as GacS or BarA in different *P. stutzeri* strains in the databases. The *gacS*::mini-Tn5[Km1] mutant has reduced biofilm formation capacity and increased swimming motility. Consistently, lower fluorescence emission by the c-di-GMP biosensor could be observed, indicating that the mutant has reduced levels of the second messenger. In addition, staining with Congo red revealed differences between the wild type (white colonies) and the mutant (red colonies) suggesting changes in the production of extracellular matrix (amyloid fibers and/or exopolysaccharides). Interestingly, the mutant, like the parental strain, grows at high salt concentrations (500 mM) in both liquid and solid LB media, indicating that the mutation does not affect its ability to tolerate saline stress, despite the altered extracellular matrix composition. All these results suggest that in *P. stutzeri*, as in other *Pseudomonas* species, GacS is a key regulatory element of the bacterial lifestyle, through the control of c-di-GMP levels. Further work will expand our knowledge of the genetic network associated with GacS in this strain.

This work is funded by grant PID2019-109372GB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033)



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**La interacción entre FimV, ParC y FlhF coordina la localización polar del aparato flagelar y los complejos de quimiotaxis en *Pseudomonas putida***

Marta Pulido-Sánchez, Antonio Leal-Morales, Aroa López-Sánchez, Fernando Govantes

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide  
[mpulsan@upo.es](mailto:mpulsan@upo.es)

*Pseudomonas putida* es una bacteria Gram-negativa de suelo que utiliza un penacho de entre 3-6 flagelos unipolares para desplazarse. Tras cada división celular, el aparato flagelar y los complejos de quimiotaxis asociados deben ensamblarse en el nuevo polo de la célula hija, pero los mecanismos implicados están hasta ahora poco caracterizados. Aquí mostramos la identificación de tres proteínas implicadas en la localización polar de la maquinaria flagelar y quimiotáctica. Mediante marcaje fluorescente hemos determinado que la proteína flagelar FlhF se localiza en el polo recién sintetizado durante la división celular. La delección de *flhF* provoca la aparición de flagelos deslocalizados y defectos en movilidad, lo que sugiere que FlhF es un determinante de la flagelación polar en *P. putida*. De forma similar, la proteína ParC también presenta localización polar. Un mutante  $\Delta parC$  presenta una menor movilidad y no es quimiotáctico. En este mutante los flagelos mantienen su localización polar, pero no las proteínas de quimiotaxis, lo que sugiere que ParC es un determinante de la localización polar de los complejos de quimiotaxis. FimV es una proteína transmembrana con un dominio periplásmico de unión a peptidoglicano y un dominio citoplásmico potencialmente implicado en interacciones proteína-proteína. FimV presenta una dinámica de localización polar similar a la de FlhF. Un mutante  $\Delta fimV$  es defectivo en movilidad y en la localización polar de FlhF y ParC. En conjunto, nuestros resultados sugieren un sistema jerárquico de reclutamiento en el cual FimV es un determinante de la localización polar de FlhF y ParC, que son a su vez responsables de la localización polar del aparato flagelar y de los complejos de quimiotaxis, respectivamente.

Este trabajo está financiado por un proyecto del Plan Estatal del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PGC2018-097151-B-I00). y por un contrato del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario FPU FPU19/02899, concedido a M. P.-S.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **Regulation of extracellular matrix components by AmrZ is mediated by c-di-GMP in *Pseudomonas ogarae* F113**

Esther Blanco-Romero<sup>1</sup>, Daniel Garrido-Sanz<sup>1,2</sup>, David Durán<sup>1</sup>, Marta Martín<sup>1</sup>, Miguel Redondo-Nieto<sup>1</sup> and Rafael Rivilla<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin, 2, 28049 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Department of Fundamental Microbiology, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

[rafael.rivilla@uam.es](mailto:rafael.rivilla@uam.es)

The AmrZ/FleQ hub has been identified as a central node in the regulation of environmental adaption in the plant growth-promoting rhizobacterium and model for rhizosphere colonization *Pseudomonas ogarae* F113. AmrZ is involved in the regulation of motility, biofilm formation, and bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) turnover, among others, in this bacterium. The mutants in *amrZ* have a pleiotropic phenotype with distinguishable colony morphology, reduced biofilm formation, increased motility, and are severely impaired in competitive rhizosphere colonization. Here, RNA-Seq and qRT-PCR gene expression analyses revealed that AmrZ regulates many genes related to the production of extracellular matrix (ECM) components at the transcriptional level. Furthermore, overproduction of c-di-GMP in an *amrZ* mutant, by ectopic production of the *Caulobacter crescentus* constitutive diguanylate cyclase PleD\*, resulted in increased expression of many genes implicated in the synthesis of ECM components. The overproduction of c-di-GMP in the *amrZ* mutant also suppressed the biofilm formation and motility phenotypes, but not the defect in competitive rhizosphere colonization. These results indicate that although biofilm formation and motility are mainly regulated indirectly by AmrZ, through the modulation of c-di-GMP levels, the implication of AmrZ in rhizosphere competitive colonization occurs in a c-di-GMP-independent manner.

This work has been funded by Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades FEDER/EU Grant RTI2018-093991-B-I00.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**PrimPol: una primasa – polimerasa termófila relacionada con la entrada de DNA exógeno y la maquinaria de recombinación**

Carlos Verdú Cano, Patricia Pérez-Arnáiz, Ali Gera, Alba Blesa, Mario Mencía Caballero y José Berenguer Carlos

Nombre del Centro o Institución: Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
[carlos.verdu@uam.es](mailto:carlos.verdu@uam.es)

En *Thermus thermophilus* HB27 se encuentran descritos dos elementos genéticos integrativos interdependientes denominados ICETH1 e ICETH2, que parecen actuar de forma complementaria. Mientras que ICETH1 codifica la maquinaria necesaria para la donación de DNA durante la transjugación, el ICETH2 codifica los genes necesarios para la escisión/integración de ambos elementos. No obstante, la mayoría de los genes codificados en el ICETH2 no tienen función fisiológica conocida. Entre estos genes se encuentra *primpol*.

El gen *primpol* codifica una DNA primasa – polimerasa (PrimPol) cuya actividad ha sido descrita *in vitro* pero que no parece tener un papel relacionado con el ciclo biológico del ICETH2. Es por todo esto que cabe la hipótesis que PrimPol esté involucrada en otros aspectos de la biología de *Thermus spp.*, como mecanismos de reparación similares a sus homólogos de eucariotas, o que participe en mecanismos de defensa, similar a muchos operones descritos en bacterias. Para estudiar estas hipótesis obtuvimos un mutante de delección, denominado  $\Delta primpol$ , y se ensayó su eficiencia de transformación. El resultado observado fue un incremento significativo tanto en la incorporación de DNA plasmídico como, especialmente, de DNA integrativo, lo que sugeriría que PrimPol está involucrada en mecanismos de control de entrada de DNA externo, y/o en la recombinación homóloga. La cuantificación de DNA plasmídico por célula mediante qPCR así como estudios de estabilidad de plásmido mostró que PrimPol facilita la replicación de los mismos y los estabiliza, un efecto completamente contrario al de ThAgo.

La mutación de genes implicados en recombinación homóloga (*recO*, *recR*, *ruvB*) en  $\Delta primpol$  no produjo un fenotipo similar a  $\Delta primpol$ . Sin embargo, la secuenciación completa del genoma del mutante  $\Delta primpol$  mostró la delección completa de los genes *addA* y *addB* que en *Thermus* codifican la excinucleasa equivalente a RecBCD. La generación de nuevos mutantes  $\Delta ppol::kanamicina$  así como de otros genes del ICETH2 y su posterior secuenciación genómica completa volvió a mostrar mutaciones en *addA* y *addB*. Esto indica que: 1) existe una relación funcional de equilibrio entre PrimPol y AddAB y, 2) que debe de existir un mecanismo de recombinación homóloga alternativo en *T. thermophilus*, pues la ausencia de AddAB y de los genes *recFOR* y *ruvB*, aún permite la adquisición de DNA por recombinación homóloga.

**Referencias:**

- Baquedano, I., Mencía, M., Blesa, A., Burrus, V., & Berenguer, J. (2020). ICETH1 and ICETH2, two interdependent mobile genetic elements in *Thermus thermophilus* transjugation. *Environmental Microbiology*, 22(1), 158-169.
- García-Quintans, N., Baquedano, I., Blesa, A., Verdú, C., Berenguer, J., & Mencía, M. (2020). A thermostable DNA primase-polymerase from a mobile genetic element involved in defence against environmental DNA. *Environmental microbiology*, 22(11), 4647-4657.

**Agradecimientos:**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2019-109073RB-I00



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### **Arbitrium system. Más allá de la decisión lisis-lisogenia en bacteriófagos.**

Alberto Marina<sup>1</sup>, Francisca Gallego del Sol<sup>1</sup>, Sara Zamora-Caballero<sup>1</sup>, Alonso Felipe<sup>1</sup>, Javier Mancheño<sup>1</sup>, Nuria Quiles-Puchalt<sup>2</sup>, Aisling Brady<sup>2</sup>, José R. Penadés<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), CSIC and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain

<sup>2</sup>MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, UK

[amarina@ibv.csic.es](mailto:amarina@ibv.csic.es)

Arbitrium es un sistema de quorum sensing que fue descrito en fagos de la familia SPbeta para comunicarse con su progenie y decidir durante la infección entre ciclo lítico y lisogénico (1). Este sistema está controlado por un péptido, AimP, que se une al regulador transcripcional AimR inhibiendo su capacidad de unión a DNA y por ello, la expresión de *aimX*, un pequeño RNA no codificante. La presencia de *aimX* promueve el ciclo lítico por un mecanismo vagamente conocido, de modo que a altos niveles de AimP, que corresponde a una alta presencia de fagos replicándose, disminuye *aimX* llevando al fago a lisogenia y previniendo acabar con las potenciales bacterias hospedadoras y los fagos integrados (1). Recientemente se han encontrado estos sistemas en múltiples fagos que infectan bacterias de filo Firmicutes, así como en otros elementos genéticos móviles y los genomas de estas bacterias hospedadoras, sugiriendo que arbitrium debe tener funciones más allá de la decisión lisis-lisogénica.

Tras resolver las estructuras tridimensionales de los AimRs de diferentes fagos en sus formas apo, unida a AimP o a sus operadores hemos determinado las bases moleculares del mecanismo de acción de este sistema, poniendo de manifiesto la posibilidad de “cross-talk” y regulación cruzada entre sistemas con relevantes implicaciones biológicas (2,3).

Además, nuestros recientes resultados han mostrado que arbitrium participa en la inducción del profago residente en el genoma del hospedador (4), poniendo de manifiesto un novedoso sistema genético de represión y regulación para los fagos de la familia SPbeta. En la comunicación presentaremos nuestros más recientes, y en algunos casos preliminares, avances en la caracterización molecular y funcional de este novedoso “switch” genético que implica formas alternativas de represión no previamente descritas en fagos y que propone funciones nuevas para los elementos del sistema arbitrium, además de una estrecha interrelación con la bacteria hospedadora.

1. Erez Z, et al. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*. 2017; 541(7638):488-493. doi: 10.1038/nature21049.
2. Gallego Del Sol F, Penadés JR, Marina A. Deciphering the Molecular Mechanism Underpinning Phage Arbitrium Communication Systems. *Mol Cell*. 2019;74(1):59-72.e3.
3. Gallego Del Sol F, et al. Insights into the mechanism of action of the arbitrium communication system in SPbeta phages. *Nat Commun*. Aceptado para publicación.
4. Brady A, et al. The arbitrium system controls prophage induction. *Curr Biol*. 2021 31(22):5037-5045.e3.

Financiado por grants PID2019-108541GB-I00 (Ministerio de Ciencia e Innovación) and PROMETEO/2020/012 (generalitat valencia) a A.M y 201531/Z/16/Z (Wellcome Trust) a J.R.P



***Pseudomonas aeruginosa* non-phosphorylated AlgR induces ribonucleotide reductase expression under oxidative stress conditions**

Alba Rubio-Canalejas<sup>1</sup>, Joana Admella<sup>1</sup>, Lucas Pedraz<sup>1</sup>, Eduard Torrents<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Bacterial infections and antimicrobial therapies group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST). Baldiri Reixac 15-21. 08028 Barcelona. Spain.

<sup>2</sup>Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028, Barcelona, Spain.

[arubio@ibecbarcelona.eu](mailto:arubio@ibecbarcelona.eu); [etorrents@ibecbarcelona.eu](mailto:etorrents@ibecbarcelona.eu)

Ribonucleotide reductases (RNR) are key enzymes that catalyze the synthesis of deoxyribonucleotides, the monomers needed for DNA replication and repair. RNR are classified into three classes (I, II, and III) depending on their overall structure and metal cofactor. Organisms whose genome encodes for several RNR classes are remarkably adaptable to different environments. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen harboring all three classes of RNR, increasing its metabolic versatility. It is known that during an infection, *P. aeruginosa* can grow to form a biofilm to be protected from the host immune defenses, such as the production of reactive oxygen species by macrophages. One of the essential transcription factors needed to regulate biofilm growth and other metabolic pathways is AlgR. AlgR is part of a two-component system where FimS is a kinase that catalyzes its phosphorylation in response to external signals. Additionally, AlgR is part of the regulatory network of the cell RNR regulation. In this study, we delved into the regulation of the RNR through AlgR under oxidative stress conditions. We have determined that the non-phosphorylated form of AlgR is responsible for the class I and II RNR induction after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition in planktonic culture and during flow biofilm growth. We observed a similar RNR induction pattern comparing the *P. aeruginosa* laboratory strain PAO1 with different *P. aeruginosa* clinical isolates. And finally, we showed that during a *Galleria mellonella* infection, where oxidative stress is highly produced, AlgR was crucial to induce class II RNR (*nrdJ*). Thereby, we showed that the non-phosphorylated form of AlgR, besides being crucial for infection chronicity, regulates the RNR network in response to oxidative stress during infection and biofilm formation.

This study was partially supported by grants from the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, MINECO, and Agencia Estatal de Investigación (AEI), Spain, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, FEDER, European Union (RTI2018-098573-B-100), the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2017SGR-1079), the European Regional Development Fund (FEDER), Catalan Cystic Fibrosis association and Obra Social "La Caixa". A.R.C. is thankful to MINECO, for its financial support through FPI (PRE2018-083709).





## Transcriptional regulators and chemoreceptors that respond to phytohormones in plant-associated bacteria

Miriam Rico-Jiménez<sup>a</sup>, Amalia Roca<sup>b</sup>, Tino Krell<sup>a</sup> and Miguel A. Matilla<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain.

<sup>b</sup>Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Spain.

[miriam.rico@eez.csic.es](mailto:miriam.rico@eez.csic.es)

Bacteria adapt to environmental changes through a variety of signal transduction systems. These systems include transcriptional regulators and chemoreceptors that sense signal molecules through dedicated ligand binding domains (LBDs). Indole-3-acetic acid (IAA) is the most common naturally occurring auxin and modulates plant growth and development. In addition, IAA is a ubiquitous signalling molecule produced by organisms of all kingdoms of life that has been shown to play important roles as an inter- and intra-kingdom signal molecule; especially in the interaction between plants and microorganisms. Here, we show that IAA inhibits the synthesis of the antibiotic andrimid in a rhizosphere bacterium of the *Serratia plymuthica* species. We found that this process is initiated by the specific binding of IAA to the LBD of the transcriptional regulator AdmX. Auxin binding causes conformational changes in AdmX that result in the inhibition of transcription of the andrimid biosynthetic gene cluster. Further studies revealed that an IAA metabolizing plant-associated *Pseudomonas putida* isolate exhibits chemotaxis to IAA. This chemotactic movement was shown to be independent of auxin metabolism and mediated by the PcpI chemoreceptor. Compared to other *P. putida* chemoreceptors, *pcpI* is expressed at low levels and, in multicopy, *pcpI* increased the magnitude of IAA chemotaxis more than 10-fold compared to the wild type strain. Heterologous expression of *pcpI* conferred IAA chemotaxis to different environmental and human pathogenic isolates of the *Pseudomonas* genus. Using ligand screening, microcalorimetry and quantitative chemotaxis assays, we found that PcpI also recognizes and mediates chemoattraction to various aromatic compounds, including the phytohormone salicylic acid. To the best of our knowledge, PcpI is the first chemoreceptor that recognizes two different plant hormones and extends the range of central signal molecules that are recognized by chemoreceptors. Our work highlights the multifunctional role of IAA and salicylic acid as intra- and inter-kingdom signal molecules.

### References

Miguel A. Matilla, Abdelali Daddaoua, Andrea Chini, Bertrand Morel and Tino Krell (2018) An auxin controls bacterial antibiotics production. *Nucleic Acids Research* **96**: 11229–11238.

Miriam Rico-Jiménez, Amalia Roca, Tino Krell and Miguel A. Matilla (2022) A bacterial chemoreceptor that mediates chemotaxis to two different plant hormones. *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.15920.

### Acknowledgements

This work was supported by grants PID2019-103972GA-I00 (to M.A.M.) and PID2020-112612GB-I00 (to T.K.) from the Spanish Ministry for Science and Innovation/Agencia Estatal de Investigación 10.13039/501100011033 and grant P18-FR-1621(to T.K.) from the Junta de Andalucía. A.R. was supported by the Ramon y Cajal R&D&i Programme (RYC2019-026481-I) from the Spanish Ministry for Science and Innovation/Agencia Estatal de Investigación /10.13039/501100011033 y FSE 'El FSE invierte en tu futuro'.



**$\sigma^{\text{ECF}}$ -mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the anti- $\sigma$  domain (ASD) of the anti- $\sigma$  factor in the signaling pathway**

Ana Sánchez-Jiménez, Francisco J. Marcos-Torres, and María A. Llamas

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín-CSIC, Granada, Spain.  
[ana.sanchez@eez.csic.es](mailto:ana.sanchez@eez.csic.es), [marian.llamas@eez.csic.es](mailto:marian.llamas@eez.csic.es)

Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections has become a global problem due to its increase resistance to antibiotics. Identification of new molecular targets for antimicrobials is a priority in the fight against this pathogen. Extracytoplasmic function sigma ( $\sigma^{\text{ECF}}$ ) factors depending signalling control many virulence related features of *P. aeruginosa*<sup>1</sup>. These  $\sigma$  factors trigger gene expression in response to specific stimulus by binding to and directing the RNA polymerase (RNAP) to the promoter region of target genes. Activity of most *P. aeruginosa*  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors is controlled through an inhibitory interaction with a membrane embedded anti- $\sigma$  factor. The cytosolic domain of the anti- $\sigma$  factor, called anti-sigma domain (ASD), binds the  $\sigma^{\text{ECF}}$  factor preventing its interaction with the RNAP in absence of the stimulus.  $\sigma^{\text{ECF}}$  factors activation requires the intramembrane proteolysis of the anti- $\sigma$  factor, which results in the liberation of the  $\sigma^{\text{ECF}}$  factor bound to the ASD in the cytosol. While in some  $\sigma^{\text{ECF}}$  factor signalling pathways the ASD is degraded by cytosolic proteases, in others it stays and is required for  $\sigma^{\text{ECF}}$  activity, having thus pro- $\sigma$  activity. The molecular mechanism behind this activity is unknown. To get more insights into the role of the ASD in the signalling pathway, we have analysed the ASD/ $\sigma^{\text{ECF}}$  factor interaction. We have used the *P. aeruginosa* Fox signalling system, which responds to the siderophore ferrioxamine and is composed by the  $\sigma^{\text{FoxI}}$  and FoxR anti- $\sigma$  factor, as model. The FoxR<sup>ASD</sup>/ $\sigma^{\text{FoxI}}$  interaction has been analysed by BATCH two-hybrid system and isothermal titration calorimetry (ITC) after purification of the proteins by affinity chromatography (FPLC). Our results confirm the interaction between the FoxR<sup>ASD</sup> and  $\sigma^{\text{FoxI}}$  factor. By electrophoretic mobility shift assay (EMSA) we are currently analysing the interaction of  $\sigma^{\text{FoxI}}$  and that of the FoxR<sup>ASD</sup>/ $\sigma^{\text{FoxI}}$  to the DNA to determine whether FoxR<sup>ASD</sup> is required for this process. The interaction of the FoxR<sup>ASD</sup>/ $\sigma^{\text{FoxI}}$  complex to the RNAP will be also analysed. Altogether, our analyses will unravel the role of the ASD of anti- $\sigma$  factors with pro- $\sigma$  activity in the  $\sigma^{\text{ECF}}$  factor signalling pathway, which would provide the knowledge required to design strategies to block these circuits and prevents *P. aeruginosa* virulence.

**Acknowledgements:** This work has been funded by the PAIDI-2020 program of Junta de Andalucía/FEDER with project P18-FR-1621.

**REFERENCES:**

1. Otero-Asman, J. R., Wettstadt, S., Bernal, P., & Llamas, M. A. (2019). Diversity of extracytoplasmic function sigma ( $\sigma^{\text{ECF}}$ ) factor-dependent signaling in *Pseudomonas*. *Molecular microbiology*, 112(2), 356–373.



## Definition of the quaternary amines specific sub-family of dCache sensor domains using bioinformatics and wet lab experimentation

Cerna-Vargas, J.P.<sup>1,2</sup>, Gumerov, V.<sup>3</sup>, Monteagudo-Cascales, E<sup>2</sup>, Genova, R<sup>2</sup>, Velando, F<sup>2</sup>, Matilla<sup>2</sup>, M., Zhulin, I<sup>3</sup>, Krell, T<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Madrid, Avenida Complutense 3. 28040, Madrid, España

<sup>2</sup>Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Prof. Albareda 1, 18008 Granada, Spain

<sup>3</sup>Department of Microbiology, The Ohio State University, Columbus, OH 43210

[jp.cerna@upm.es](mailto:jp.cerna@upm.es)

The signals recognized by the large majority of signal transduction receptors is unknown, and their identification currently represents a major research need in microbiology. Sensor domains show a significant degree of sequence divergence, as a consequence of which their ligand specificity is rarely predicted accurately based solely on overall sequence similarities.

We have reported the bioinformatics-based identification of a subfamily of dCache sensor domains that are specific for amino acids (Gumerov et al., 2022). Ligand recognition in this sub-family is primarily mediated by the establishment of hydrogen bonds. The aim of the present study is to determine whether a similar approach permits that identification of sensor domains that recognize hydrophobic signals and to that end we have chosen the binding of quaternary amines (QAs).

Based on three available structures of dCache sensor domains with bound QAs, the conserved residues of the ligand binding pocket were identified. Based on this information, bioinformatic approaches have resulted in the prediction of 8000 QA-responsive dCache domain sequences. We have overexpressed in *E. coli* the individual sensor domain of the QA-responsive chemoreceptor PctD from *Pseudomonas aeruginosa* (Matilla et al., 2022) along with 6 alanine-substitution mutants of amino acids in the binding pocket. Most of these side chains were of hydrophobic nature, confirming the hydrophobic nature protein-ligand interactions. ITC studies showed that these mutants bound choline with a 50- to 350-fold reduced affinity as compared to the native domain. These results assess the contribution of each residue in QA recognition. Using the same approach, we are currently studying QA recognition by ten of the predicted sequences. The identification of QA-responsive targets will allow us to further optimize the bioinformatic prediction algorithm.

An analysis of the isolation source of the organisms that present the predicted QA-binding sensor domains show an overrepresentation of plant and soil-related isolation sources, which is in accordance with the fact that quaternary amines are abundantly present in plant root and seed exudates.

In conclusion, the combined bioinformatics-wet lab approach permits the sequence-based identification of sensor domains that recognize hydrophobic ligands.

### References

Gumerov *et al.* (2022). Proc Natl Acad Sci U S A. DOI: 10.1073/pnas.2110415119

Matilla *et al.* (2022). mBio. DOI: 0.1128/mbio.03458-21



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**The different roles of TasA and CalY in the biofilm formation of *Bacillus cereus***

Ana Álvarez-Mena<sup>1</sup>, Luis Díaz-Martínez<sup>1</sup>, Joaquín Caro-Astorga<sup>1</sup>, Oscar P. Kuipers<sup>2</sup>, Antonio de Vicente<sup>1</sup>, Diego Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Mediterranean and Subtropical Horticulture "La Mayora", Spanish National Research Council–University of Malaga, Boulevard Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071, Málaga, Spain; <sup>2</sup> Department of Molecular Genetics, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, Centre for Synthetic Biology, University of Groningen, Nijenborgh 7, 9747 AG Groningen, The Netherlands

[alvarezmena@uma.es](mailto:alvarezmena@uma.es)

The human pathogen *Bacillus cereus* is responsible of many food poisoning due to the ingestion of contaminated vegetables or processed foods. For the survival and colonization, the bacteria form a biofilm on biotic and abiotic surfaces in which a specific subpopulation differentiates to produce a multifunctional extracellular matrix (ECM), mainly composed by exopolysaccharides, proteins and extracellular DNA. One of the most attractive components of the ECM are the amyloid proteins due to its high tendency to fibrillate and the multifunctional role in the bacterial physiology.

In the *B. cereus* genome there is a specific genomic region that contains two orthologues genes to the *tasA* gene in *Bacillus subtilis*, initially described as essential in the assembly of amyloid fibers, named *tasA* and *calY* respectively. The deletion of these genes gives a different phenotype related with a deficient biofilm formation in both cases. In the *tasA* mutant, the biofilm finally detaches at 72 hours, and the *calY* mutant shows a thinner ring phenotype in comparison with the wild type strain. The gene expression dynamic during the biofilm development reveals that there are three different subpopulations: both genes are expressed, only *calY* or none of them. Furthermore, transcriptomic analysis by RNA-Seq show that the mutants have different changes in the gene regulation and the *calY* mutant is the most affected, with 227 genes deregulated that affect to several important pathways such as the synthesis of extracellular DNA, an important component of the ECM.

The results mentioned above indicate that TasA and CalY might have complementary roles in the biofilm development but also evidence that this physiological process is more complex in *B. cereus* in comparison with the model described in *B. subtilis*.

This work was supported by grants from the National Plan I+D+I of the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2016-78662-R and PID2019-107724GB-I00) and by the European Research Council Starting Grant (BacBio 637971). Ana Álvarez is supported by a PhD fellowship (BES-2017-081275) from the FPI program of the same Ministry.



## **Implicación de la histidina quinasa híbrida HK1635 en la producción de compuestos de interés biomédico en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens***

García-Valero, R., Rodríguez-Carrión, C., Nieto, J.J., Vargas, C., Argandoña M.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla  
[rgarcia5@us.es](mailto:rgarcia5@us.es)

*Chromohalobacter salexigens* es una bacteria halófila usada como modelo en estudios de osmoadaptación, y productora de ectoínas, extremolitos con un gran interés en Biomedicina, por sus propiedades estabilizadoras, antioxidantes o antiinflamatorias (1). El sistema de dos componentes EupK/EupR es clave en la regulación de estos procesos y forma parte de una red de señalización ramificada compleja, de tipo “many to one”, donde, además de EupK, al menos dos histidina kinasas híbridas (HHKs) fosforilan a un mismo regulador de respuesta (RR), EupR. A su vez, EupK podría fosforilar a otro/s RR/s todavía por determinar. Además, se ha observado que las interacciones entre los elementos de esta red dependen de estímulos tales como salinidad, presencia de osmoprotectores (ectoína) o fuente de C (glucosa o ectoína).

En este trabajo se ha estudiado la participación en dicha red de señalización de una HHK adicional, HK1635, mediante su asociación con EupR, así como los estímulos que podrían influir en dicha asociación y la homodimerización de la HK, mediante ensayos de interacción *in vivo* proteína-proteína (BACTH) y fosfotransferencia con P<sup>32</sup>. Nuestros resultados demuestran la interacción funcional de ambas proteínas y la influencia de la ectoína y la salinidad en la misma, así como en la homodimerización.

Por otro lado, se analizó el perfil de crecimiento de un mutante en dicha HK a alta y baja salinidad (0,6 M y 2,5 M de NaCl a 37°C), condiciones de alta y baja producción de ectoínas respectivamente, así como el contenido intracelular de estos solutos mediante LC-MS, con respecto a la cepa silvestre y al mutante *eupR*. Los resultados muestran la implicación de HK1635 en el crecimiento a elevada salinidad cuando la ectoína es la única fuente de carbono, posiblemente a través de EupR. Los perfiles de acumulación de ectoínas observados, en ocasiones superior a la cepa silvestre, respaldan su asociación con EupR en algunas condiciones, pero también sugieren la posibilidad de ejercer su control a través de otro RR. Estos resultados y la presencia de ortólogos únicamente en especies de bacterias halófilas muestran su importancia en el control de la osmoadaptación y el metabolismo de ectoínas.

### **Referencias:**

- Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ, Cánovas M. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv.* 2010; 28(6):782-801

**Financiación:** Proyecto (PID2019-111273RB) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación I00/AEI/10.13039/501100011033. Programa Operativo FEDER 2014-2020 y Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad de la Junta de Andalucía (US-1380847).



## Hacia una visión global del sistema de virulencia PhoPR en el género *Mycobacterium*

Estefanía Crespo Yuste, Juan Calvet Seral y Jesús Gonzalo Asensio

Grupo de Genética de Micobacterias  
Universidad de Zaragoza  
[ecyuste@unizar.es](mailto:ecyuste@unizar.es)

La tuberculosis (TB) se considera históricamente la enfermedad infecciosa más letal y está causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Los miembros del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) son patógenos intracelulares adaptados a sobrevivir en células fagocíticas del hospedador. El sistema PhoPR regula la virulencia de *Mtb* a través de tres circuitos: 1) controla la biosíntesis de lípidos inmunomoduladores como sulfolípido (SL) y di- y poliaciltrehalosas (DAT y PAT), 2) regula la secreción de ESAT-6, considerado uno de los principales factores de virulencia de *Mtb* y 3) regula la secreción de proteínas que incluyen antígenos inmunodominantes de exportación (TAT) (1). Además, actualmente se ha visto que la síntesis y secreción de c-di-AMP están reguladas por PhoPR en *Mtb* (2).

Recientemente, se ha documentado que el gen *phoR* está sujeto a una selección positiva generalizada después de la divergencia del MTBC de su antepasado más reciente conocido (3). Como primer objetivo de este estudio, planteamos confirmar si un conjunto representativo de mutaciones de PhoR bajo selección positiva tiene un impacto en la expresión de los genes regulados por el sistema PhoPR.

Por otro lado, aunque el regulón PhoPR está bien caracterizado en *Mtb*, no existen estudios sobre este sistema en otras micobacterias, como por ejemplo las Micobacterias No Tuberculosas (MNT). Estas micobacterias son patógenos emergentes que afectan a pacientes inmunocomprometidos o inmunocompetentes y la incidencia y prevalencia de la enfermedad pulmonar por las MNT está aumentando significativamente en todo el mundo (4). *Mycobacterium abscessus* y *Mycobacterium avium* son dos MNT de relevancia clínica cuyo sistema PhoPR tiene un grado de conservación del 84% y 91% respectivamente respecto al de *Mtb*. En base a esto, se pretenden abordar dos estudios funcionales: por un lado, el estudio del regulón PhoPR, que se llevará a cabo generando mutantes knock-out PhoPR mediante la técnica basada en recombineering, para posteriormente comparar el transcriptoma de los mutantes *phoPR* con el de la cepa silvestre; y, por otro lado, estudios de replicación de dichos mutantes en macrófagos THP-1 comparados con sus cepas parentales.

1. Broset, E., Martín, C., & Gonzalo-Asensio, J. (2015). Evolutionary landscape of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from the viewpoint of PhoPR: implications for virulence regulation and application to vaccine development. *MBio*, 6(5), e01289-15.
2. Pérez, I., Campos-Pardos, E., Díaz, C., Uranga, S., Sayes, F., Vicente, F., ... & Gonzalo-Asensio, J. (2022). The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR virulence system regulates expression of the universal second messenger c-di-AMP and impacts vaccine safety and efficacy. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 27, 1235-1248.
3. Chiner-Oms, Á., Sánchez-Busó, L., Corander, J., Gagneux, S., Harris, S. R., Young, D., ... & Comas, I. (2019). Genomic determinants of speciation and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Science advances*, 5(6), eaaw3307.
4. Johansen, M. D., Herrmann, J. L., & Kremer, L. (2020). Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(7), 392-407.



## Two-component system MifS/MifR modulate the resistance of $\beta$ -lactams antibiotic in *Pseudomonas aeruginosa* strain.

Kelsey Aguirre Schilder<sup>1</sup>, José Canto Mangana<sup>2,3</sup>, Diego-Ceacero Heras<sup>1</sup>, Fermín Sánchez de Medina<sup>5,6</sup>, Martínez-Augustin O<sup>1,3,4,6</sup> and Abdelali Daddaoua<sup>1,3,4</sup>.

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Pharmacy School, University of Granada, Granada 18011, Spain.

<sup>2</sup> Hospital Poniente, Almería, Spain.

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria (IBS), 18014 Granada, Spain.

<sup>4</sup> Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Center of Biomedical Research, University of Granada, Avda. del Conocimiento s/n. Armilla, 18016 Granada, Spain.

<sup>5</sup> Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada.

<sup>6</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Spain.

[daddaoua@ugr.es](mailto:daddaoua@ugr.es)

*Pseudomonas aeruginosa* is ubiquitously present in the environment and acts as opportunistic pathogen on human, animals and plants. Furthermore, the exhaustion of the intestinal microbiota (dysbiosis) due to prolonged treatment with antibiotics make possible the colonization of the intestinal tract by *P. aeruginosa*. The priority pathogen list published by the World Health Organization (WHO) has classified *Pseudomonas aeruginosa* as the top two critical pathogens, and hence, the development of novel antibacterial strategies to tackle these bacteria is highly necessary. In *Pseudomonas aeruginosa*, the MifR regulator is required for  $\alpha$ -Ketoglutarate transport and biofilm formation, whereas MifS is a sensor kinase that plays a key role in mediating bacteria–host interaction and pathogen dissemination in the host. Herein we report the results which show that MifR and MifS form a two-component system and regulates the expression from the promoters P<sub>ampC</sub> of gene (ampC) involved in beta lactamase activity. Surprisingly, *in vivo* a decrease in expression from this promoter was observed for the mutant deficient in MifR regardless of the presence of effectors which indicated that MifR is a transcriptional activator. In addition, High-throughput ligand screening approaches and Microcalorimetry-based ligand screening of the recombinant MifS ligand-binding domain revealed specific binding of streptomycin (KD = 1  $\mu$ M). Further, in co-cultures with eukaryotic cells  $\Delta$ MifR reduced the secretion of inflammatory cytokines IL-6, and TNF- $\alpha$  while increasing levels of antiinflammatory cytokines IL-10.

Taken together, data suggest that MifR and MifS system could be a pharmacological target to modulate the virulence of *P. aeruginosa* infections and may lead to the development of new therapies.



## Identification of a chemoreceptor for agmatine

Roberta Genova, Elizabet Monteagudo Cascales, Jean Paul Cerna Vargas, Felix Velando, Miguel A. Matilla and Tino Krell

Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain.

[roberta.genova@studenti.unipd.it](mailto:roberta.genova@studenti.unipd.it)

*Pectobacterium atrosepticum* is among the top 10 most relevant bacterial phytopathogens and causes soft rot diseases in many agriculturally relevant crops (1). Strain SCRI1043 has 36 chemoreceptors that are mostly of unknown function and employ 7 different types of sensor domains for chemoeffector recognition. It is the long-term objective of the laboratory to functionally annotate all chemoreceptors of this model strain.

Chemoeffector affinity of full-length chemoreceptors has been shown to be conserved in the individual sensor domains of these receptors. We have overexpressed in *Escherichia coli* the sensor domain of a chemoreceptor with unknown function and have purified the protein by affinity chromatography. Purified protein was submitted to differential scanning fluorimetry based thermal shift assays to screen different Biolog compound arrays for potential ligands. Among the 475 ligands screened, there was a single compound that increased the midpoint of protein unfolding ( $T_m$ ) in a significant manner, namely agmatine that stabilized the sensor domain by 5.9 °C. Subsequently, isothermal titration calorimetry studies revealed that agmatine bound to this domain with negative cooperativity with dissociation constants of 29 and 570  $\mu\text{M}$ . Quantitative capillary chemotaxis assays showed chemoattraction of the wild type strain to agmatine. This receptor has been termed PacG (*Pectobacterium atrosepticum* chemoreceptor G). Agmatine biosynthesis in plants is upregulated upon infection by *P. atrosepticum* (2), suggesting a possible relation to agmatine chemoattraction. Furthermore, the secretion of two agmatine derivatives, *p*-coumaroylagmatine and feruloylagmatine, is enhanced in plants after bacterial infection (3). Binding studies are currently ongoing to determine whether both natural compounds are recognized by the PacG sensor domain. Further studies will reveal whether *P. atrosepticum* performs chemotaxis to these ligands.

To the best of our knowledge this is the first report of an agmatine specific chemoreceptor. Chemoreceptors have been identified that bind and respond to agmatine and related compounds in other species, such as *Pseudomonas aeruginosa* TlpQ or *P. putida* McpU. These receptors employ a dCache sensor domain for ligand recognition. In contrast, PacG belongs to a different receptor family since it harbors a four-helix bundle (4HB) sensor domain, indicative of a convergent evolution of agmatine responsive receptors.

### References

1. Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmund, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
2. Tsers, I.; Gorshkov, V.; Gogoleva, N.; Parfirova, O.; Petrova, O.; Gogolev, Y. Plant Soft Rot Development and Regulation from the Viewpoint of Transcriptomic Profiling. *Plants* 2020, 9, 1176. <https://doi.org/10.3390/plants9091176>
3. Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., & Nishioka, T. (2009). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 230(3), 517–527. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0960-0>





### **Molecular mechanism of the *Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR transcription factor: Influence of heme in NO sensing**

Andrea Jiménez-Leiva<sup>1</sup>, Juan J. Cabrera<sup>1</sup>, María J. Torres<sup>1</sup>, David J. Richardson<sup>2</sup>, Eulogio J. Bedmar<sup>1</sup>, Andrew J. Gates<sup>2</sup>, María J. Delgado<sup>1</sup>, S. Mesa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain

<sup>2</sup> School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, United Kingdom  
[andrea.jimenez@eez.csic.es](mailto:andrea.jimenez@eez.csic.es)

*Bradyrhizobium diazoefficiens* NnrR protein belongs to the NnrR clade of the CRP/FNR family of transcription factors and it is part of the regulatory cascade FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR that induces denitrification genes expression in response to oxygen limitation (microoxia). Concretely, NnrR integrates the nitric oxide (NO) signal required for maximal expression of *norCBQD* genes encoding the nitric oxide reductase (Nor), among other targets. However, the molecular mechanism underlying NO sensing is so far only known for its homologue from *Pseudomonas aeruginosa* named DNR, which bound NO through a ferrous heme cofactor. Here, we aimed to unravel the NO sensing and response mechanisms involved in NnrR-mediated control.

We first demonstrated that NnrR is able to induce *norCBQD* genes expression in response to NO uncoupled of the superimposed FixK<sub>2</sub> control. Next, to determine the possible involvement of heme as cofactor for NnrR, expression of a *norC-lacZ* fusion was analyzed in a *hemN<sub>2</sub>* mutant background, which is defective in heme biosynthesis.  $\beta$ -galactosidase activity values of cells cultivated under microoxia in the presence of NO demonstrated the dependence of heme for NO-mediated induction of the *norCBQD* genes. The heme dependence of NnrR for NO-sensing was also tested *in vitro*. For that purpose, recombinant non-tagged NnrR protein was first titrated with a hemin solution in anoxic conditions and these experiments pointed out that NnrR binds heme in a 1:1 stoichiometry (NnrR monomer:heme). Furthermore, the complete UV-Vis spectra of heme-reconstituted NnrR showed a peak at 411 nm for the ferric form, and a peak at 425 nm for the reduced ferrous derivative, which is compatible with the spectral properties of NnrR-heme binding. Moreover, the ferrous heme:NnrR complex was able to react with NO in anoxic conditions. Finally, we performed a functional mutagenesis of histidine 11, 56 and 156 in NnrR as putative residues involved in heme binding. While H11 was important for *norC*/NorC expression and Nor activity, a H11A/H56A NnrR variant lost affinity for the heme cofactor. Taken together, our results suggest that heme might be the cofactor for NnrR-mediated NO sensing mechanism in *B. diazoefficiens* denitrification being H11 a relevant residue for NnrR function.

This research was funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”, grants AGL2017-85676-R, AGL2015-63651-P, and PID2020-114330GB-I00 and also by PAIDI2020 from Junta de Andalucía, grant P18-RT-1401.



## Chemotaxis to acetylcholine in human and plant pathogenic bacteria

Miguel A. Matilla<sup>a</sup>, Félix Velando<sup>a</sup>, Ana Tajuelo<sup>a</sup>, David Martín-Mora<sup>a</sup>, Wenhao Xu<sup>b</sup>, Victor Sourjik<sup>b</sup>, José A. Gavira<sup>c</sup>, Tino Krell<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain.

<sup>b</sup>Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology and Center for Synthetic Microbiology, Marburg, Germany.

<sup>c</sup>Laboratory of Crystallographic Studies, IACT (CSIC-UGR), Armilla, Spain.

[miguel.matilla@eez.csic.es](mailto:miguel.matilla@eez.csic.es)

Chemotaxis permits bacteria to access nutrients and energy sources, but also to colonize hosts and favourable environmental niches for growth and survival. *Pseudomonas aeruginosa* is an important human opportunistic pathogen that also infects animals and plants, and for which chemotaxis plays a important role in virulence. *P. aeruginosa* has 26 chemoreceptors that stimulate four different chemosensory pathways and research in the last decade has established *P. aeruginosa* as a model bacterium in the field chemosensory pathway signaling. During the course of screening experiments aimed at identifying compounds that serve as both nutrients and chemoattractants, we found that *P. aeruginosa* exhibited strong chemotactic responses to acetylcholine – a central signal molecule in life that acts as the primary neurotransmitter of the peripheral nervous system. Through the use of a series of multidisciplinary strategies, we decipher the molecular mechanisms for acetylcholine chemotaxis in *P. aeruginosa*. Quantitative chemotaxis assays revealed that the chemoreceptor PcpD (PA4633) mediates chemotaxis to acetylcholine. Using microcalorimetry, we demonstrate that the dCache ligand binding domain (LBD) of PcpD binds acetylcholine with an equilibrium dissociation constant of 23  $\mu$ M. In addition, we also found that PcpD-LBD binds choline and, with lower affinity betaine, triggering also chemoattraction. Analogously, we identified in the phytopathogen *Pectobacterium atrosepticum* the chemoreceptor PacA (ECA\_RS10935) that binds choline and betaine, but failed to recognize acetylcholine. To determine the molecular determinants of acetylcholine binding, we solved the crystal structures of PcpD-LBD (in complex with choline and acetylcholine) and PacA-LBD (with bound betaine). We identified a motif in PcpD-LBD that interacts with the acetylcholine tail and that was absent in PacA-LBD. We also show that a number of plant pathogens also perform acetylcholine chemotaxis. To the best of our knowledge, PcpD is the first acetylcholine chemoreceptor. *P. aeruginosa* also responds chemotactically to the neurotransmitters histamine and gamma-aminobutyrate, and future research will determine the role of chemotaxis towards neurotransmitters in virulence processes of this important pathogen.

### References

Miguel A. Matilla, David Martín-Mora, Jose A. Gavira and Tino Krell (2021) *Pseudomonas aeruginosa* as a model to study chemosensory pathway signalling. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 85: e00151-20.

Miguel A. Matilla, Félix Velando, Ana Tajuelo, David Martín-Mora, Wenhao Xu, Victor Sourjik, Jose A. Gavira and Tino Krell (2022) Chemotaxis of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* to the neurotransmitter acetylcholine. *mBio*: e0345821.

### Acknowledgements

This work was supported by grants PID2019-103972GA-I00 (to M.A.M.), PID2020-116261GB-I00 (to J.A.G.) and PID2020-112612GB-I00 (to T.K.) from the Spanish Ministry for Science and Innovation/Agencia Estatal de Investigación 10.13039/501100011033, grant P18-FR-1621 (to T.K.) from the Junta de Andalucía.



## The transcriptional regulator ArgR links cellular arginine pools and c-di-GMP signaling in *Pseudomonas putida* KT2440

María Antonia Molina-Henares<sup>1</sup>, Laura Barrientos-Moreno<sup>1,2</sup>, María Isabel Ramos-González<sup>1</sup>, Manuel Espinosa-Urgel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology and Environmental Protection. Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

<sup>2</sup>National Biofilms Innovation Centre, University of Nottingham, UK  
[nene.molina@eez.csic.es](mailto:nene.molina@eez.csic.es)

Second messengers are intracellular signaling molecules that control the response of cells to environmental and metabolic stimuli. Among them, cyclic diguanilate (c-di-GMP) is a key molecule that influences different physiological and behavioral processes in many bacteria, including motile-to-sessile lifestyle transitions. In some bacterial species, amino acids, and particularly arginine, function as modulators of c-di-GMP turnover, but their mechanisms of action are not well known. In the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas putida* KT2440, both arginine biosynthesis and uptake influence second messenger contents and associated phenotypes. Arginine is not only an environmental signal, but seems to function also as a metabolic indicator. Mutants in the last two genes of the arginine biosynthesis pathway (*argG* and *argH*) show lower c-di-GMP contents than the parental strain, a defect that is partially restored by exogenously added arginine. In bacteria such as *P. aeruginosa* and *E. coli*, arginine metabolism and transport are controlled by the transcriptional regulator ArgR, which had not been characterized in *P. putida*. ArgR acts as a negative regulator of L-arginine synthesis mainly through *argG*, encoding argininosuccinate synthase, and as a positive regulator of L-arginine transport. The promoter of the *argThisQMP* gene cluster is strictly dependent on ArgR, and an *argR* null mutant grows poorly with arginine as the sole carbon or nitrogen source. The mutant displays increased biofilm formation and reduced surface motility, consistent with increased basal levels of c-di-GMP. However, it loses the response to increasing concentrations of exogenous arginine observed in the wild type in terms of c-di-GMP levels. Expression of certain biofilm matrix components, namely the adhesin LapF and the exopolysaccharide Pea, as well as the diguanylate cyclase CfcR, are negatively influenced by ArgR. This effect seems to be indirect, through the alternative sigma factor RpoS. We also show that c-di-GMP modulates expression of ArgR via FleQ, thus establishing a feedback loop between arginine and the second messenger.

This work is funded by grant PID2019-109372GB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033)



## **Bioinformatic prediction and experimental validation of signals recognised by sensor domains in bacterial receptors: the case of amino acid specific dCache\_1AA domain**

Elizabet Monteagudo-Cascales<sup>a</sup>, Vadim M. Gumerov<sup>b,c</sup>, Ekaterina P. Andrianova<sup>b,c</sup>, Miguel A. Matilla<sup>a</sup>, Karen M. Page<sup>d</sup>, Annette C. Dolphin<sup>d</sup>, Tino Krell<sup>a</sup> and Igor B. Zhulin<sup>b,c</sup>.

<sup>a</sup>Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain. <sup>b</sup>Department of Microbiology, The Ohio State University, Columbus, United States. <sup>c</sup>Translational Data Analytics Institute, The Ohio State University, Columbus, United States. <sup>d</sup>Department of Neuroscience, Physiology and Pharmacology, University College London, London, United Kingdom.

[elizabet.monteagudo@eez.csic.es](mailto:elizabet.monteagudo@eez.csic.es)

Bacteria have evolved a large number of signal transduction receptors that are essential for an optimal adaptation to changing environmental conditions. These receptors are typically stimulated by the binding of signals to dedicated ligand binding domains (LBDs). However, the nature of the signals that are recognized by most of sensor domains is unknown and information on receptors' function generally derives from the phenotypic characterization of bacterial mutants. The difficulty to identify the cognate signals is also given by the high degree of sequence divergence between characterized homologous LBDs. Previously, we solved the 3D structures of the LBDs of PctA, PctB and PctC - three amino acid specific chemoreceptors of *Pseudomonas aeruginosa* containing a dCache-type sensor domain - which allowed us to identify the key residues for amino acid binding (1). Here, we report the first study to successfully predict the signals that are recognized by sensor domains. We discovered a subclass of dCache-type LBDs, named dCache\_1AA, that contains a motif that recognizes the amino and carboxyl groups of amino acids ligands. Bioinformatics analyses showed that dCache\_1AA domains are present in thousands of bacterial and archeal receptors, including important clinical and agricultural pathogens. dCache\_1AA domains were identified in all major classes of sensor proteins, including chemoreceptors, histidine kinases, diguanylate cyclases and phosphodiesterases, serine/threonine kinases and phosphatases. To verify our bioinformatics predictions, we purified the individual dCache\_1AA LBDs of a selection of different receptors types from diverse microbial taxonomic groups and conducted biochemical assays based on differential scanning fluorimetry and isothermal titration calorimetry. We found that all the target proteins analyzed bound amino acids. The dCache\_1AA domain was also identified in eukaryotic receptors, indicating that amino acids are central signal molecules throughout the Tree of Life. Our study highlights the power of structural biology and bioinformatics to predict the signals recognized by sensor domains based on amino acid composition of the ligand binding sites. Analogous approaches may be employed to identify the signals of other sensor domain families, which permits to tackle a central bottleneck in understanding signal transduction mechanisms.

### **References**

1. Gavira, J.A., Gumerov, V.M., Rico-Jiménez, M., Petukh, M., Upadhyay, A.A., Ortega, A., Matilla, M.A., Zhulin, I.B., Krell, T. (2020) How bacterial chemoreceptors evolve novel ligand specificities. *mBio*, 11: e03066-19.
2. Gumerov, V.M., Andrianova, E.P., Matilla, M.A., Page, K.M., Monteagudo-Cascales, E., Dolphin, A.C., Krell, T., Zhulin, I.B. (2022) Amino acid sensor conserved from bacteria to human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119: e2110415119.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants PID2019-103972GA-I00 (to M.A.M.) and PID2020-112612GB-I00 (to T.K.) from the Spanish Ministry for Science and Innovation/Agencia Estatal de Investigación 10.13039/501100011033 and grant P18-FR-1621(to T.K.) from the Junta de Andalucía.



## Role of the two-component system CfcA/CfcR in biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* MJL19

Rafael Nisa-Martínez, Manuel Espinosa-Urgel and María Isabel Ramos-González

Department of Biotechnology & Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain

[rafael.nisa@eez.csic.es](mailto:rafael.nisa@eez.csic.es)

*Pseudomonas stutzeri* MJL19 is a rhizosphere-colonizing bacterium isolated from the succulent halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. growing in the salt marshes Salinas Grandes de Santiago del Estero (Argentina). This bacterium promotes seed germination and plant growth under highly saline conditions [1].

CfcA/CfcR is a fundamental two-component system (TCS) in the regulation mediated by c-di-GMP in *Pseudomonas putida*, being a central node in a complex regulatory network connecting environmental signals such as salts with biofilm formation [2]. The CfcR homolog of *P. stutzeri* (CfcR<sup>Ps</sup>) shares 54% identical residues with the *P. putida* counterpart, and conserves the Asp residue predicted to be susceptible of phosphorylation. Two proteins show similarities with the histidine kinase (HK) CfcA, one being 60% identical and containing a CHASE3 domain and the other with lower identity (39%) and a CHASE domain. This latter HK, (CfcF) is encoded by the gene immediately upstream of the *cfcR*<sup>Ps</sup>. CfcF is absent in *P. putida*, leading to the question of comparing the molecular functioning of CfcA/CfcR TCS in both bacteria. Since *cfcR* was previously identified in a transcriptomic analysis as preferentially expressed in rhizosphere populations of *P. putida*, and given that salt concentrations influence its activity through the CHASE3 domain of CfcA, it is of particular relevance to study the functioning of the CfcA/CfcR pathway in a bacterium as *P. stutzeri* MJL19 which confers plant protection to salinity stress conditions.

### References:

- [1] M.J. Lami *et al.*, doi:10.1111/jam.14692
- [2] V G. Tagua *et al.*, doi:10.1111/1462-2920.15891

This study was funded by grant PID2019-109372GB-I00 from MICIN/AEI//10.13039/501100011033 and FEDER 'Una manera de hacer Europa'



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Tse1 mobilized by T6SS of *Pseudomonas* induces sporulation of *Bacillus* via  $\sigma^W$**

Pérez-Lorente, A.I<sup>1</sup>, Molina-Santiago, C<sup>1</sup>, de Vicente, A<sup>1</sup> and Romero, D<sup>1</sup>

1 Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur 31 (Campus Universitario de teatinos), 29071, Málaga, Spain.

[perezlorente@uma.es](mailto:perezlorente@uma.es)

The extracellular matrix and sporulation are defensive mechanisms used by *Bacillus* cells when they interact with *Pseudomonas* strains expressing a type VI secretion system (T6SS). Here, we define Tse1 as the main toxin mobilized by the *Pseudomonas* T6SS that triggers sporulation in *Bacillus*. We characterize Tse1 as a peptidoglycan hydrolase and electron microscopy analysis and the use of diverse chemical probes, let us visualize malfunction of the *Bacillus* cell membrane. By performing RNA-seq and immunocytochemistry analyses, we also delineate the response of *Bacillus* cells to Tse1, which through the coordinated actions of the extracellular sigma factor  $\sigma^W$  and the cytoplasmic histidine kinases KinA and KinB, culminates in activation of the sporulation cascade. We propose that this cellular developmental response is conserved in *Bacilli* to defend against the toxicity of T6SS-mobilized Tse1 effector.

**References:**

Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M. V., Caraballo-Rodriguez, A. M., Petras, D., García-Martín, M. L., Lamon, G., Habenstein, B., Cazorla, F. M., Dorrestein, P. C., & Romero, D. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09944-x>

Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A., & Llamas, M. A. (2017). The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME Journal*, 11(4), 972–987. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.169>

**Acknowledgements:**

This work was supported by grants from an ERC Starting Grant (BacBio 637971), Plan Nacional de I+D+i of the Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107724GB-I00), and Junta de Andalucía (P20\_00479). A.I.P.L. is funded by the program FPU (FPU19/00289) and C.M.S. is funded by the program Juan de la Cierva-Incorporación (IJC2018-036923-I).



## Amino acids as key chemotactic signals in *Pectobacterium atrosepticum* SCR11043

Félix Velando<sup>a</sup>, Tino Krell<sup>a</sup> and Miguel A. Matilla<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain.

[felix.velando@eez.csic.es](mailto:felix.velando@eez.csic.es)

Sensing their environment is crucial for plant-associated bacteria. Both pathogens and mutualistic species need to detect potential hosts by the signals plants produce in the rhizosphere and phyllosphere, and one of the key pathways of bacterial response is chemotaxis that allows bacteria to detect and move towards attractant signals. One of the key signals bacteria detect are amino acids; in fact, the group of amino acid specific chemoreceptors is by far the most populated one (2). This is due to the fact that these compounds can frequently support growth as source carbon and energy source and are precursors for protein synthesis. dCache\_1AA is an specific amino acid sensor domain, that is present in archaea, bacteria and eukaryote (1). ECA\_RS05475 (PacB) is a chemoreceptor coded in *Pectobacterium atrosepticum* genome containing this domain; we show here that it binds 27 different amino acids, resulting in a broad-range profile that is similar to that of the PctA of *Pseudomonas aeruginosa* (3). On the other hand, it can't bind negatively charged amino acids, and aspartate is the strongest attractant for this strain. ECA\_RS08370 (PacC) is the only chemoreceptor of the 36 present in the chemotactic cluster, harboring a Tar domain. As Tar in *Escherichia coli*, we demonstrate it binds aspartate and also another important chemoattractant, asparagine, and is necessary for chemotaxis to these key signals. Surprisingly, it appears as an ancestor of Tsr/Tar, both amino acid sensors present in the well-known chemotactic cluster of *E. coli*. Other lines of evidence for the importance of amino acid sensing in this strain are present here: previously published PacA chemoreceptor (dCache-type Ligand Binding Domain) was found to bind L-proline; furthermore, bioinformatics analyses demonstrate this strain harbors an important set of 85 Solute Binding Proteins (SBPs), of which X are predicted to function as amino acid sensors. Finally, we think combinations of yet uncharacterized chemoreceptors/SBPs are mediating still other amino acid chemotaxis (e. g. L-glutamic) detected in this strain.

From all these results, we highlight the integral role this plant-pathogenic strain has reserved for amino acid sensing and chemotaxis, and expect future work will elucidate its functional role in pathogenesis and virulence.

1. Gumerov VM, Andrianova EP, Matilla MA, Page KM, Monteagudo-Cascales E, Dolphin AC, Krell T, Zhulin IB. 2022. Amino acid sensor conserved from bacteria to humans. Proc Natl Acad Sci U S A 119:e2110415119.
2. Matilla MA, Velando F, Martin-Mora D, Monteagudo-Cascales E, Krell T. 2021. A catalogue of signal molecules that interact with sensor kinases, chemoreceptors and transcriptional regulators. FEMS Microbiol Rev doi:10.1093/femsre/fuab043.
3. Rico-Jimenez M, Munoz-Martinez F, Garcia-Fontana C, Fernandez M, Morel B, Ortega A, Ramos JL, Krell T. 2013. Paralogous chemoreceptors mediate chemotaxis towards protein amino acids and the non-protein amino acid gamma-aminobutyrate (GABA). Mol Microbiol 88:1230-43.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Mapping the interactions in the pig nasal microbiota using a rationally designed microbial consortium

Laura Bonillo, Pau Obregón, Florencia Correa-Fiz, Karl Kochanowski and Virginia Aragón.

IRTA, CReSA

[laura.bonillo@irta.cat](mailto:laura.bonillo@irta.cat) ; [virginia.aragon@irta.cat](mailto:virginia.aragon@irta.cat)

The comprehension of the network of metabolic interactions within the commensal pig nasal microbiota is largely unknown despite its importance. The nasal passage is the main entry route for many respiratory pathogens, and these pathogens need to overcome the nasal microbiota to successfully infect the host. Although recent evidence suggests that metabolic interactions between pathogens and commensal microbiota play a key role in determining pathogens' ability to colonize the host, this interaction network is only poorly understood. Current efforts to close this knowledge gap are hampered by a lack of methods to systematically map interactions between microbiota members. In this context, defined microbial consortia are emerging and invaluable tools for the elucidation of microbial interactions. However, to date such consortium has not been defined for nasal microbiota.

In this study we developed the first defined consortium of the nasal microbiota, using the pig as our model system. To assemble a consortium that reflects the microbial composition found *in vivo*, we followed a two-step approach. First, using a comprehensive set of *in vivo* microbiome samples taken from piglets across various commercial farms, we identified eight genera with high relative abundance and prevalence in the nasal microbiota. Second, we selected a representative strain isolated from healthy piglet within each of the genus.

*In vitro* growth experiments showed that the members of the consortia have distinct growth patterns across a wide range of cultivation media, which were typically conserved across different isolates representing the same species. Moreover, co-cultivation experiments using liquid and surface-growth cultures revealed prevalent and condition-dependent metabolic interactions between the members of the consortium, such as the positive impact of some of the species on the growth of the opportunistic pathogen *Glasserella parasuis*. These results highlight the importance of metabolic interactions in the shaping of the nasal microbiota.

Overall, the defined microbial consortium developed constitutes a valuable resource for mapping the network of metabolic interactions of the microbiota under experimentally controlled *in vitro* conditions and paves the way for the development of new antimicrobial metabolic interventions to combat respiratory pathogens in pigs.





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Tell me what you eat and I will tell you how your microbiota evolves**

Tanja Dapa<sup>1</sup>, Ricardo S Ramiro<sup>2</sup>, Miguel F Pedro<sup>3</sup>, Isabel Gordo<sup>1</sup>, Karina B Xavier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156 Oeiras, Portugal

<sup>2</sup> InnovPlantProtect, 7350-999 Elvas, Portugal

<sup>3</sup> LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, Instituto Superior de Agronomia, 1349-017 Lisbon, Portugal

[tanja.dapa@gmail.com](mailto:tanja.dapa@gmail.com)

Misbalances in the taxonomic composition of the gut microbiota (dysbiosis) have strong consequences for the health of the host. In Western societies, a common cause of gut dysbiosis is the switch from a diet low in fat and rich in fibers and plant polysaccharides to a diet rich in saturated fat and simple sugars, so-called Western-style diet. This switch affects the microbiota composition, causing an increase in Bacillota (formerly known as Firmicutes) and a decrease in Bacteroidota (formerly known as Bacteroidetes), and prompts a prevalent Bacteroidota, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to consume host mucus glycans. This causes a reduction of the thickness of the mucosal layer, increasing dysbiosis and sensitivity to colonization by pathogens. Although the effects of such dietary changes on microbiota composition are well documented, their putative impact in gut bacterial evolution remained unexplored. Here we followed the emergence of mutations in *Bacteroides thetaiotaomicron*, a prevalent fiber-degrading microbiota member, upon colonization of the murine gut under different dietary regimens. We show that different nutritional diets do not only affect gut microbiota at ecological level, but as well affect single species, at the gene level. *Bacteroides thetaiotaomicron* evolved rapidly to the gut and Western-style diet selected for mutations that promote the degradation of mucin-derived glycans. Periodic changes in diet led to fluctuations in the frequency of such mutations and were associated with metabolic shifts, resulting in the maintenance of higher intra-species genetic diversity compared to constant dietary regimens. These results show that dietary changes leave a genetic signature in microbiome members and suggest that *B. thetaiotaomicron* genetic diversity could be a biomarker for dietary differences among individuals.



## Correlación entre la expresión de genes de la raíz de olivo y sus comunidades microbianas asociadas

Fernández-González, A. J.<sup>1</sup>, J. A. Ramírez-Tejero<sup>2</sup>, M. Nevado-Berzosa<sup>2</sup>, F. Luque<sup>2</sup>, J. Mercado-Blanco<sup>3</sup>, M. Fernández-López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Soil and Plant Microbiology, Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

<sup>2</sup>Dept. Experimental Biology, Centro de Estudios Avanzados en Olivar y Aceites de Oliva, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain

<sup>3</sup>Dept. Crop Protection, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Campus 'Alameda del Obispo' s/n, Avd. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain

[antonio.fernandez@eez.csic.es](mailto:antonio.fernandez@eez.csic.es)

Las estadísticas de producción alimentaria y agricultura de FAOSTAT indican que alrededor de 10,5 millones de hectáreas están dedicadas al cultivo del olivo en todo el mundo. El 98% de la superficie cultivada se localiza en la cuenca mediterránea, creando un agroecosistema de gran relevancia. El olivo es un icono del mediterráneo que tiene fuertes impactos económicos, sociales y ecológicos en España. La selección multilocal entre aceitunas silvestres y cultivadas ha generado una gran cantidad de variedades disponibles.

Las condiciones ambientales y agroclimáticas de un cultivo tienen un impacto significativo en las plantas y en las comunidades microbianas que conviven con ellas. En este estudio se detallan **por primera vez las relaciones que se establecen entre la expresión de genes en el sistema radicular del olivo y las comunidades microbianas asociadas al mismo**. El estudio se centra en dos grupos de olivos cultivados en la misma finca. Hemos observado que ambos grupos presentan un perfil microbiano muy distinto habitando el interior de sus raíces. Siendo la proporción del género mayoritario (*Actinophytocola*) el rasgo distintivo entre dichos grupos. Esta divergencia se correlaciona con diferencias en los perfiles de expresión génica entre los dos grupos. De hecho, se observaron interacciones significativas entre 32 genes diferencialmente expresados (DEGs) y 19 "especies microbianas" (OTUs). Además, **muchos de estos genes** están relacionados con un **papel protector de respuesta a estreses**. En concreto, **dos genes** relacionados con la **defensa de la planta** a través de su **actividad antifúngica** mostraron una **interacción** fuerte y positiva con *Actinophytocola*.

El conocimiento sobre el vínculo entre las comunidades microbianas asociadas al olivo y el crecimiento, desarrollo y adaptación a las limitaciones bióticas de este árbol es todavía muy fragmentario. Este estudio ofrece una visión de la comunicación que existe entre el sistema radicular del olivo y la microbiota que habita en su interior. Estrategias como la abordada permitirán conocer mejor el estado de salud, desarrollo y adaptación de las plantas, así como la contribución de su microbiota ante un determinado escenario medioambiental. Los resultados abren una puerta para llevar a cabo nuevas estrategias de recuperación y mejora de los cultivos.

Fernández González, A. J.; Ramírez-Tejero, J. A.; Nevado Berzosa, M.; Luque, F.; Fernández López, M. & Mercado Blanco, J. (2021) Coupling the endophytic microbiome with the host transcriptome in olive roots, Computational and Structural Biotechnology Journal, Volume 19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.035>



## Analysis of toxin-antitoxin systems in mobile genetic elements of *Anabaena* sp. PCC 7120

Alicia Segura-Mejías<sup>a</sup> and Rocío López-Igual<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), Universidad de Sevilla and CSIC, Sevilla, Spain

[aliciasegura265@gmail.com](mailto:aliciasegura265@gmail.com)

Toxin-antitoxin (TA) systems are genetic modules widespread among bacterial genomes. Among TA-systems, Type II consists on an operon which encodes 2 proteins: a growth-inhibiting toxin, and its cognate antitoxin that blocks toxin effect. Among other functions, one role attributed to type II TA-systems is to stabilize mobile genetic elements (MGEs) through a post-segregational killing mechanism.

Cyanobacteria are the only prokaryotes able to perform oxygenic photosynthesis playing a major role in the primary productivity of Earth. They are promising tools for biotechnological purposes, but their genome instability is one of the reasons that is curbing the breakthrough. In bacteria, MGEs increase instability but bring novel functions that can be adaptive. The filamentous and heterocysts-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, is characterized by a large and complex genome that includes 6 plasmids, and a plethora of predicted MGEs and TA modules. We aim at identifying predicted TA-systems of *Anabaena* and clarify their role in the stabilization of DNA elements.

First, we have analyzed the genome by using different bioinformatic tools looking for TA-genes and found numerous candidates showing homology with TA-systems within the six plasmids and three DNA rearrangements (*nifD*, *hupL* and *fdxN*)<sup>1</sup> that are excised from the chromosome of *Anabaena* during heterocyst differentiation. We have developed a method to identify the functionality of the predicted TA-systems by heterologous expression in *Escherichia coli*. In our design, TA-genes have been uncoupled and cloned independently into compatible plasmids under the control of different promoters. This method allowed us to identify 5 different type II TA-systems: two of them encoded into the excisable elements of *hupL* y *fdxN*, and the other three in plasmids. We have demonstrated also in *E. coli* their bacteriostatic or bacteriolytic effect. To highlight, we have realized that each system present individual behavior such as toxicity level or antitoxin stability. Currently, we are testing their possible role in stabilization of DNA-elements and constructing mutants of the toxin in order to delete these MGEs. Our final goal is to erase the accessory genome of *Anabaena* in order to construct a lab-strain for the green-chassis biotechnological revolution.

### References:

(1) Hilton, J. A., Meeks, J. C. & Zehr, J. P. Surveying DNA elements within functional genes of heterocyst-forming cyanobacteria. PLoS One 11, 1–15 (2016).

### Acknowledgments

Funding:

- Grant PID2019-104784RJ100 MCIN/AEI/10.13039/501100011033 Spain

- Programa Operativo de Empleo Juvenil (marco del Fondo Social Europeo, FSE), Universidad de Sevilla (Reference: EJ5-62) to ASM.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Genomic characterization of *Listeria* spp. isolated from dairy ruminants using WGS

Carla Palacios-Gorba, Alexandra Moura, Yuval Markovich, Nathalie Tessaud-Rita, Ángel Gómez-Martín, Hélène Bracq-Dieye, Jesús Gomis, Guillaume Vales, María Pastor-Martín, Pierre Thouvenot, Carles Escrig, Alexandre Leclercq, Marc Lecuit\*, Juan J. Quereda\*

Universidad CEU-Cardenal Herrera, Institut Pasteur Paris  
[juan.quereda@uchceu.es](mailto:juan.quereda@uchceu.es), [marc.lecuit@pasteur.fr](mailto:marc.lecuit@pasteur.fr)

Listeriosis is a zoonotic disease that can cause, septicemia, central nervous system and materno-fetal infections. Two species of *Listeria* are considered pathogenic, *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. Most of clinical isolates are of dairy products origin. Ruminants can be asymptomatic carriers of *Listeria* spp. in their feces, but little is known about the genetic diversity and virulence molecular determinants of this pathogen in cattle feces, tonsils, and udders.

Here we conducted a large-scale longitudinal study to monitor *Listeria* spp. in 19 ruminant farms during three consecutive seasons ( $N = 3251$  samples). In addition, we looked for *Listeria* spp. in feces, tonsils, and udders of 316 dairy ruminants ( $N = 948$  samples). All isolates were sequenced using whole-genome sequencing. In the longitudinal study in dairy farms, *L. monocytogenes* and *L. innocua* were the most prevalent *Listeria* spp. in both dairy ruminants' feces and farm-associated environments. CC1 and CC4 *L. monocytogenes* clones, which are hypervirulent and among the most common *L. monocytogenes* CCs responsible for human infections, represented 30% of the *L. monocytogenes* isolates, and these CCs were mostly obtained from host-associated samples (ruminant feces) rather than farm environment. *Listeria* pathogenic islands LIPI-3 and LIPI-4 were present in 50% (65/130) and 32.3% (42/130) *L. monocytogenes* isolates. Furthermore, we show that ruminants can be asymptomatic carriers of pathogenic *L. ivanovii* in udders, and *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* in tonsils in the absence of fecal shedding. The non-pathogenic species *L. innocua* was only detected in feces samples. These studies highlight that dairy farms may constitute a reservoir for hypervirulent *L. monocytogenes* and the need for monitoring pathogenic *Listeria* spp. in domestic dairy ruminants.

This work was supported by Generalitat Valenciana (AICO/2021/278) and by the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2019-110764RA-I00, Ramon y Cajal RYC-2018-024985-I, J.J.Q.) (PID2020-119462, AGM), Institut Pasteur, Inserm, and Santé Publique France (ML). C. Palacios-Gorba and Yuval Markovich are supported by a predoctoral contract from the Universidad Cardenal Herrera-CEU.



## Disentangling the effects of segregational drift and mutational supply on plasmid evolution

Ramiro-Martínez, P<sup>1</sup>, Jaraba, L<sup>1</sup>, Rodríguez-Beltrán, J<sup>12</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS

<sup>2</sup> CIBER enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC)

[paularamiromartinez@gmail.com](mailto:paularamiromartinez@gmail.com)

Plasmids are autonomously replicating DNA molecules that stably coexist with chromosomes in bacterial cells. These genetic elements provide an important source of genetic diversity, playing a fundamental role in bacterial ecology and evolution by, for instance driving the spread of antibiotic resistance genes. As plasmids are typically kept at several copies per cell, it has been suggested that they evolve faster than chromosomes, as mutation rate per gene should increase with plasmid copy number. However, segregation of plasmid copies to daughter cells is random, creating an additional layer of genetic drift—known as segregational drift—that might delay plasmid evolution. The interplay between plasmid mutational supply and segregational drift determines the evolutionary rate of plasmid-encoded genes, yet the relative contribution of these opposite forces in plasmid evolution is a matter of controversy.

Mutation accumulation experiments impose extreme population bottlenecks of only one cell, therefore minimizing selection and maximizing genetic drift. Crucially, the genetic changes present in independently evolved individuals after a known number of generations can be used to estimate the underlying mutation rate. Here we developed an experimental system based on a plasmid with tunable copy number, and performed a mutation accumulation experiment to quantify the relative contribution of increased mutational supply and segregational drift on plasmid evolution. Thirty-six lines of a hypermutator strain carrying low, medium, or high-copy number versions of the same plasmid were allowed to accumulate mutations during ~700 generations of evolution. Whole-genome sequencing of the resulting clones revealed hundreds of mutations in both the plasmid and the chromosome. By comparing plasmid and chromosomal mutation rates, we disentangle the effects of segregational drift and mutational supply on plasmid evolution. Together, our results shed light on the forces that shape plasmid-mediated evolution in bacteria and contribute to explain the extreme prevalence of plasmids across the bacterial phylogeny.



## Deleting the *Vibrio cholerae* superintegron as a tool for the study of chromosomal integrons

Paula Blanco<sup>1,2</sup>, Filipa Trigo da Roza<sup>1,2</sup>, Ester Vergara<sup>1,2</sup>, Alberto Hipólito<sup>1,2</sup>, Lucía García-Pastor<sup>1,2</sup>, Céline Loot<sup>3</sup>, Didier Mazel<sup>3</sup>, José Antonio Escudero<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Molecular Basis of Adaptation, Dpt. de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

<sup>2</sup> VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Unité Plasticité du Genome Bactérien, Institut Pasteur, Paris, France.

[pablanca@ucm.es](mailto:pablanca@ucm.es)

Integrons are genetic platforms that serve as a memory of adaptive and interchangeable functions for bacteria. Mobile integrons are well known for their role in antimicrobial resistance, but chromosomal integrons (CIs) have influenced bacterial evolution for aeons. Despite their importance, the study of CIs is blocked by the interference between them and the genetic tools commonly used to study integrons. *Vibrio cholerae*, the causative agent of Cholera, contains in its second chromosome the paradigm of CI, a 126-kb long superintegron (SI) with 179 gene cassettes that is highly stabilised by 18 toxin-antitoxin (TA) systems.

In this project, we aim to obtain a *V. cholerae*<sub>ΔSI</sub> strain to unblock the field of study of CIs, allowing to address fundamental aspects of integrons, such as the functions that they encode. We have developed SeqDeITA (sequential deletion of TA systems), an approach based on natural competence and homologous recombination that allows to erase integron fragments through sequential allelic replacements.

Using this methodology, we have obtained for the first time a *V. cholerae*<sub>ΔSI</sub> mutant. Sequencing revealed the presence of mutations that rose during the deletion process. We corrected all mutations and verified again the ΔSI strain through short and long read genome sequencing. We are currently characterizing this corrected strain to reveal the impact of the SI in *V. cholerae*'s physiology. Marker Frequency Analysis (MFA) revealed a general conservation of chromosome replication dynamics and phenotypic characterization of *V. cholerae*<sub>ΔSI</sub> using Biolog microarrays showed that this mutant presents a unaltered growth behaviour in 2.000 different substrates. We are currently complementing our characterization with transcriptomics, fitness competitions and infection experiments using *Caenorhabditis elegans*. Interestingly, these assays reveal that *V. cholerae*<sub>ΔSI</sub> is more virulent than the wildtype strain and we are now mapping this phenotype to individual gene cassettes. The *V. cholerae*<sub>ΔSI</sub> strain is a breakthrough in the field of CIs that will serve us, and others, to explore a variety of aspects of integrons that have been yet inaccessible.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Comparative transcriptomics of model strains ATCC 14028 and 4/74 of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

Ángela Mérida-Floriano<sup>1</sup>, [Francine Piubeli](#)<sup>2</sup>, Rocío Canals<sup>3</sup>, Will P. M. Rowe<sup>4</sup>, Karsten Hokamp<sup>5</sup>, Alistair C. Darby<sup>6</sup>, Jay C. D. Hinton<sup>6</sup>, Josep Casadesús<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Universidad de Sevilla

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

<sup>3</sup> GSK Vaccines Institute for Global Health, Siena

<sup>4</sup> Institute of Microbiology and Infection, University of Birmingham

<sup>5</sup> Department of Genetics, School of Genetics and Microbiology, Trinity College Dublin

<sup>6</sup> Institute of Integrative Biology, University of Liverpool

[piubeli@us.es](mailto:piubeli@us.es)

Most research on *Salmonella* Typhimurium biology has been performed on a limited set of pathogenic *S. Typhimurium* laboratory strains, especially ATCC 14028 and SL1344. Both strains are often used as interchangeable; however, a careful comparison of their virulence-related traits is lacking. Here we analyze the transcriptomic landscape of *S. Typhimurium* strain ATCC 14028 grown in lysogeny broth (LB) to early stationary phase (ESP), a widely used condition in *Salmonella* Typhimurium studies. For this purpose, the ATCC 14028 genome was re-annotated. Comparative transcriptomics of ATCC 14028 and previously published ESP data on strain 4/74, the ancestor of SL 1344, revealed that the strains share conserved patterns of expression in 90% of their genomes.

**Funding:** BIO2016-75235-P, FEDER US-1254118, PID2020-116995RB-I00



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Species- and strain-level assessment of bacterial communities through nanopore-based sequencing targeting nearly-full ribosome RNA genes**

Alfonso Benítez-Páez

Host-Microbe Interactions in Metabolic Health Laboratory. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). 46012 Valencia, Spain.

[abenitez@cipf.es](mailto:abenitez@cipf.es)

The partial sequencing of the 16S rRNA gene, using one or two hypervariable regions, is the conventional method to assess microbial communities. Despite its low cost, it remains limited to offer enough taxonomy resolution to define host-microbe interactions unambiguously. By contrast, long-read sequencing strategies, permitting nearly-full sequencing of 16S rRNA gene, show better performance to resolve the composition of such complex ecological niches at the species-level despite their issues of per-base accuracy on output DNA reads. The multi-locus and long-amplicon method to survey *rrn* regions was explored to discriminate species and detect strain variation in microbial communities, fundamental issues to trace microbes across related environments. Concatenated and nearly-full 16S and 23S rRNA genes were amplified from human fecal DNA and sequenced through MinION Mk1b and R9.5 chemistry. Reconstruction of *rrn* regions was completed with a strand-wise and bait-assisted approach. Long-read pile-up, followed by hidden Markov models, were accommodated to detect single-nucleotide variations (SNVs). A collection of *rrn* regions was assembled from the human intestinal microbiota to gain representation of the species present in this widely studied environment in a reference database (*rrn\_DB*). SNVs associated with strain-level variation were predicted in a species-specific manner across *rrn* regions. The clinical application of this method was tested by the estimation of species and strain engraftment during fecal microbiota transplantation (FMT). Engrafting and co-occurrence of strains between donors and recipients after FMT was corroborated by Sanger sequencing of the SNVs unveiled. Although modest in the per-base accuracy of reads, the long-amplicon sequencing provides strain-level resolution to assess microbial communities. Unlinked *rrn* genes in some bacterial species challenge the widespread application of this method. However, it gives a cost-effective approach, alternative to metagenomics, for taxonomy surveys at the species and strain levels in human-associated samples.





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **Metagenomic insights into microbial consortia degrading emerging pollutants**

Zaki Saati-Santamaría, Jorge Rodríguez-Grande, Maitane Juárez-Mugarza, Pilar Navarro-Gómez, Amando Flores and Inés Canosa

Universidad Pablo de Olavide, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC, Junta de Andalucía, 41013 Seville, Spain  
[icanper@upo.es](mailto:icanper@upo.es)

In recent years, the presence of emerging pollutants in the environment has become a major problem for the world's population. Many microorganisms have historically been isolated for their ability to biodegrade persistent molecules, but studies have focused on the use of pure bacterial cultures. The use of microbial biodegrading consortia has several advantages, including exploiting the metabolic potential of both culturable and non-culturable microorganisms, which may be actively participating in the biodegradation process. Secondly, it is also relevant to consider those micro-organisms that may not be participating in this process, but may be providing the necessary conditions for other bacteria that contain the biodegradation pathways to express them more efficiently (e.g. by removing metabolic intermediates that may be toxic or inhibit the kinetics of the biodegradation pathway). On the other hand, the presence of many microbial species favours horizontal transfer and exchange of genetic information, in the presence of a selective pressure such as the presence of the emerging contaminant. By successive enrichments of sites with high concentrations of pharmaceuticals such as naproxen and ibuprofen, our research group has isolated a series of microbial consortia capable of using these drugs as their sole source of carbon and energy. To understand the microbial mechanisms underlying the biodegradation of these drugs we performed both shotgun metagenomes and metabarcoding (16S rRNA gene) analyses from these consortia. Based on this, we unravel the major taxa of the microbial communities and their key functions. This work will help to develop new strategies in bioremediation and to understand the ecology of drug-contaminated environments.

This work has been carried out as part of two Master's thesis and with funding from the Ayudas Puente para la Concurrencia al Plan Estatal de I+D from the Plan Propio de Investigación from UPO



### Characterisation of Type IV CRISPR/Cas-carrying plasmids in *Klebsiella* spp.

F. Javier Fernández-Favieres<sup>1</sup>, Carlos Serna<sup>1</sup>, Marta M. Dolcet-Negre<sup>1</sup>, Mario Pulido-Vadillo<sup>1</sup>, Natalia Montero<sup>1</sup>, Riccardo Rosselli<sup>2</sup>, Francisco JM Mojica<sup>3</sup>, Bruno Gonzalez-Zorn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Antimicrobial Resistance Unit (ARU), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria y Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

<sup>2</sup> R&D Department, Labaqua S.A., Alicante, España

<sup>3</sup> Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, España; Instituto Multidisciplinar para el Estudio del Medio, Universidad de Alicante, Alicante, España  
[javierffavieres@gmail.com](mailto:javierffavieres@gmail.com)

As opposed to other known CRISPRs, type IV is hypothesised to be a mechanism involved not in protection for the bacterium, but as a tool for the competition between plasmids. *Klebsiella pneumoniae* is a highly relevant pathogen listed as an ESKAPE due to its multidrug resistance and virulence. A more precise understanding of type IV's role could shed some light into how it affects the exchange of plasmid-carried antimicrobial resistance (AMR) genes in such a significant pathogen. In this study we sought to characterise the plasmids carrying type IV CRISPR in the *Klebsiella* genus.

Plasmid sequences were obtained from the PLSDB database. Results were filtered for circular plasmids, to ensure they were complete. CRISPRCasTyper was used to locate and identify CRISPR-Cas loci. After filtering for *Klebsiella* spp., MOB-suite was utilised to find out size, mobility and incompatibility group of the plasmids. Finally, MLST and abricate were employed to recover sequence type (ST) and AMR genes, respectively.

The most common incompatibility group was a hybrid IncFIB,IncHI1B; followed by different combinations of IncFIB with other groups. Plasmids were large, ranging from 175 to 500 kb and almost exclusively mobile. A strong bias was found towards STs 147, 14 and 11, which are considered pandemic. Resistance against a wide variety of antibiotics was uncovered, mostly streptomycin, sulphonamides and macrolides, among many others.

These results tell us that type IV CRISPR-carrying plasmids in the *Klebsiella* genus are large, mobile plasmids, belonging to IncFIB and other related groups. These plasmids are present in pandemic strains, as evident from their STs, and carry many AMR genes. These results bring out type IV CRISPR as a tool that could be used by antimicrobial resistance-carrying plasmids to ensure their persistence in bacteria and promote the dissemination of resistant qualities.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### Efecto del manejo agrícola sobre el microbioma de la raíz de olivo

Fernández-López M.<sup>1</sup>, N. M. Wentzien<sup>1</sup>, A. J. Fernández-González<sup>1</sup>, P. J. Villadas<sup>1</sup>, A. Valverde-Corredor<sup>2</sup>, J. Mercado-Blanco<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y la Planta, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, calle Profesor Albareda 1, 18008, Granada, Spain, [manuel.fernandez@eez.csic.es](mailto:manuel.fernandez@eez.csic.es)

El cultivo del olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) constituye un agroecosistema excepcional, siendo España el país que concentra el 25% del total de olivos y produciendo más del 37% del aceite de oliva mundial. Los factores agronómicos y genéticos del olivar, además de los climáticos y pedológicos, tienen un notable impacto sobre la composición, estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas que residen en el suelo que sustenta este cultivo. El conocimiento adecuado de la microbiota asociada al sistema radicular del olivo, es crucial para entender la influencia que ejercen sobre el desarrollo y salud de la planta huésped.

El objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de distintos tipos de manejo agrícola sobre las comunidades microbianas de la raíz (tanto endosfera como rizosfera) de olivo. Se seleccionaron 2 olivares contiguos sometidos a 2 manejos distintos: i) Cultivo tradicional (TM) y ii) Cultivo orgánico (MA). El olivar TM se cultivó con la adición de herbicidas, plaguicidas, etc. mientras que el MA recibió tratamientos con estiércol, sin la aplicación de fitosanitarios. En cada parcela se tomaron muestras de 12 olivos, todos de la variedad Picual. De cada árbol se analizó su comunidad procariótica y fúngica, tanto rizosférica como endofítica, mediante una estrategia de secuenciación del ADN extraído PE300 con MiSeq. Las secuencias se procesaron con un programa propio (ver <https://nuriawm.github.io/micro4all/>), también disponible como un paquete de R (micro4all). Además, se analizaron las redes de co-ocurrencia microbiana con la herramienta on-line MENAP. Nuestros resultados mostraron una mayor diversidad fúngica en la rizosfera MA. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la comunidad bacteriana rizosférica, ni tampoco en la fúngica ni bacteriana de la endosfera. Sí se vieron diferencias a nivel de la diversidad  $\beta$  entre endo y rizosfera y entre bacterias y hongos. Las redes de co-ocurrencia mostraron que el microbioma de TM tenía unas relaciones más estrechas (menor distancia geodésica) en ambos compartimentos con mayores conexiones positivas. A nivel taxonómico, destacar que en la endosfera predominó el phylum fúngico Ascomycota y el bacteriano Actinobacteria, siendo el género *Actinophytocola* el 20,20% (MA) y el 18,40% (TM) del total de secuencias.



## I2 domain is not essential for the ancestral function of integrases

Lucía García-Pastor<sup>1,2</sup>, Alberto Hipólito<sup>1,2</sup>, Francisco Manuel Ojeda-García<sup>1,2</sup>, Filipa Trigo da Roza<sup>1,2</sup>, Ester Vergara<sup>1,2</sup> and José Antonio Escudero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

<sup>2</sup> VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

[lucgar25@ucm.es](mailto:lucgar25@ucm.es)

Integrases are genetic platforms capable of capturing, storing and modulating the expression of new genes encoded in integron cassettes. Integron integrases are a distinct type of tyrosine-recombinase that can recombine double-stranded sites in the platform (*attI*) and single-stranded sites in cassettes (*attC*). Integrases are an example of evolutionary innovation because they have acquired a 19 residue-long domain (I2), to recognize and recombine the ss-*attC* sites in cassettes. I2 is not present in any other Y-recombinase, and it has been shown to be essential for integrase activity.

It was recently shown that integrases conserve a weak *bona fide* ancestral activity when forced to recombine exclusively ds-DNA (*attI* x *attI* reaction)<sup>1</sup> an activity that can impact plasmid stability and fitness<sup>2</sup>. The possibility of delivering reactions in which none of the substrates is ss-DNA raises the question of whether the I2 domain is intrinsically essential in integrases or only in reactions involving ss-*attC* sites.

To address this question, we have sequentially removed the I2 domain in an integrase hyperactive for *attI* x *attI*<sup>3</sup>. We have then measured the ancestral (*attI* x *attI*) and modern activities (*attC* x *attC*; *attC* x *attI*) of the 19 mutants. Modern activities (with ss-DNA partners) drop drastically (3 logs) in these mutants after losing 4 residues, as expected by the role of I2. Nevertheless, the loss of ancestral (ds-) activity is gradual and is still detected after deleting up to 16 amino acids (85%) of the domain. Our data shows that the I2 domain is not essential for the ancestral function of integrases. In this work we have taken integron integrases beyond the point of evolutionary innovation (the acquisition of I2), obtaining active proteins with the sequence of an integron integrase yet the structure of a canonical Y-recombinase.

### References:

- <sup>1</sup> Escudero, J. et al.(2016). Unmasking the ancestral activity of integron integrases reveals a smooth evolutionary transition during functional innovation. *Nature communications*, 7, 10937.
- <sup>2</sup> Celia Souque et al (2022). Off-target integron activity leads to rapid plasmid compensatory evolution in response to antibiotic selection pressure. *bioRxiv* 2022.04.29.490043.
- <sup>3</sup> Escudero, J et al. (2020). Primary and promiscuous functions coexist during evolutionary innovation through whole protein domain acquisitions. *eLife*, 9, e58061.



## **Modular system for constructing plasmids and analysis on their stability in filamentous cyanobacteria**

Alicia Segura-Mejías<sup>1</sup>, Rafael Salas-Aparicio<sup>1</sup>, Ignacio Luque<sup>1</sup> and Rocío López-Igual<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC and Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.  
[rocio.lopez@ibvf.csic.es](mailto:rocio.lopez@ibvf.csic.es)

Plasmids are mobile genetic elements that contain their own replicons. In addition to their intrinsic capability to carry genetic information essential in bacterial evolution and adaptation, plasmids are key tools in synthetic biology and biotechnology. Due to their autotrophic metabolism, cyanobacteria have been long regarded as interesting organisms for biotechnological purposes, such as the production of renewable fuels. However, the repertoire of genetic tools for genome engineering in cyanobacteria is underdeveloped in comparison with heterotrophic bacteria. More precisely, the scarcity of genetic tools such as replicative plasmids in cyanobacteria, is curbing the development of this field.

In order to accelerate genetic engineering, we have developed a modular system, inspired in a previous approach (1), to construct plasmids for the filamentous multicellular cyanobacterium *Anabaena*. Combinations of parts yielded a number of plasmids containing replication or integration modules, neomycin (Nm) or streptomycin/spectinomycin (Sm/Sp) resistance cassettes, and a *gfp* reporter placed under a constitutive promoter that was used to monitor their fate by fluorescence. Integrative plasmids were based on a novel recombination platform of the *Anabaena* chromosome and showed a homogeneous GFP signal along the filaments. On the other hand, replicative plasmids that were based on two different replicons: pDU1 and the broad-host origin RSF1010, showed an irregular distribution of GFP in cells along the filament, indicating a variable plasmid copy number. A short variant of pDU1 plasmid (pDU1s) showed an enhanced uneven distribution, suggesting increased instability along the filament. Besides, otherwise identical plasmids based on RSF1010 containing distinct resistance cassettes showed unexpected differences in stability depending on the antibiotic used for selection (ie. Nm or Sm/Sp). Furthermore, a single plasmid bearing both resistance cassettes showed different stability depending on the antibiotic. Although further analyses are currently ongoing to elucidate the relation between plasmid stability and antibiotic resistances, some observations indicate that survival under Nm selection requires a lower plasmid copy number than under Sm/Sp selection. Finally, our study on plasmid stability in *Anabaena* constitutes an unprecedented approach about these mobile genetic elements in filamentous bacteria.

### **References:**

(1) Taton, A., *et al.*, 2014. Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 42, 1–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gku673>

### **Acknowledgments**

Funding:

- Grant PID2019-104784RJ100 MCIN/AEI/10.13039/501100011033, Spain.
- Programa Operativo de Empleo Juvenil (marco del Fondo Social Europeo, FSE), Universidad de Sevilla (Reference: EJ5-62) to ASM.



## **Explorando la diversidad genómica de sedimentos de la laguna de Fuente de Piedra: buscando bacterias productoras de metabolitos secundarios de interés.**

Sophie-Marie Martirani-Von Abercron, Patricia Marín & Silvia Marqués

Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada  
[silvia@eez.csic.es](mailto:silvia@eez.csic.es)

Los lagos salinos y alcalinos son sistemas interesantes como modelo para los estudios sobre diversidad microbiana y funciones ecosistémicas en ambientes extremos. Estos ecosistemas han sido una fuente valiosa de nuevos microorganismos económicamente importantes para procesos industriales, biotecnológicos y ambientales, y se siguen investigando nuevas aplicaciones de interés [Oren, 2010]. La exploración de la biodiversidad como fuente de nuevas moléculas bioactivas se ha restringido sobre todo a comunidades planctónicas de ambientes acuáticos, ignorando sistemáticamente la microbiota de los sedimentos, dominadas por comunidades anaerobias. Las bacterias anaerobias son prácticamente ubicuas y son también portadoras de operones para la síntesis policétidos por policétidos sintetasas (PKS) y sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) [Shabuer et al 2015, Letzel et al 2013]. Estos operones podrían ser las dianas que nos permitirán la selección de bacterias con mayor probabilidad de producir moléculas de interés.

Nuestra investigación se ha centrado en muestras de agua y sedimento procedentes de la laguna atalashalina de Fuente de Piedra (Málaga, España). Hemos generado y analizado 5 metagenomas para prospección de la presencia de genes PKS y NRPS. Se han encontrado 1101 agrupaciones génicas (cluster) para la síntesis de metabolitos secundarios. El 29% de los clústeres encontrados está relacionado con la producción de terpenos, seguidos por péptidos ribosómicos modificados post-traduccionalmente (24%), NRPS (13%), T3PKS (8%) y T1PKS (1%). Los clústeres de síntesis de metabolitos secundarios de mayor tamaño se encontraron en el primer centímetro de sedimento, poniendo de manifiesto la importancia de este entorno sujeto a grandes fluctuaciones ambientales. Hemos ensamblado 83 genomas a partir de los metagenomas (MAGs, Metagenome-assembled genomes), de los cuales 30 son de alta calidad, abarcando más de 17 phyla dominados por *Bacteroidota*, *Proteobacteria* y *Desulfobacterota*, y 48 de calidad media. Un análisis detallado de los MAGs, nos permitió identificar al menos 3 candidatos portadores de grandes clústeres de síntesis de interés (>10kb): *Pirellulaceae sp.*, una *Planctomycetota*, *VMDJ01sp.*, una *Flavobacteraceae*, y *Kiritimatiellae sp.* una *Verrucomicrobiota*. Los tres organismos pertenecen a grupos taxonómicos con pocos representantes cultivados. El análisis de metagenomas podría resultar especialmente útil como aproximación para la identificación de organismos portadores de clústeres NRPS/PKS con buen potencial de ser asequibles mediante cultivos selectivos específicos, y así alcanzar microorganismos poco accesibles de interés biotecnológico.

### **Referencias**

- [1] Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol.* 2010;31(8-9):825-834. doi:10.1080/09593330903370026
- [2] Shabuer G, Ishida K, Pidot SJ, Roth M, Dahse HM, Hertweck C. Plant pathogenic anaerobic bacteria use aromatic polyketides to access aerobic territory. *Science.* 2015;350(6261):670-674. doi:10.1126/science.aac9990
- [3] Letzel AC, Pidot SJ, Hertweck C. A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world. *Nat Prod Rep.* 2013;30(3):392-428. doi:10.1039/c2np20103h

### **Agradecimientos**

Financiado por FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades-Agencia Estatal de Investigación/ RTC-2017-6605-1 y BIO2017-82242-R.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## El análisis de pangenomas bacterianos ilumina la materia oscura de los sistemas CRISPR-Cas

Alejandro Rubio, Maximilian Sprang, Maria Eugenia Pachón-Ibáñez, Jerónimo Pachón, Miguel A. Andrade-Navarro, Andrés Garzón, Antonio J. Pérez-Pulido

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo y Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide [ajperez@upo.es](mailto:ajperez@upo.es) y [agarvil@upo.es](mailto:agarvil@upo.es)

Los sistemas CRISPR-Cas son módulos de inmunidad adquiridos por transferencia horizontal en bacterias. Están compuestos por genes denominados de forma genérica como *cas* y por una serie de secuencias llamadas espaciadores, provenientes de entradas previas de ADN exógeno, principalmente elementos genéticos móviles como fagos y plásmidos. En 2017 se estableció lo que se denominó la materia oscura de los CRISPR, en referencia al origen desconocido del 90% de los espaciadores, los cuales no se parecen a ninguna secuencia conocida.

La era genómica permite ahora analizar miles de genomas bacterianos, construyendo pangenomas útiles para estudiar el genoma accesorio de una especie dada. Nuestro grupo ha analizado computacionalmente cerca de 70.000 genomas de seis especies bacterianas pertenecientes al grupo ESKAPE, de interés en clínica. Realizando pangenomas de estas especies, ha encontrado que las 2 especies grampositivas de este grupo (*Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*) presentan sistemas CRISPR-Cas en sólo el 1% de sus genomas, mientras que en las gramnegativas este número se acerca al 50% en algunas de las especies (*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*).

Utilizando *machine learning*, hemos buscado los genes que aparecen frecuentemente asociados a los sistemas CRISPR-Cas, encontrando que un significativo número de ellos codifican para proteínas de membrana. Estas proteínas forman parte, por ejemplo, de sistemas de resistencia a diferentes tipos de estrés. Además, algunas de ellas son conocidas por actuar como receptores de bacteriófagos, por lo que hipotetizamos que las bacterias que los presentan podrían necesitar sistemas CRISPR-Cas para controlar la infección del fago. Esta hipótesis fue validada al estudiar los profagos y espaciadores presentes en estas cepas bacterianas.

Adicionalmente, gracias a la gran cantidad de genomas analizados, pudimos reducir drásticamente la materia oscura de los CRISPR del 90% a casi un 20% en tres de las especies analizadas, lo que demuestra que el estudio de pangenomas permite un mayor conocimiento de sus sistemas CRISPR-Cas.

En la actualidad, estamos analizando en detalle las secuencias reconocidas por los espaciadores de los diferentes tipos de sistemas CRISPR-Cas, habiendo encontrado una interesante relación con los llamados fago-plásmidos, fagos que bajo determinadas circunstancias permanecen como elementos extracromosómicos.

### Agradecimientos:

Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-114861GB-I00) y Fondo Regional Europeo y Conserjería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía (PY20\_00871).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Heterogeneidad fenotípica en el superintegrón de *Vibrio cholerae*

Amalia Prieto Nieto<sup>1,2</sup>, Lucía García-Pastor<sup>1,2</sup>, José Antonio Escudero<sup>1,2</sup>

MBA lab, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria UCM

[amaliapr@ucm.es](mailto:amaliapr@ucm.es)

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

<sup>2</sup> VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense de Madrid. Spain.

*Vibrio cholerae*, el agente causante del cólera, posee en su segundo cromosoma una región de 126 kb conocida como *Superintegrón* (SI), una plataforma genética capaz de captar, almacenar y reorganizar genes codificados en pequeños elementos móviles denominados *cassettes*. Como todos los integrones, el SI consta de una región variable formada por una extensa colección de 179 *cassettes*, y una región estable compuesta por la integrasa (*intI*), el sitio de integración (*attI*) y los promotores de la integrasa y los *cassettes* ( $P_{int}$  y  $P_c$  respectivamente).

La integrasa cataliza la integración y escisión de los *cassettes* en el superintegrón. Su expresión está regulada principalmente por la respuesta SOS. Así, en ausencia de estrés, LexA se une a una secuencia adyacente al  $P_{int}$  y bloquea la expresión de la integrasa. En este trabajo hemos estudiado la expresión de la integrasa, a nivel de células individuales, y hemos detectado heterogeneidad fenotípica, ya que existe expresión en un porcentaje de la población (30-40%) en ausencia de estrés, dando lugar a la formación de dos subpoblaciones bacterianas:  $P_{int}^{ON}$  y  $P_{int}^{OFF}$ . Esta expresión disminuye, pero no desaparece cuando se inactiva la regulación mediada por el sistema SOS (en mutantes *lexA<sub>ind</sub>* y *recA*) a 37°C, indicando una posible regulación de la expresión independiente del sistema SOS. Hemos estudiado también la expresión de la integrasa de otras especies del género *Vibrio*, y observamos la existencia de un patrón común en superintegrónes de otras especies.

La expresión heterogénea de la integrasa tiene importantes implicaciones en la biología de los integrones y en la adaptación bacteriana. Si bien es sabido que en presencia de estrés los integrones se activan para generar adaptación a demanda, aquí demostramos que en su ausencia, también generan variabilidad genética y, por lo tanto, heterogeneidad fenotípica en una parte de la población.





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### The black sheep: dividing in a non-canonical way

Elena Rivas-Marín, David Moyano-Palazuelo, Damien P. Devos

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo-CSIC, Pablo de Olavide University, Seville, Spain  
[erivmar@upo.es](mailto:erivmar@upo.es)

Most bacteria divide using a mechanism called binary fission based on the interaction between a multiprotein complex, the divisome, and the peptidoglycan biosynthesis machinery. The assembly of the divisome is initiated through the polymerization of filaments of the eukaryotic-tubulin homologue FtsZ, that determines the division site, and hierarchically recruits the proteins involved. In non-spherical bacteria, an additional complex is also required, the elongasome, which incorporates peptidoglycan precursors into the existing one ensuring cell shape maintenance. The components of both complexes are conserved and essential in most known bacteria.

Planctomycetes bacteria are fascinating for their peculiar biology, being cell division one of their most remarkable particularities. Although the lower branching orders, "*Candidatus* Brocadiales" and *Phycisphaerales*, divide by apparently binary fission, the *Planctomycetales* order divides by asymmetric division, similar to eukaryotic budding. However, all members of the *Planctomycetes* lacks FtsZ that is almost universally present in bacteria and also in most archaea.

Genomic analyses of members of the *Planctomycetes* have revealed that most of the genes that are associated with the *dcw* (division and cell wall) cluster present an irregular pattern of presence/absence among the members of the group indicating that the divisome and elongasome might have diverged (1, 2). Initially we described that at least three proteins from these complexes are not essential in the rod shape Planctomycete *Planctopirus limnophila*, which divides by budding. Specifically, the FtsI and FtsW divisome proteins and the MreB elongasome protein. In contrast, the FtsK DNA pump is necessary as in the rest of bacteria (3).

Planctomycetes, therefore, challenge the universality of the deduced concepts of typical model organisms and require a broader vision for the study of their cell biology. To deepen in this conundrum and give a broad view about the essential genes involved in cell division we applied transposon-directed insertion site sequencing. Our results clearly demonstrate that, apart from the initially reported proteins, most of the canonical peptidoglycan synthesis and bacterial cell division proteins are not essential in *P. limnophila*, dividing therefore by an unknown mechanism, highlighting the novel biology present in this bacterial phylum.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Comprobación del genotipo de especies leñosas y dinámica estacional de las comunidades bacterianas de la rizosfera**

Lasa, A.V.<sup>1</sup>, M.A Guevara<sup>2</sup>, P.J. Villadas<sup>1</sup>; M.D. Vélez<sup>2</sup>, A.J. Fernández-González<sup>1</sup>; N. de María<sup>2</sup>, M. López-Hinojosa<sup>2</sup>, M.T. Cervera<sup>2</sup>, M. Fernández-López<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dept. Soil and Plant Microbiology, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

<sup>2</sup>Dept. Forest Ecology and Genetics, Centro de Investigación Forestal, INIA-CSIC, Carretera de La Coruña Km 7,5, 28040 Madrid, Spain

[ana.vicente@eez.csic.es](mailto:ana.vicente@eez.csic.es)

El cambio climático está amenazando la supervivencia de los bosques mediterráneos, por ejemplo, los pinares de la especie *Pinus pinaster*. Esta especie ha sido empleada tradicionalmente como especie modelo en estudios funcionales y evolutivos debido a su respuesta adaptativa a situaciones cambiantes. Si bien se están estudiando sus mecanismos de tolerancia a la sequía, poco se sabe sobre las comunidades microbianas que habitan en sus raíces. Un aspecto fundamental en los estudios de la microbiota rizosférica es garantizar que las muestras de raíz son tomadas de los árboles seleccionados. Por ello, en este trabajo se genotiparon tanto las acículas de árboles tipo de una población localizada en la Sierra de Oria (Almería), como las raíces de las que se tomaron muestras de suelo rizosférico, en primavera y verano. Además, se analizaron las diferencias en cuanto a diversidad, perfiles taxonómicos y la asociación de las comunidades procariontas de la rizosfera de los árboles seleccionados entre las estaciones de primavera y verano, a nivel de DNA y RNA.

Para más de un 50% de los árboles analizados se encontraron discrepancias en los genotipos, y en tres casos ni tan siquiera pudo ser determinada la especie vegetal. Las comunidades bacterianas de la rizosfera resultaron homogéneas en cuanto a diversidad y estructura independientemente del genotipo del hospedador, tanto en primavera como en verano. Sin embargo, pudieron apreciarse diferencias estacionales en términos de diversidad, perfiles taxonómicos y asociación de las poblaciones bacterianas, tanto a nivel de DNA como de RNA. Si bien las comunidades bacterianas formaron redes de co-ocurrencia más complejas en primavera, estas resultaron más compartimentalizadas en verano, sugiriendo que las comunidades se encontraban sometidas a estrés. Además, en la red relativa al verano y correspondiente a las comunidades potencialmente activas (RNA) se detectó un *keystone hub* perteneciente al género *Phenylobacterium*.

Nuestros resultados podrían reflejar el estado futuro de las comunidades bacterianas en un contexto de cambio climático. A su vez, demuestran que es crucial validar el origen de las muestras tomadas en los estudios sobre la microbiota de las plantas, de tal forma que se puedan llevar a cabo análisis ecológicos más fiables.

**Financiación:**

El presente trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto BIOLIMITS, PID2019-106283RB-I00) y por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad [AGL2015-66048-C2-1-R; RTI2018-098015-B-I00].



## Exploring the aggregation potential of RepA-WH1 domains from *Xylella fastidiosa* plasmids

Lucero, L., Giraldo, R

National Centre for Biotechnology (CNB-CSIC)

[llucero@cnb.csic.es](mailto:llucero@cnb.csic.es)

*Xylella fastidiosa* is an emerging bacterial plant pathogen affecting a broad range of woody crops and ornamental plants [1]. Its pathogenesis relies on the formation of biofilms within the host xylem vessels, with a subsequent production of tyloses as a defence response, both plugging and impeding the sap to flow up to the apical tissues. This translates into drying and subsequent death of the whole plant [2,3]. The vector of the bacterial pathogen is a hemipteran insect [3]. Several approaches have been developed trying to combat *X. fastidiosa*; some regard the insect vector (use of insecticides, viruses, natural competitors), whereas others focus on the diseased plant (pruning, removal, replacement with resistant and tolerant cultivars, and cold shock) or the bacterium (phages, metals, antibiotics, polyphenols) [2], up to date with little success. Having a long experience in the use of a pro-amyloidogenic variant of the WH1 domain of the *Pseudomonas* pPS10 plasmid RepA as an endogenous cytotoxic antibacterial [5], in our group we want to tackle *X. fastidiosa* by promoting an amyloid proteinopathy using its own Rep proteins, homologous to that in pPS10 RepA. Two *X. fastidiosa* ssp. *pauca* and *multiplex* WH1 domains in the Rep proteins were expressed in *Escherichia coli* as a host model. We have been able to promote two different types of aggregative stages of the Rep-WH1 proteins within the bacterial cytoplasm: a diffused and a polar foci/ aggregated phenotype. Depending on the protein expressed, bacteria changed in shape, from elongated to coccoid-like, possibly reflecting interference with cell growth and division. Once the behaviour of both Rep proteins are fully characterized, the forthcoming step will involve their expression into a *X. fastidiosa* host model to recapitulate the aggregative pro-amyloidogenic behaviour previously observed in *E. coli*. The long range aim of this work is the creation of a transgenic *X. fastidiosa* Trojan horse that is able to trigger and spread an amyloid disease within its relatives infecting a plant host.

1. Sicard, A., et al. (2018). *Xylella fastidiosa: Insights into an emerging plant pathogen*. Annual Review of Phytopathology, 56: 181-202.
2. Bucci, E. (2018). *Xylella fastidiosa, a new plant pathogen that threatens global farming: Ecology, molecular biology, search for remedies*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 502: 173-182.
3. Baccari, C., and Lindow, S. (2010). *Assessment of the process of movement of Xylella fastidiosa within susceptible and resistant grape cultivars*. The American Phytopathological Society, 101 (1): 77-84.
4. Newman, K., Almeida, R., Purcell, A., and Lindow, S. (2003). *Use of a Green fluorescent strain for analysis of Xylella fastidiosa colonization of Vitis vinifera*. American Society for Microbiology, 69(12): 7319-7327
5. Giraldo, R. (2020). *SynBio and the boundaries between functional and pathogenic RepA-WH1 bacterial amyloids*. American Society for Microbiology, 5(3): 1-11.



## ***Pseudomonas putida* KT2440 type VI secretion systems mediate adaptation to the rhizosphere**

David Vázquez-Arias<sup>1</sup>, Cristina Civantos<sup>2</sup>, David Durán<sup>1</sup>, Patricia Bernal<sup>2</sup>, Rafael Rivilla<sup>1</sup> & Marta Martín<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin, 2, 28049 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla. Spain.

[david.vazquez@uam.es](mailto:david.vazquez@uam.es)

The Type VI secretion system (T6SS) is a bacterial nanomachine involved in interbacterial competition. Attacking T6SS<sup>+</sup> bacteria release toxins inside prey cells, inhibiting the growth and/or killing competitors in a contact-dependent manner, providing fitness advantages. The biocontrol agent *P. putida* efficiently uses the T6SS as a mechanism to protect plants from deleterious phytopathogens<sup>1</sup>. The strain KT2440 encodes three type VI secretion systems (K1-, K2- and K3-T6SS) but only the K1-T6SS has been proved to be functional and to have antibacterial activity up to date<sup>1</sup>. Here, we study the functionality of the K2- and K3-T6SSs by testing the capacity of single, double and triple T6SS mutants to kill different preys in competition assays. The triple mutant was less competitive than the mutant lacking only the K1 system but only if the prey was a plant pathogen and not a lab strain. This data indicates that the K2- and/or K3-T6SS might be active in *P. putida* natural niches in the presence of real competitors. An increasing number of studies are showing the relevance of T6SS to modulate complex polymicrobial communities, especially in the gut<sup>2</sup>. Here, we study the role of *P. putida* T6SSs in shaping microbial communities in its habitat, the rhizosphere. First, we investigate the capacity to colonise the rhizosphere of tomato plants growing in agricultural soil by the wildtype and the T6SS mutants as previously reported<sup>3</sup>. Secondly, we analysed the microbiome present in the rhizosphere of these plants inoculated with the aforementioned strains. We observed that all T6SS mutants have a lower capacity to colonise the rhizosphere when compared to the wildtype strain. In accordance with that, the Principal Component Analysis (PCA) of the tomato plants microbiota showed two clearly differentiated groups. On one hand, the microbiota of plants inoculated with the wildtype strain that it is able to outcompete foes in a T6SS dependent-manner; on the other hand, the microbiota of plants inoculated with the T6SS mutants unable to do that. These results suggest that the T6SSs of *P. putida* are functional in the rhizosphere, in the presence of competitors, modulate this polymicrobial community and are instrumental for *P. putida* colonization of the plant roots.

1. Bernal P, *et. al.*, ISME Journal, 2017

2. Allsopp L. P. *et. al.*, Cellular Microbiology, 2020

3. Durán D, *et. al.*, Scientific Reports, 2021

This work has been funded by Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades FEDER/EU Grant RTI2018-093991-B-I00 and FEDER18-1264962 Junta de Andalucía/Universidad de Sevilla. David Vázquez Arias was granted by FPI-UAM program (SFPI/2021-00458).



## Funciones de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en bacterias que interactúan con plantas

A. Casas-Román, M. J. Lorite, S. Muñoz, M.T. Gallegos, J. Sanjuán

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

[juan.sanjuan@eez.csic.es](mailto:juan.sanjuan@eez.csic.es)

Existe una gran diversidad de microorganismos que interactúan con plantas. Estas interacciones pueden ser beneficiosas, como la simbiosis de leguminosas con rizobia, caracterizada por su capacidad de fijar nitrógeno molecular. Pero también existen interacciones patogénicas, en las que microorganismos afectan la salud de la planta y representan una amenaza para la producción de alimentos, como el caso de *Pseudomonas syringae*. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima presente en casi todos los organismos con función principal en el metabolismo de la glucosa. Además, ha sido descrita como proteína *moonlighting* o multifunción, involucrada en diversos procesos biológicos en procariotas y eucariotas. En la simbiosis rizobio-leguminosa, la GAPDH vegetal ha sido encontrada asociada a la membrana de simbiosomas, mientras que en el caso de *Pseudomonas* se ha sugerido que esta proteína pudiera tener un rol específico en la virulencia (Emerich & Krishnan, 2014; Elkhalfi *et al.*, 2014).

Para determinar la importancia de la GAPDH en estos microorganismos se han construido y caracterizado mutantes por delección del gen o genes codificantes para esta enzima en la cepa CFN42 de *Rhizobium etli* (Ret) y en *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto) DC3000. El mutante *gap<sup>-</sup>* de Ret presenta importantes déficits de crecimiento y solo es capaz de crecer normalmente cuando se le proporciona simultáneamente una fuente de carbono glucolítica y otra gluconeogénica. Además, en simbiosis solo es capaz de formar nódulos pequeños con capacidad de fijación de nitrógeno muy reducida en raíces de judía (*Phaseolus vulgaris*). En el caso de Pto la bacteria presenta 2 parálogos diferentes de esta proteína. Un mutante *gap1<sup>-</sup>* presenta un déficit de crecimiento en sustratos metabolizados por la vía glucolítica, mientras que un mutante *gap2<sup>-</sup>* no es capaz de crecer con sustratos gluconeogénicos. El doble mutante *gap1/gap2<sup>-</sup>* sólo es capaz de crecer cuando se le proporciona simultáneamente un sustrato de cada tipo. Respecto al fenotipo infeccioso en tomate (*Solanum lycopersicum*) los mutantes *gap2<sup>-</sup>* y *gap1/gap2<sup>-</sup>* presentan un fenotipo deficiente, mas acusado en el doble mutante, mientras que *gap1<sup>-</sup>* se comporta como la cepa silvestre. Los resultados obtenidos sugieren que GAPDH está implicada en diferentes aspectos en ambas bacterias, tanto metabólicos como de interacción con las respectivas plantas hospedadoras.

Elkhalfi, B., Serrano Delgado, A., Soukri, A., 2014. Identification of an extracellular infection- induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the phytopathogenic proteobacterium *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 201-208.  
Emerich, D.W., Krishnan, H.B., 2014. Symbiosomes: temporary moonlighting organelles. *The Biochemical Journal* 460, 1–11.

Trabajo financiado por los proyectos AEI BIO2017-83533-P y CSIC 2021AEP136. A. C-R disfruta de un contrato predoctoral para la formación de doctores (AEI).



## ***Pseudomonas putida* KT2400 como posible agente de control biológico frente a *Xylella fastidiosa***

María Pilar Velasco-Amo<sup>1</sup>, Cristina Civantos<sup>2</sup>, Carlos Quiles-Pando<sup>1</sup>, Jaime López-Alcalá<sup>3 4</sup>, Paula Tomás-Viejo<sup>1 5</sup>, Blanca B. Landa<sup>1</sup> y Patricia Bernal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones Científicas IAS-CSIC. 14004 Córdoba.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Universidad de Córdoba, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba

<sup>4</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III

<sup>5</sup>Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla

[mpvelasco@ias.csic.es](mailto:mpvelasco@ias.csic.es)

*Xylella fastidiosa* (*Xf*) es una bacteria de cuarentena en la UE que puede infectar más de 650 especies vegetales, y causar enfermedades en cultivos de gran interés agrícola como la vid, el almendro y el olivo, entre otros. Las estrategias de prevención son fundamentales para el control de *Xf*, incluyendo la detección y erradicación precoz de plantas infectadas y la reducción de las poblaciones de los insectos vectores, ya que hasta la fecha no existe ningún método de control post-infección. *Pseudomonas putida* (*Pp*) KT2400 es un agente de biocontrol que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento o provocar la muerte de bacterias fitopatógenas mediante un sistema de secreción de tipo VI (T6SS). Estudios anteriores han demostrado que *Pp* KT2400 puede usar estos sistemas para matar diferentes fitopatógenos como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, perteneciente a la misma familia *Xanthomonadaceae* de *Xf*, o *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, fitopatógeno que infecta olivo al igual que *Xf*.

En este estudio, hemos evaluado el comportamiento de *Pp* KT2400 en presencia de bacterias fitopatógenas en cámaras microfluídicas. Estas cámaras están compuestas de canales con flujo de medio que simulan los nichos naturales de *Xf* (vasos del xilema de plantas y aparato bucal de los insectos vectores de *Xf*). Para ello, se han optimizado ensayos de competición en las cámaras usando, en primer lugar, *X. campestris* pv. *campestris*, y *P. savastanoi* pv. *savastanoi* como presas del agente de biocontrol. Estos ensayos muestran que independientemente del estado celular en el que se encuentren los patógenos (planctónico o biofilm), existe una fuerte disminución de sus poblaciones en presencia de *Pp* KT2400. Los estudios de competición *in vitro* entre *Xf* y *Pp* KT2400 señalan la capacidad del agente de biocontrol de eliminar este fitopatógeno usando el T6SS. El siguiente paso será validar los resultados en las cámaras microfluídicas e *in planta* a fin de determinar el potencial uso de *Pp* KT2400 como agente de biocontrol de *Xf*.

Financiado por Beca Leonardo-Fundación BBVA (2021), Proyecto E-RTA2017-00004-C06-02 de AEI-INIA y la Plataforma Temática Interdisciplinar SolXyl de *X. fastidiosa* y el Proyecto Intramural 201840E111 del CSIC.



### **Metilasas y metilación en la regulación génica de *Pseudomonas syringae***

Mancera-Miranda, L<sup>1</sup>, López-Pagán, N<sup>1</sup>, Gutiérrez-Pozo, G<sup>2</sup>, Spröer, C<sup>3,4</sup>, Bunk, B<sup>3,4</sup>, Sánchez-Romero, MA<sup>2</sup>, Ruiz-Albert, J<sup>1</sup>, Beuzón C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Malaga, Spain.

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>3</sup>Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

<sup>4</sup>German Centre of Infection Research DZIF, Braunschweig, Germany

[lauramm@uma.es](mailto:lauramm@uma.es)

La metilación del ADN llevada a cabo por metilasas no asociadas a enzimas de restricción, conocidas como metilasas huérfanas, es un mecanismo epigenético ampliamente extendido en bacterias y archeas. La especificidad de motivos y los patrones de metilación de las metilasas huérfanas sugieren su participación en la regulación génica y en la replicación del ADN [1]. En *E. coli* y en *Salmonella*, este mecanismo se ha asociado a la regulación del inicio de la replicación, la reparación de errores del ADN y la transcripción. En poblaciones clonales de dichas especies, la metilación del ADN también está implicada en la aparición de heterogeneidad fenotípica, con una fuerte implicación en virulencia [2]. Sin embargo, poco se sabe del papel de la metilación en *Pseudomonas syringae*. *P. syringae* es una importante bacteria fitopatógena, responsable de una gran variedad de enfermedades de plantas y con un alto impacto en la producción agrícola a nivel mundial. Esta bacteria también se usa frecuentemente como modelo para el estudio de las interacciones planta-patógeno [3]. Con el objetivo de descifrar la importancia de la metilación en *P. syringae*, nuestro grupo decidió abordar la caracterización de este mecanismo epigenético en dicho patógeno. Para ello, se han estudiado las metilasas identificadas en *P. syringae* y se ha establecido su metiloma. Con respecto al metiloma, hemos identificado diversos motivos de metilación.

[1] Blow M. *et al.*, 2016. PLoS Genet, 12(2), 1-28.

[2] Adhikari S. and Curtis P.D., 2016. FEMS Microbiol. Rev., 40(5), 575-591.

[3] Xin X. *et al.*, 2018. Nat. Rev. Microbiol., 16(5), 316-328.



## **Fengycin and the amyloid TsaA of *Bacillus subtilis* stimulates the growth and immunization of plants by targeting the seed storages**

María Victoria Berlanga Clavero, Carlos Molina Santiago, Luis Díaz Martínez, Alejandro Pérez García, Antonio de Vicente y Diego Romero.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga. Avenida Louis Pasteur 49, 29010, Málaga.  
[mvictoriaberlanga@uma.es](mailto:mvictoriaberlanga@uma.es)

Beneficial microbes are known to stimulate the germination of the seeds; however, the exact mechanisms mediating these interactions are only beginning. *Bacillus subtilis* is a commonly detected member of the plant holobiont and provides multifaceted traits to the plant health. In this work, we demonstrated that *B. subtilis* triggered genetic and physiological responses in seeds that resulted in changes in the metabolic and developmental status of adult plants.

A multidisciplinary approach based on microscopy, transcriptomics and metabolomics demonstrated that the chemically diverse extracellular matrix of *Bacillus* structurally cooperate in bacterial colonization of the seed storage tissues. The amyloid protein TsaA and fengycin, two components of the extracellular matrix, differentially stimulated levels of ROS inside seeds after imbibition and targeted the oil bodies of the seed endosperm, provoking specific changes in lipid metabolism or accumulation of glutathione-related molecules that resulted in two different plant growth programs: the development of seed radicles or major growth and immunization of adult plants. Our findings prove the versatility of the bacterial ECM in establishing a mutualistic interaction with plants.

This work was supported by ERC Starting Grant (BacBio 637971), Plan Nacional de I+D+I of Ministerio de Economía y Competitividad and Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2016-78662-R and PID2019-107724GB-I00), Programa Operativo FEDER Andalucía (UMA18-FEDERJA-055) and Ayudas a Proyectos I+D+I Programa PAIDI 2020 of Junta de Andalucía (P20\_00479). M.V.B.C. received an FPU contract (FPU17/03874) from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### Improvement of *Bacillus velezensis* UMAF6639 as a biocontrol agent

Montserrat Grifé-Ruiz, Jesús Hierrezuelo, David Vela-Corcía, Alejandro Pérez-García, Antonio de Vicente, Diego Romero.

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga e Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC)  
[montsegrife@uma.es](mailto:montsegrife@uma.es)

The need to implement sustainable agricultural models has led to the search for alternatives to deal with different plant diseases, with the use of biocontrol agents being one of the most versatile options. A clear example of these agents are the strains belonging to the *Bacillus velezensis* group, Gram-positive bacteria capable of colonizing the different structures of plants and synthesizing a variety of compounds with various activities, ranging from growth promotion to antagonism against to different phytopathogens due to the synthesis of molecules such as lipopeptides (surfactins, fengycins and iturins) among others.

Previous studies carried out in our research group have shown how the *B. velezensis* UMAF6639 strain has a great biocontrol capacity in plants belonging to the *Cucurbitaceae* family, derived mainly from the production of lipopeptides.

The objective of this work focuses on the genetic improvement by random mutagenesis of said strain to obtain mutants with greater antimicrobial activity. Once the derivatives with the greatest antimicrobial activity have been identified, their characterization is being carried out to determine the genetic changes that justify the increase in their biocontrol capacity, as well as the changes in the production profile of secondary metabolites, implementing genomic and metabolomic tools to decipher the different mechanisms responsible for the antagonistic activity of these strains.

This work has been supported by contract 8.06/60.4086 financed by the biotechnology company KOPPERT B.V. (The Netherlands).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Interacción positiva entre la planta del trébol y la bacteria *Novosphingobium* sp. HR1a en el contexto de la rizorremediación.**

Lázaro Molina, Ana Segura

Estación Experimental del Zaidín, CSIC

[lazaro.molina@eez.csic.es](mailto:lazaro.molina@eez.csic.es)

La rizorremediación está basada en la capacidad de ciertos microorganismos de metabolizar nutrientes de los exudados de plantas y de cometabolizar o mineralizar contaminantes ambientales tóxicos.

*Novosphingobium* sp. HR1a es una bacteria capaz de degradar una amplia variedad de compuestos aromáticos policíclicos (PAHs), debido que posee los genes involucrados dicha degradación. Esta cepa se establece en microcosmos sembrados con trébol con una densidad celular dos órdenes de magnitud superior a la alcanzada en ausencia de dicha planta. *Novosphingobium* sp. HR1a es capaz de eliminar el 92% del fenantreno presente en microcosmos sembrados con trébol al cabo de 9 días.

Las bases moleculares de la interacción *Novosphingobium* sp. HR1a-trébol se estudiaron mediante técnicas fenómicas, metabolómicas y transcriptómicas. Midiendo la concentración de metabolitos en los exudados de trébol en presencia y ausencia de esta bacteria identificamos los compuestos que la cepa utiliza en la rizosfera. Los análisis transcriptómicos confirmaron la expresión de genes involucrados en el catabolismo de estos compuestos. El uso de una fusión transcripcional del promotor de la dioxigenasa involucrada en la degradación de PAHs con la proteína de la fluorescencia verde (GFP) permitió demostrar que este gen se induce en microcosmos sembrados con trébol y no en microcosmos sin planta. Un patrón de inducción similar al de la dioxigenasa se observó cuando estudiamos el regulador PahT, perteneciente a la familia IclR. Los estudios transcriptómicos realizados revelaron que PahT regula el flujo metabólico central del carbono, favoreciendo la degradación de PAHs, a la vez que también favorece la adquisición y metabolización de mono- y polisacáridos, abundantes en los exudados rizosféricos.

Podemos afirmar, por tanto, que existe una interacción positiva entre la planta de trébol y *Novosphingobium* sp. HR1a durante la rizoremediación, donde la bacteria utiliza diferentes fuentes de carbono y nitrógeno liberadas por la planta durante su crecimiento y los exudados del trébol son capaces de inducir la ruta degradativa de PAHs de la bacteria. El regulador PahT juega un papel importante en esta interacción.



### **Heterogeneidad fenotípica en el Sistema de Secreción tipo III de *Pseudomonas syringae* durante la interacción con la planta**

José S. Rufián, Nieves López-Pagán, Laura Mancera-Miranda, Javier Ruiz-Albert y Carmen R. Beuzón

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”. Universidad de Málaga.  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (IHSM-UMA-CSIC). Málaga.

[rufian@uma.es](mailto:rufian@uma.es)

La heterogeneidad fenotípica es un fenómeno que se ha descrito en poblaciones bacterianas de diversas especies. Un patrón de expresión génica heterogéneo puede llegar a volverse bimodal en ambientes homogéneos, proceso conocido como bistabilidad. El desarrollo de métodos de análisis de células individuales, como la microscopía confocal, la citometría o la microfluídica, ha llevado a la identificación de nuevos ejemplos de variación fenotípica y de biestabilidad. La relevancia de estos procesos se ha demostrado en patógenos humanos y de animales. No obstante, se conoce muy poco sobre la relevancia de este tipo de procesos en el proceso de adaptación a huéspedes no animales.

*P. syringae* es una bacteria patógena de plantas con un amplio rango de hospedador, existiendo más de 50 patovares. La virulencia de *Pseudomonas syringae* depende del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) y de los efectores tipo III (T3E). Mediante fusiones transcripcionales a proteínas fluorescentes generadas en el genoma de *P. syringae* pv. phaseolicola, y el uso de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión del T3SS y de T3E es heterogénea en el interior de la planta y biestable en medio mínimo. En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en nuestro análisis del impacto de la expresión heterogénea del T3SS para la adaptación a la planta, que incluyen la evaluación de la viabilidad de las variantes (T3SSON/T3SSOFF) en el apoplasto de la hoja, y de la dinámica de expresión en la población en diferentes escenarios de activación de defensa en la planta.



## Respuesta transcripcional bacteria-huésped durante la infección de válvula cardíaca por *Staphylococcus aureus*.

Begoña García<sup>1</sup>, Carmen Gil<sup>1</sup>, Nahiara Garmendia<sup>1</sup>, Cristina Solano<sup>1</sup>, Daniel Mouzo<sup>3</sup>, Rafael Sádaba<sup>2</sup>, Aritza Conte<sup>2</sup>, Virginia Alvarez<sup>2</sup>, Amaya Fernández<sup>2</sup>, Ana Navascues<sup>4</sup>, Carmen Ezpeleta<sup>4</sup>, David Gomez<sup>3</sup>, Natalia López<sup>2</sup> e Iñigo Lasa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Patogénesis Microbiana. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain

<sup>2</sup> Unidad de Cardiología Traslacional. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain

<sup>3</sup> Unidad de Bioinformática. Navarrabiomed-Complejo Hospitalario de Navarra (CHN)-Universidad Pública de Navarra (UPNA), IDISNA, Pamplona, Navarra, Spain

<sup>4</sup> Departamento de Microbiología Clínica. Hospital Universitario de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain

[begona.garcia@unavarra.es](mailto:begona.garcia@unavarra.es)

La endocarditis infecciosa (EI) es una infección del revestimiento interno del corazón que afecta a las válvulas cardíacas. Se produce cuando las bacterias entran en el torrente sanguíneo, alcanzan las válvulas cardíacas, se adhieren y se multiplican en ellas. Válvulas anatómicamente normales y sanas no tienden a infectarse. Sin embargo, la presencia de anomalías anatómicas, lesiones o válvulas de sustitución (prótesis) propician la infección. La infección genera una respuesta inflamatoria grave que lesiona estructural y funcionalmente las válvulas y conlleva un alto riesgo de muerte. *S. aureus* es el agente causal más común de EI. La identificación de marcadores diagnósticos específicos de la infección, así como una mayor eficacia de los tratamientos frente al patógeno son necesarios para mejorar el pronóstico de la EI por *S. aureus*. La caracterización de la respuesta transcripcional global de *S. aureus in vivo* podrían permitir la identificación de nuevos marcadores característicos de la enfermedad y de nuevas dianas terapéuticas frente al patógeno. En este estudio hemos puesto a punto un modelo animal de endocarditis infecciosa en cerdo desarrollado por Christiansen et al. (1) y lo hemos utilizado para determinar el perfil transcriptómico de *S. aureus* cuando se desarrolla en la superficie de válvulas cardíacas aórticas mediante secuenciación de RNA *in vivo*. Los resultados han mostrado que la expresión de genes implicados en la adquisición de hierro, la síntesis de hemolisinas, adhesinas y cápsula se ven significativamente inducidos durante la EI *in vivo*. Desde el punto de vista de las células de la válvula cardíaca, el análisis transcriptómico ha mostrado que el desarrollo de la bacteria en el tejido de la válvula provoca la activación de genes implicados en la producción de citoquinas, quimiotaxis, secreción celular y regulación de la respuesta inmune innata. En conjunto, este estudio permite conocer los procesos fisiológicos importantes para que *S. aureus* pueda desarrollarse en la superficie de la válvula cardíaca, así como la respuesta que provoca su presencia en las células de la válvula durante un proceso de EI *in vivo*.

1. Christiansen JG, Jensen HE, Johansen LK, Kochl J, Koch J, Aalbaek B, et al. Porcine models of non-bacterial thrombotic endocarditis (NBTE) and infective endocarditis (IE) caused by *Staphylococcus aureus*: a preliminary study. J Heart Valve Dis. 2013 May;22(3):368–76.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### ***Salmonella* modifica el ubiquitinoma de las células hospedadoras**

Andrea Bullones-Bolaños, Joaquín Bernal-Bayard, Francisco Ramos-Morales.

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla  
[abullones@us.es](mailto:abullones@us.es)

*Salmonella enterica* es una bacteria Gram negativa causante de múltiples enfermedades en humanos y animales. La virulencia de *Salmonella* depende de los sistemas de secreción de tipo III cuya función es translocar proteínas efectoras al citoplasma de la célula hospedadora. Los efectores manipulan diferentes procesos dentro de la célula para promover la infección y supervivencia de la bacteria. En nuestro laboratorio estudiamos una familia de efectores con actividad E3 ligasa de ubiquitina (SirP, SspH1 y SspH2) con el objetivo de identificar el conjunto de proteínas ubiquitiladas en una célula (ubiquitinoma) en presencia de estos efectores. Hemos transfectado células HEK con plásmidos que expresan los 3 efectores o el vector vacío y tratamos dichas células con MG132 para inhibir la degradación de proteínas por el proteasoma. Posteriormente, realizamos la purificación por afinidad de sustratos ubiquitilados los cuales identificamos por espectrometría de masas. Los potenciales sustratos identificados están involucrados en diferentes procesos celulares. La ubiquitilación de estos candidatos será confirmada con ensayos *in vitro* y se analizará el nivel de especificidad y redundancia que puede existir entre los efectores de la misma familia. Nuestros resultados muestran que las ligasas de ubiquitina de *Salmonella* alteran el ubiquitinoma de la célula hospedadora afectando múltiples procesos celulares.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación/10.13039/501100011033, proyecto número PID2019-106132RB-I00, el programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea bajo la beca Marie Skłodowska-Curie Nº 842629 y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía, dentro del Programa Operativo FEDER 2014-2020, proyecto US-1380805 y proyecto P20\_00576.



## Inhibición selectiva de la actividad lipasa por una mini-proteína altamente conservada en el género *Staphylococcus*

Ane Muruzabal-Galarza, Arancha Catalan-Moreno, Pedro Dorado-Morales y Alejandro Toledo-Arana.

Laboratorio de Regulación Génica Bacteriana, Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IdAB-CSIC), Avenida de Pamplona 123, Mutilva (Navarra).

[ane.muruzabal@csic.es](mailto:ane.muruzabal@csic.es)

Recientemente, se ha descubierto la existencia de mini-proteínas (smORFs) implicadas en procesos fundamentales para las bacterias. Sin embargo, estas smORFs no se encuentran correctamente anotadas en los genomas disponibles debido a que los algoritmos de anotación no suelen incluir proteínas menores a 50-100 aminoácidos. Mediante la combinación de proteómica de alta-resolución y RIBO-seq (que permite determinar los RNAs mensajeros que se traducen in vivo), nuestro grupo se encuentra estudiando el proteoma oculto de *Staphylococcus aureus*, una bacteria patógena Gram-positiva causante de una gran variedad de infecciones.

Para poder sobrevivir en el ambiente hostil del sitio de infección, la bacteria secreta numerosos factores de virulencia que le permiten invadir los tejidos, combatir el sistema inmune y obtener los nutrientes necesarios. Entre ellos, las lipasas juegan un papel clave durante estos procesos. *S. aureus* cuenta con al menos dos lipasas secretadas a través del sistema Sec, una que digiere ácidos grasos de cadena corta (SAL1) y otra los de cadena larga (SAL2).

Curiosamente, el análisis de RIBO-seq identificó la presencia de dos smORFs en el mRNA de *sal1*, una en la región 5' y otra en la 3', que se traducirían conjuntamente con SAL1. Ambas mini-proteínas tienen un tamaño de 21 aa y están altamente conservadas en el género *Staphylococcus*.

En este trabajo describimos el estudio funcional de la smORF localizada en la región 5' (5'Lip). Primero, la expresión de 5'Lip fue validada fusionando su RBS al gen *gfp* y determinado los niveles de fluorescencia. Posteriormente, para evaluar la función de 5'Lip, se construyeron plásmidos que expresaban de manera constitutiva la mini-proteína y su mutante (stop-codon) como control negativo. Así, se observó que 5'Lip inhibía la actividad lipasa en sobrenadantes de cultivo de *S. aureus*. Mediante la combinación de mutantes en *sal1* y *sal2* complementados con dichos plásmidos, se determinó que 5'Lip inhibe exclusivamente la actividad de SAL2. Estudios de fraccionamiento subcelular sugerirían que 5'Lip interactuaría con SAL2 para bloquear su paso a través de la membrana, priorizando la actividad de SAL1. En general, este trabajo pone de manifiesto la relevancia de ciertas mini-proteínas (actualmente ocultas) para la biología de *S. aureus*.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación en el marco del Programa Estatal de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I+D+i (Ref. PID2019-105216GB-I00).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**El dominio N-terminal de la gasdermina D provoca alteraciones en el ciclo celular, el tráfico endosomal y las mitocondrias en *Saccharomyces cerevisiae***

Marta Valenti, María Molina, Víctor J. Cid

Universidad Complutense de Madrid e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria  
[martva02@ucm.es](mailto:martva02@ucm.es)

La piroptosis es un mecanismo de muerte celular que juega un papel clave en la defensa frente a microorganismos patógenos en organismos superiores en el marco de la inmunidad innata, al estar mediada por los inflamasomas, las caspasas proinflamatorias y la proteína efectora formadora de poros denominada gasdermina D (GSDMD). Tras la activación de dichas caspasas, el dominio N-terminal de la GSDMD es liberado por proteólisis. Esto le permite interactuar con la membrana plasmática y ensamblar poros que van a ser responsables en última instancia de la muerte de la célula. Desde finales del siglo XX, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada como un organismo modelo en estudios moleculares que han permitido caracterizar en mayor profundidad determinadas proteínas asociadas a enfermedades humanas, sirviéndose para ello de técnicas de expresión heteróloga. La levadura carece de una ruta homóloga a la piroptosis, lo que no impide que pueda utilizarse como una plataforma para estudiar la función de la GSDMD *in vivo* debido a su fácil manejo. En este trabajo hemos expresado en *S. cerevisiae* tanto la forma completa como el dominio N-terminal de la GSDMD humana con el objetivo de profundizar en sus efectos y dianas celulares. El dominio N-terminal aislado, pero no la proteína completa, fue capaz de inhibir el crecimiento de la levadura y formar agregados proteicos, aunque estos no estaban asociados a la membrana plasmática, al menos mediante estudio de fusiones de GSDMD a la proteína fluorescente GFP. Por el contrario, causó una parada irreversible del ciclo de división celular a través de la inhibición de la quinasa TORC1, afectando asimismo a procesos de tráfico endosomal y autofagia. En cuanto su localización subcelular, el dominio N-terminal de la GSDMD aparecía asociado a las mitocondrias, causando una fragmentación e hiperpolarización de las mismas, junto con la acumulación de especies reactivas de oxígeno en las células. Nuestros resultados suponen la primera prueba de concepto de un modelo de levadura humanizada de piroptosis, que podrá ser utilizado en futuros experimentos para llevar a cabo ensayos de estructura-actividad con la GSDMD y descubrir fármacos capaces de modular su función.

**Agradecimientos**

Este trabajo está financiado por el proyecto de investigación PID2019-105342GB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación. El trabajo de la doctoranda Marta Valenti está financiado por un contrato de personal investigador en formación de la Universidad Complutense de Madrid.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### **Type III secretion system effectors form robust and flexible intracellular virulence networks**

David Ruano-Gallego, Julia Sanchez-Garrido, Elena Nuñez-Berruenco, Massiel Cepeda-Molero, Luis Ángel Fernández, Alfonso, Rodríguez-Paton, Gad Frankel

MRC-CMBI, Imperial College London / Departamento de Evolución Molecular, Centro de Astrobiología (INTA-CSIC)

[druano@cab.inta-csic.es](mailto:druano@cab.inta-csic.es)

Type III secretion system (T3SS) effectors are key virulence factors that underpin the infection strategy of many clinically important Gram-negative pathogens, including *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* and their murine equivalent, *Citrobacter rodentium*. The main approach to understanding T3SS-mediated pathogenesis has been to determine the contribution of one effector at a time. In contrast to this prevailing approach, simultaneous deletion of multiple effectors has revealed that they function as an interconnected network *in vivo*, uncovering effector codependency and context-dependent effector essentiality.

This hypothesis was tested by infecting mice with >100 *C. rodentium* effector mutant combinations. We sequentially deleted effector genes from two distinct starting points to reach sustainable endpoints, resulting in strains missing 19 unrelated effectors (CR14) or 10 effectors involved in modulation of innate immune responses in intestinal epithelial cells (IECs) (CRi9). Unexpectedly, both strains colonised the colon and activated conserved metabolic and antimicrobial processes in IECs, while eliciting distinct cytokine and immune cell infiltration responses. Nonetheless, infection with CR14 or CRi9 induced protective immunity against secondary infections.

Importantly, while effectors Tir, EspZ and NleA are essential, we show that other effectors exhibit context-dependent essentiality *in vivo*. Moreover, *C. rodentium* expressing the effector repertoire of EPEC E2348/69 failed to efficiently colonise mice. We used curated functional information and our *in vivo* data to train a machine learning model that predicted values for colonisation efficiency of novel mutant combinations. Remarkably, a mutant with a low predicted value, lacking only effector genes *nleF*, *nleG8*, *nleG1*, *nleB* and *espL*, failed to colonise.

Thus, T3SS effectors form robust networks, which can sustain significant contractions while maintaining virulence. As the robustness limits of other effector networks depend on the contraction starting point and the order of the deletions, machine learning models could transform our ability to predict alternative network functions.

#### **Referencias:**

Ruano-Gallego, D. et al. Type III secretion system effectors form robust and flexible intracellular virulence networks. *Science* 371, doi:10.1126/science.abc9531 (2021).

Sanchez-Garrido, J., Ruano-Gallego, D., Choudhary, J. S. & Frankel, G. The type III secretion system effector network hypothesis. *Trends Microbiol*, doi:10.1016/j.tim.2021.10.007 (2021).





## La pérdida de la proteína fijadora de penicilina 3 (PBP3) en respuesta a señales propias del fagosoma y su contribución a la evolución de *Salmonella* como patógeno intracelular

David López-Escarpa, Sónia Castanheira y Francisco García-del Portillo

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

[david.lopez@cnb.csic.es](mailto:david.lopez@cnb.csic.es)

*Salmonella enterica* es un patógeno que establece infecciones persistentes en vacuolas (fagosomas) de células eucariotas. Pese a que la biogénesis de este compartimento ha sido ampliamente estudiada, se desconoce en gran medida la regulación de su morfología celular en ese nicho. *In vivo*, *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) reemplaza las proteínas morfogénicas PBP2 y PBP3, por proteínas parálogas PBP2<sub>SAL</sub> y PBP3<sub>SAL</sub>, ausentes en bacterias filogenéticamente cercanas como *Escherichia coli*.

Hemos comprobado que PBP3 disminuye significativamente sus niveles cuando la bacteria se expone a señales presentes en el ambiente intravacuolar, como pH ácido, una alta osmolaridad y limitación de nutrientes, condiciones en las que se produce PBP3<sub>SAL</sub>. De interés, estas mismas señales estimulan la expresión de la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2), esencial para la supervivencia y la proliferación del patógeno en el interior del fagosoma. Al profundizar en esta regulación, hemos asociado funcionalmente la proteasa Prc y el factor de transcripción OmpR a la disminución de PBP3. Por otro lado, OmpR estimula la producción de PBP2<sub>SAL</sub> y PBP3<sub>SAL</sub> en respuesta a un pH ácido mediante su probable unión a las correspondientes regiones promotoras de sus respectivos genes codificantes. *E. coli*, en la que la proteína PBP3 es esencial para el proceso de división, también responde disminuyendo sus niveles si se expone artificialmente a señales del fagosoma, lo que explica la ausencia de *E. coli* patógenos que se dividan en compartimientos fagosomales. Estas observaciones indican que la regulación negativa sobre PBP3 ejercida por las señales propias del fagosoma pudo favorecer la adquisición por *S. Typhimurium* de PBP3<sub>SAL</sub>. La ganancia de esta enzima pudo permitir la proliferación de *S. Typhimurium* en las drásticas condiciones del fagosoma ácido, contribuyendo así a su evolución como patógeno intravacuolar.



***In vivo* genome-wide fitness analysis uncovers *Haemophilus influenzae* metabolic network requirements during airway infection: study of the tryptophan-serine metabolic axis**

Javier Asensio-López<sup>1,2</sup>, Begoña Euba<sup>1</sup>, Celia Gil-Campillo<sup>1,3</sup>, Beatriz Rapún-Araiz<sup>1</sup>, Goizeder Almagro<sup>1</sup>, Nahikari López-López<sup>1,3</sup>, Irene Rodríguez-Arce<sup>1</sup>, María Lázaro<sup>1</sup>, Mariette Barbier<sup>4,5</sup>, Jeroen Langereis<sup>6</sup> Alejandro Toledo-Arana<sup>1</sup>, Saioa Burgui<sup>2</sup>, Junkal Garmendia<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IdAB-CSIC)-Gobierno de Navarra, Mutilva, Spain;

<sup>2</sup>Asociación de la Industria Navarra (AIN)-Gobierno de Navarra, Cordovilla, Spain;

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Vaccine Development Center, West Virginia University Health Sciences Center, Morgantown, West Virginia, USA;

<sup>5</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Cell Biology, West Virginia University School of Medicine, Morgantown, West Virginia, USA;

<sup>6</sup>Section Pediatric Infectious Diseases, Laboratory of Medical Immunology, Radboud Institute for Molecular Life Sciences and Radboud Center for Infectious diseases, Radboudumc, Nijmegen, The Netherlands

[javier12695@gmail.com](mailto:javier12695@gmail.com)

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a human-adapted bacterial pathogen causing airway infections in immunocompromised patients. Bacteria and host elements dictating the complexity and fitness of NTHi within the lung are not well understood. Here, we exploited the strength of *in vivo* systems multi-omics analyses to study this host–microbe complex. We used transcriptome profiling (RNAseq) and high-throughput transposon mutant library sequencing (Tnseq) to profile NTHi genome-wide gene expression and mutant fitness during lung infection. Integration of these two data sets drew a comprehensive landscape in terms of bacterial metabolic requirements during infection. Genes involved in tryptophan biosynthesis were identified upon screening bacterial mutants underrepresented in lung samples. Tryptophan auxotrophy dampened *in vivo* bacterial fitness upon impaired tryptophan transport, and tryptophan uptake/synthesis relative contribution to bacterial fitness and metabolic end product excretion was established. Also, we considered that: (i) Our Tnseq was performed with the RdKW20 strain as it is highly transformable. However, it lacks the accessory *tnaCAB* genes, encoding the TnaA tryptophanase that catalyses the conversion of Trp to indole, and the TnaB Trp transporter, otherwise present in ~80 % of WGS NTHi isolates. Indole may be an immunometabolite and together with serine, a substrate for TrpB-catalyzed tryptophan synthesis. The *serA* and *serB* genes, involved in L-serine synthesis, were also Tnseq hits. (ii) Visualization of mapped read distribution in the NTHi375 genome by using our previously generated RNAseq data showed a long 3'UTR overlapping event among convergent genes in the *mtr-sdaCA* region, where *mtr* encodes a tryptophan transporter, *sdaC* a L-serine transporter, and *sdaA* a L-serine desaminase catalyzing the conversion of L-serine to pyruvate. Biological significance and contribution of this tryptophan-serine metabolic axis to NTHi airway infection is being studied by generation and phenotyping of a panel of tryptophan and serine transport/metabolism mutant strains, analysis of regulatory elements in the *mtr-sdaCA* region, and analysis of tryptophan-related immunomodulatory events during NTHi infection.

**Funding:** J.A.-L. is funded by a PhD studentship from Gobierno Navarro, reference 0011-1408-2020-000007. This work has been funded by grant MICIU RTI2018-096369-B-I00 to J.G. CIBER is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.



## La interacción hospedador-patógeno en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* reinterpretada en base a un metabolito presente en sus hospedadores

Elena Campos-Pardos,<sup>1,2,3</sup> Santiago Uranga,<sup>1,2</sup> Ana Picó,<sup>1</sup> y Jesús Gonzalo-Asensio<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Genética de Micobacterias, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de

Zaragoza, Zaragoza, España

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

<sup>3</sup> Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

[elenacampos@unizar.es](mailto:elenacampos@unizar.es) ; [jagonzal@unizar.es](mailto:jagonzal@unizar.es)

En el presente trabajo caracterizamos el papel y la influencia que posee un metabolito presente en el hospedador en la biología y patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), así como en el transcurso de la infección tuberculosa.

En primer lugar, realizamos un análisis genético exhaustivo de la ruta de síntesis de este metabolito en el complejo *Mtb* (MTBC), y en *M. canettii* (*Mcan*) -último antecesor conocido del MTBC- observando un decaimiento genético de su ruta biosintética en el MTBC que, presumiblemente, estaría anulando la producción del metabolito de estudio. Posteriores estudios de producción y captación *in vitro* de este metabolito en especies representativas del MTBC y *Mcan* confirmaron la incapacidad de síntesis del metabolito por parte del MTBC, al contrario que *Mcan*, y la habilidad de todas las cepas estudiadas para captarlo del medio. El mantenimiento de dicha capacidad de captación, a pesar de la pérdida de su biosíntesis, sugirió una posible implicación de este metabolito en mecanismos de señalización patógeno-hospedador.

Para confirmar esta hipótesis realizamos, por un lado, estudios transcriptómicos y proteómicos en cepas del MTBC en presencia y ausencia del metabolito para identificar el regulón en respuesta a dicha molécula. Por otro lado, construimos cepas de *Mcan* y *Mtb* mutantes incapaces de producir o de captar el metabolito en estudio. Finalmente, se desarrolló un nuevo modelo de ratón caracterizado por poseer bajos niveles del metabolito de estudio, para realizar experimentos *in vivo*. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la presencia del metabolito en el hospedador resulta en una mejor progresión de la infección tuberculosa, mientras que su déficit conlleva una menor gravedad en la infección. Además, el análisis de los datos transcriptómicos y proteómicos permitió identificar el papel de dicho metabolito en la biosíntesis de un aminoácido esencial por parte del MTBC. Estudios con diferentes cepas mutantes de *Mtb* confirmaron esta hipótesis, tanto en nuestro modelo de ratón como en ensayos *in vitro*.

Este trabajo ha permitido no solo la identificación de un posible biomarcador de la progresión de la enfermedad tuberculosa, sino también establecer una posible diana terapéutica para terapias basadas en el hospedador.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Identificación y caracterización funcional del proteoma oculto de *Staphylococcus aureus*

Arancha Catalan-Moreno, Ane Muruzabal-Galarza, Pedro Dorado-Morales y Alejandro Toledo-Arana

Laboratorio de Regulación Génica Bacteriana, Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IdAB-CSIC), Avenida de Pamplona 123, Mutilva (Navarra).

[arancha.catalan@csic.es](mailto:arancha.catalan@csic.es)

Actualmente las bases de datos incluyen miles de secuencias genómicas pertenecientes a la mayoría de especies bacterianas de relevancia. A pesar de que esta información es extremadamente útil, las anotaciones de estos genomas presentan deficiencias significativas. Dependiendo del algoritmo utilizado, las proteínas con tamaño inferiores a 50-100 aminoácidos no se encuentran correctamente anotadas y, por lo tanto, no han sido incluidas en ninguno de los análisis multiómicos y funcionales que se han llevado a cabo hasta ahora. Recientemente, gracias tanto a la mejora de las tecnologías proteómicas como al desarrollo de nuevas técnicas basadas en secuenciación masiva que permiten la identificación de los RNA mensajeros traducidos *in vivo* (RIBO-seq), es posible identificar las proteínas que verdaderamente se expresan en una bacteria. En este estudio, mediante la combinación de estas nuevas técnicas estamos estudiando el proteoma oculto de *Staphylococcus aureus*, uno de los patógenos más relevantes en el ámbito hospitalario. Estos análisis nos han permitido identificar y confirmar la expresión *in vivo* de más de 300 proteínas menores a 100 aa (smORFs), de las cuales 57 no estaban anotadas en el genoma de referencia. De estas smORFs, se seleccionaron los candidatos más relevantes teniendo en cuenta su localización genómica, la presencia de dominios transmembrana (DTM) o de secuencias consenso para reguladores transcripcionales, entre otros criterios. Su expresión fue confirmada *in vivo* mediante la fusión de la región de unión al ribosoma (RBS) al gen que codifica la proteína GFP y la determinación de la fluorescencia a nivel de células individuales. Además, se analizó su localización celular mediante técnicas de fraccionamiento subcelular y microscopía de fluorescencia acoplada a sistemas de microfluídica. Interesantemente, las smORFs seleccionadas que incluían DTMs presentaban localizaciones diferenciales en la membrana sugiriendo funciones específicas. Finalmente, los análisis fenotípicos demostraron que la sobreexpresión de la smORF10 (27 aa), que se localiza en membrana y está codificada en un pequeño RNA de *S. aureus* (Teg103), inhibe el crecimiento bacteriano tanto en *S. aureus* como en *E. coli*. Este trabajo confirma la existencia de mini-proteínas ocultas en el genoma que pueden estar implicadas en procesos importantes para la biología de este patógeno.

### Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación en el marco del Programa Estatal de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I+D+i (Ref. PID2019-105216GB-I00).



## **Análisis de la respuesta inmunológica natural de cerdos contra antígenos subcapsulares de *Streptococcus suis***

Carla García<sup>1</sup>, Cristina Uruen<sup>1</sup>, Luis Saralegui<sup>1</sup>, Lorenzo Fraile<sup>2</sup>, Mateo del Pozo<sup>3</sup>, Clara Marín<sup>4</sup>, Jesús Arenas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Microbiología e Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. <sup>2</sup> Universidad de Lleida, Cataluña. <sup>3</sup> Laboratorios Labopat, Segovia. <sup>4</sup> Centro de investigaciones Agroalimentarias de Aragón, Aragón.

\*[jarenasbusto@gmail.com](mailto:jarenasbusto@gmail.com)

La enfermedad estreptocócica porcina producida por *Streptococcus suis* es una de las principales causas de mortalidad y pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial. *S. suis* forma parte del microbiota natural del tracto respiratorio superior, intestino y genitales de cerdos, pero resulta patógeno cuando penetra las mucosas y accede al torrente sanguíneo provocando bacteriemia, endocarditis, artritis, neumonía y muerte, principalmente en lechones. Su prevención está basada fundamentalmente en vacunas inactivadas, aunque su efectividad es específica de cepa. Estudiar la respuesta inmune contra *S. suis* en animales naturalmente inmunizados podría servir para el desarrollo de nuevas terapias o marcadores de protección.

El objetivo de este estudio fue analizar la respuesta humoral de cerdos de diferentes edades y con diferente exposición a *S. suis*. Para esto, se diseñó un ELISA usando células enteras de un mutante sin capsula para determinar el título de anticuerpos frente a antígenos subcapsulares de *S. suis*, estableciéndose 3 categorías de títulos (altos, medios y bajos). Se analizaron, procedentes de 25 granjas diferentes, i) 75 y 45 sueros obtenidos de madres y lechones sanos (sin infección clínica aparente), respectivamente, y ii) 30 sueros de lechones enfermos. El 35% de los sueros de madres presentaron títulos altos de anticuerpos, el 30% títulos medios, y el 35%, bajos. Por el contrario, los sueros de lechones sanos presentaron mayoritariamente títulos de anticuerpos bajos (75% de los sueros) y medios (20%). Todos los sueros de lechones enfermos presentaron títulos bajos o no se detectaron anticuerpos. Esto indica que las madres desarrollan una mayor respuesta humoral contra antígenos subcapsulares de *S. suis* que los lechones, y sugiere que los títulos de anticuerpos podrían estar asociados con protección frente a la enfermedad. Ensayos de actividad funcional frente a *S. suis* de sueros representativos confirmaron una actividad específica de los sueros según los títulos de anticuerpos observados. Análisis mediante *Western-blotting* detectaron que sueros con títulos altos presentaban reacciones contra una variedad de proteínas presentes en la envuelta celular de cepas genéticamente divergentes. Este estudio abre nuevas vías para conocer nuevos marcadores inmunológicos asociados con la susceptibilidad o protección frente a *S. suis*.

Este estudio ha sido financiado por el proyecto de AEI PID2020-114617RB-I00, enmarcado en el programa Retos de Investigación 2020.



**Genome-wide analysis of *Haemophilus influenzae* genes required for bacterial fitness during respiratory infection reveals a key role for Dam methylation epigenetic regulation of the FNR regulon**

Celia Gil-Campillo<sup>1,2</sup>, Gabriel Gutiérrez<sup>3</sup>, Begoña Euba<sup>1</sup>, Irene Rodríguez-Arce<sup>1</sup>, Joshua C. Mell<sup>5</sup>, María Antonia Sánchez-Romero<sup>4</sup>, Junkal Garmendia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IdAB-CSIC)-Gobierno de Navarra, Mutilva, Spain;

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain;

<sup>3</sup>Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Seville, Seville, Spain

<sup>4</sup>Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain;

<sup>5</sup>College of Medicine, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America.

[celia.gil@csic.es](mailto:celia.gil@csic.es)

*Haemophilus influenzae* is a human host-adapted pathogen causing chronic lower airway infections and recurrent exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease patients. Unraveling *H. influenzae* virulence mechanisms will result in identifying targets for drug development.

We used transposon insertion sequencing (TnSeq) to screen genes required for *H. influenzae* infection on a murine model of airway infection, and identified and further validated the Dam methyltransferase. We next asked if Dam-mediated GATC methylation regulates *H. influenzae* gene expression and if so, how such epigenetic regulation may contribute to this host-pathogen interplay. We followed two complementary approaches:

(i) we used RNA sequencing (RNA-seq) to profile differential gene expression when comparing WT and *dam* mutant strains. The oxygen sensitive fumarate and nitrate reductase (FNR) encoding gene, together with the known FNR regulon genes *ytfE*, *dmsA* and *cydD*, were overexpressed upon *dam* inactivation. Further analysis identified GATC motifs in the *fnr* and *dmsA* promoter regions.

(ii) we used 17 already available *H. influenzae* PacBio genomes (mBio. 2018 Sep 25; 9(5):e01176-18. doi: 10.1128/mBio.01176-18.) to screen hypo/hemi-methylated GATC sites in non-coding regions, as potential elements of epigenetic regulation of gene expression. GATC hypo/hemi-methylation was recurrently observed in a region containing two GATC motifs upstream of the high temperature protein G-HtpG encoding gene, the proximal one overlapping with a putative FNR binding site.

Based on these observations, we are undergoing mutant strain generation and phenotyping, validation of GATC methylation sites, and analysis of differential gene expression at both the population and single cell levels, to unravel the architecture and biological meaning of this regulatory network upon *H. influenzae* respiratory infection. Preliminary data suggest the existence of Dam-dependent heterogeneous populations when analyzing the *htpG* gene expression. Together, our results shed light on Dam methyltransferase contribution to *H. influenzae* pulmonary infection and on the role of Dam methylation in regulating the expression of genes involved in this bacterial response to environmental stress conditions.

**Funding:** C.G.-C. is funded by a PhD studentship from Programa de Formación de Personal Investigador (FPI), reference PRE2019-088382. This work has been funded by grant MICIU RTI2018-096369-B-I00 to J.G. CIBER is an initiative from Instituto de Salud Carlos III.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **SNRPD2 es un sustrato de la actividad ligase de ubiquitina del efector SlrP de *Salmonella enterica***

Andrea Bullones Bolaños, Juan Luis Araujo Garrido, Jesús Fernández García, Joaquín Bernal Bayard, Francisco Ramos Morales

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla  
[framos@us.es](mailto:framos@us.es)

Se realizó un escrutinio de doble híbrido en levaduras para encontrar nuevas proteínas de las células humanas hospedadoras capaces de interactuar con SlrP, un efector de los sistemas de secreción tipo III de la bacteria *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. SlrP es un miembro de la familia NEL de ligasas de ubiquitina bacterianas. Entre las proteínas identificadas en el escrutinio se encontró SNRPD2, un componente esencial del aparato de eliminación de intrones durante el procesamiento del ARNm. Mediante experimentos de ubiquitilación *in vitro* se demostró que SNRPD2, además de interactuar con SlrP, es un sustrato de su actividad catalítica. Sin embargo, SspH1 y SspH2, otros efectores de la familia de SlrP, no catalizaron la ubiquitilación de SNRPD2. Por último, mediante espectrometría de masas se identificaron lisinas de SNRPD2 modificadas por esta actividad.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación/10.13039/501100011033, proyecto número PID2019-106132RB-I00, y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y la Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía, dentro del Programa Operativo FEDER 2014-2020, proyecto US-1380805 y proyecto P20\_00576.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Diseño y puesta a punto de un sistema diagnóstico de tuberculosis bovina mediante amplificación isoterma LAMP- PCR**

Nelson Alejandro Sierra Cortés<sup>1</sup>, Danna Sofía Camelo Gómez<sup>1</sup>, Nelson Enrique Arenas<sup>2</sup>, Carlos Y. Soto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá, Colombia  
[cysotoo@unal.edu.co](mailto:cysotoo@unal.edu.co)

La tuberculosis bovina (BTB) es una enfermedad zoonótica de alta prevalencia en el sector bovino que representa un importante riesgo para animales, ganaderos y consumidores, además de importantes pérdidas económicas. El diagnóstico de la BTB se basa en la intradermorreacción frente a la tuberculina y pruebas microbiológicas, estas últimas con problemas de especificidad, sensibilidad, rapidez de los resultados, así como un limitado acceso por parte de pequeños y medianos productores ganaderos. Por lo tanto, el presente trabajo busca diseñar y estandarizar un sistema de diagnóstico específico de tipo “*point of care*” para la fácil identificación de *M. bovis* utilizando la técnica LAMP-PCR, o amplificación isoterma, que no requiere de equipos ni personal especializado y puede ser fácilmente implementada en campo. Para lograr este objetivo, inicialmente se buscó una región genómica para la identificación específica de *M. bovis*, región que se utilizó para diseñar un conjunto de oligonucleótidos especiales que permitieron la amplificación isoterma de fragmentos y su respectiva detección colorimétrica. Los oligonucleótidos diseñados anillan la región RD12, que corresponde a una delección compartida por *M. bovis* y *M. caprae* pero ausente en el resto de especies de micobacterias. La especificidad de la prueba se comprobó en la cepa de referencia *M. bovis* ATCC 27290, utilizando como controles cepas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG (cepa vacunal), y de otras micobacterias. El tiempo de amplificación isoterma para considerar positiva la prueba fue máximo de 30 minutos. La sensibilidad de la reacción fue evaluada en ADN de *M. bovis* ATCC 27290 en un rango de concentraciones entre 250 ng/μL y ≈ 5 fg/μL, encontrando que el límite de detección del ensayo es de 50 fg/μL, lo que equivale aproximadamente a 10 copias de genoma de *M. bovis*. Estos resultados sugieren que el sistema de diagnóstico diseñado podría ser de gran utilidad para contribuir para la detección de tuberculosis bovina causada tanto por *M. bovis* como por *M. caprae* directamente en los centros de producción ganadera.

**Agradecimientos:** Proyecto financiado por la Vicerrectoría de Investigación, Universidad Nacional de Colombia, UN INNOVA, proyecto Hermes 49269 y Convocatoria de proyectos de investigación conjuntos entre la Universidad de Cundinamarca y la Universidad Nacional de Colombia, proyecto Hermes 39578.





## Characterization of invasion during infection in *Salmonella enterica*'s effectors SlrP, SspH1 and SspH2

Claudia Vallejo Grijalba<sup>1</sup>, Paula Martín Muñoz<sup>1</sup>, Joaquín Bernal Bayard<sup>1</sup>, Francisco Ramos Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

[cvallejo1@us.es](mailto:cvallejo1@us.es)

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium has two type III secretion systems (T3SS) encoded in the *Salmonella* pathogenicity islands 1 (SPI1) and 2 (SPI2), respectively. These T3SSs translocate effector proteins into host cells. The T3SS coded in the SPI1 translocates effectors during early stages in the infection, while the T3SS coded in the SPI2 is expressed after internalization and is important to establish an appropriate replicative niche. SlrP, SspH1 and SspH2 are E3 ubiquitin ligase effectors, translocated into host cells during infection through the T3SS. In this study we evaluate different aspects related with this family of virulence factors like pattern of expression, translocation into the host cell as well as the potential attenuation of derivative mutants on these effectors.

The analysis of the expression of the effectors was performed using a bioluminescent reporter that encodes the *luxCDABE* operon of *Photobacterium luminescens*. The promoters of the effectors were cloned into the plasmid, and bioluminescence was measured in different growth conditions, with the presence or absence of different regulators, and during stages of the host infection. With these assays we have so far observed how the three effectors are differentially expressed when the induction of SPI1 or SPI2 is favoured, being *slrP* and *sspH2* expressed in a greater amount when SPI2 is induced.

Translocation into the eukaryotic cells was measured using fusions of the effectors with CyaA' and measuring the levels of cyclic AMP during infection of different cell lines. These experiments confirmed that SlrP is translocated through the SPI1 T3SS and showed that SspH1 might be preferentially secreted through the SPI2 T3SS in HeLa cells.

We generated deletion mutants of *slrP*, *sspH1* and *sspH2* and used them in mixed infection assays together with the wild-type strain to calculate a competitive index and evaluate the potential attenuation of the defective variants. Our results suggest that the effectors play a role in proliferation in fibroblasts, given that the triple mutant shows a proliferative defect in this cell line.

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación/10.13039/501100011033, grant number PID2019-106132RB-I00; Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía, dentro del Programa Operativo FEDER 2014-2020, grant number US-1380805 and grant number P20\_00576.



## **Response of *Pseudomonas putida* to noxious compounds susceptible of synthesis by *Pseudomonas putida***

Ana García Franco, Patricia Godoy Alba, Rocío Palacios Ferrer, Estrella Duque Martín de Oliva and Juan Luis Ramos Martín.

Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
[ana.garcia@eez.csic.es](mailto:ana.garcia@eez.csic.es)

*Pseudomonas putida* DOT-T1E is a highly solvent-tolerant strain. Styrene is one of the most demanded monomers for the synthesis of polymers and copolymers, being obtained mainly from oil refining. Therefore, the biosynthesis of said compound from lignocellulosic residues using the *P. putida* DOT-T1E strain as a chassis constitutes an alternative of industrial interest.

In previous studies, it was shown that *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* bearing genes encoding a phenylalanine ammonia lyase and a *trans*-cinnamic acid decarboxylase, produced styrene from phenylalanine via *trans*-cinnamic acid, but the *in vivo* production of this aromatic compound was limited by the internal level of phenylalanine and the limited intrinsic tolerance to styrene of the producing strains.

Therefore, the usefulness of a microorganism as a bacterial chassis to obtain chemical products requires not only the genetic/biochemical background for the metabolic steps, but also tolerance to metabolic intermediates and final products.

The present study was conceived to provide insights on the tolerance of *P. putida* DOT-T1E to *trans*-cinnamic acid and styrene and to unveil the mechanisms behind the resistance to these compounds. The growth rates of *P. putida* DOT-T1E in glucose and in the same medium with styrene supplied through the gas phase, *trans*-cinnamic acid or both compounds, were similar. Growth of T1E was then tested in the presence of increasing concentrations of the two compounds and we found that concentrations in the range of 25 to 50 mM of *trans*-cinnamic acid prevented growth though cell viability was not affected and 0.1 % (v/v) styrene decreased cell viability during first hours of exposure, but upon long incubation growth was restored.

The transcriptomic and proteomic studies revealed the expression of genes encoding stress proteins and efflux transport functions as the main agents involved in tolerance to these chemicals.

These results support the potential of *P. putida* DOT-T1E for the biosynthesis of value-added compounds such as styrene and its derivatives.



## Improved colonization of human tumor spheroids by *E. coli* bacteria with synthetic adhesins binding cell-surface receptors of tumor cells

Alba Cabrera Fisac, Carmen Mañas-Torres, Eva Pico-González, Elena M. Seco, Luis Ángel Fernández

Department of Microbial Biotechnology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)  
[acabrera@cnb.csic.es](mailto:acabrera@cnb.csic.es)

The use of bacteria for the treatment of solid tumours takes advantage of the natural characteristics of anaerobic bacteria, which allow them to colonize and grow preferentially in the hypoxic and immunosuppressed tumour microenvironment. These natural properties of bacteria can be enhanced with synthetic biology to increase specificity and efficacy of bacterial tumor therapies. In our laboratory, we have developed synthetic adhesins for *E. coli* that enable the specific adhesion of bacteria to mammalian tumor cells expressing a cell-surface antigen (1). Synthetic adhesins are chimeric protein fusions between the N-terminal domain of intimin, which anchors in the bacterial outer membrane, and a camelid single-domain antibody (nanobody) with high-affinity and specificity against the cell-surface antigen. We have engineered *E. coli* strains with synthetic adhesins binding the human cell surface receptors EGFR and Her2, which are frequently dysregulated in cancers of epidermal origin, such as colon and breast carcinomas. These bacteria adhere specifically in high numbers to tumour cell lines expressing EGFR and Her2 grown *in vitro* as monolayers (2D cultures). This work focuses on the study of the behaviour of these bacteria in tumor spheres or spheroids, an *in vitro* 3D model that resembles more closely solid tumor masses and their complex metabolic microenvironment. By labeling with different fluorescent proteins bacteria with synthetic adhesins binding EGFR, Her2 and non-relevant control antigens we have been able to demonstrate that recognition of the tumor cell by the adhesin strongly enhances the colonization of tumor spheroids, both from colon and breast carcinomas. These results allow us to use spheroids as a potent *in vitro* model to test the efficacy of engineered *E. coli* strains with synthetic adhesins and therapeutic cargoes against human tumors prior to further *in vivo* studies.

### Bibliografía

1. Piñero-Lambea C, Bodelón G, Fernández-Periáñez R, Cuesta AM, Álvarez-Vallina L, Fernández LÁ. Programming controlled adhesion of *E. coli* to target surfaces, cells, and tumors with synthetic adhesins. *ACS Synth Biol.* 2015 Apr 17;4(4):463-73.



## El papel de los metales en la depredación bacteriana

Francisco Javier Contreras-Moreno<sup>1</sup>, Juana Pérez<sup>1</sup>, María José Soto<sup>2</sup>, Aurelio Moraleda-Muñoz<sup>1</sup> and José Muñoz-Dorado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Granada.

<sup>2</sup>Estación Experimental del Zaidín, CSIC.

[currocm@ugr.es](mailto:currocm@ugr.es)

*Myxococcus xanthus* es una bacteria depredadora del suelo con un comportamiento social complejo. Su cooperatividad le permite coordinarse para depredar tanto microorganismos procariotas como eucariotas. Para llevar a cabo esta depredación, producen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, antibióticos y metabolitos secundarios para matar a sus presas y obtener nutrientes (1). Por otro lado, se ha demostrado que los depredadores eucariotas, como los macrófagos y las amebas, utilizan varios sistemas de intoxicación por metales para matar a sus presas (2). Sin embargo, se desconoce si estos sistemas son utilizados por los organismos procariotas para la depredación (3). Como presa hemos utilizado *Sinorhizobium meliloti*, otra bacteria del suelo que se encuentra en simbiosis con las plantas leguminosas formando nódulos en las raíces que asimilan nitrógeno atmosférico para la planta, por lo que es de gran interés agrícola. En la actualidad, nos hemos centrado también en estudiar el papel del hierro en la depredación. Por ello, hemos utilizado diferentes metodologías, como ensayos de depredación de mutantes de delección en genes que codifican proteínas implicadas en la captación de hierro, estudios de estos genes fusionados al gen *lacZ*, estudios de microscopía y análisis transcriptómicos, entre otras técnicas.

En nuestro grupo, hemos demostrado que *M. xanthus* es la primera bacteria conocida que utiliza sistemas de detoxificación de cobre para acumular este metal en la interfase de depredación y generar estrés oxidativo que puede ayudar a matar a su presa. En esta interacción *S. meliloti* produce un pigmento de tipo melanina para defenderse del estrés oxidativo generado por la acumulación de cobre. Por otro lado, estamos investigando la importancia de los sistemas de transporte y captación de hierro, como la producción de sideróforos, en la depredación de *M. xanthus*, ya que, al igual que el cobre, el hierro también se acumula en la interfase de la depredación. El hierro es tan importante que, en entornos ricos en hierro, *M. xanthus* es capaz de depredar presas muy resistentes a la depredación, mientras que mutantes de delección en dichos sistemas son incapaces de depredar algunas presas que normalmente depredaría.

### Referencias:

1. Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., y Muñoz-Dorado, J. (2016). Bacterial predation: 75 years and counting! *Environmental Microbiology*, 18(3), 766–779.
2. Hodgkinson, V., and Petris, M. J. (2012). Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13549–13555.
3. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., and Moraleda-Muñoz, A. (2018). The complex global response to copper in the multicellular bacterium *Myxococcus xanthus*. *Metallomics*, 10(7), 876–886.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de España (PID2020-112634GB-I00) y fondos FEDER (A-BIO-126-UGR20).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Optimization of bacterial recombineering by *in vivo* production of single-stranded DNA

Alejandro Gonzalez-Delgado<sup>1</sup>, Alfonso Matias Rojas-Montero<sup>1</sup>, Seth L. Shipman<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gladstone Institute of Data Science and Biotechnology, San Francisco, CA, USA. <sup>2</sup>Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, University of California, San Francisco, CA, USA  
[alejandrogonzalez@gladstone.ucsf.edu](mailto:alejandrogonzalez@gladstone.ucsf.edu)

In the last years a potential tool to produce template DNA inside cells is a bacterial system called retron that recently has been shown to be involved in phage defense<sup>1,2</sup>. Retrons are tripartite systems composed by a reverse transcriptase (RT) a contiguous non-coding RNA (ncRNA) with two region *msr* and *msd*, and an additional protein or RT-fused domain with diverse enzymatic functions<sup>3</sup>. Targeted reverse-transcription activity of retons is being used to produce a specific single-stranded DNA (ssDNA) donor *in vivo* via engineering *msd* region<sup>4,5</sup>. However, only a couple of examples of retons have been used for this purpose. Here, we characterize more than 20 retron orthologs showing RT-DNA production and identifying a highly active subset that exhibits efficient recombineering activity in different *Escherichia coli* strains. Furthermore, we optimize the activity of this subset by testing architectures of the retron operon that enable efficient reverse transcription and subsequently increase recombineering efficiency. With the aim of modifying in parallel two or more specific DNA loci in a bacterial genome, we designed new retron variants that encoded several ssDNA donors in a single *msd* showing that this group of prokaryotic RTs represent a versatile bioengineering tool for multiplexed genome editing technologies. Thus, our findings provide a basis for future studies on the biological function of retons and for expanding their biotechnological applications.

### References:

1. Millman A, Bernheim A, Stokar-Avihail A *et al.* Bacterial retons function in anti-phage defense. *Cell* 2020;183:1551–61.e12.
2. Gao L, Altae-Tran H, Bohning F *et al.* Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science* 2020;369:1077–84.
3. Mestre MR, Gonzalez-Delgado A, Gutierrez-Rus LI *et al.* Systematic prediction of genes functionally associated with bacterial retons and classification of the encoded tripartite systems. *Nucleic Acids Res* 2020;48:12632–47.
4. Schubert MG, Goodman DB, Wannier TM *et al.* High throughput functional variant screens via in-vivo production of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci* 2021;118:e20181811182020.
5. Lopez, S.C., Crawford, K.D., Lear, S.K. *et al.* Precise genome editing across kingdoms of life using retron-derived DNA. *Nat Chem Biol* 2022;18, 199–206



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## The genetic basis of fast-growth adaptation in cyanobacteria, revealed by long term evolution

Alfonso Mendaña (1), Maria del Mar Santos-Merino (1), Raquel Gutierrez-Lanza (1), Carlos Diaz (1), Ana Gonzalez-Guerra(1), Victor Campa(1), Rocio Lopez-Igual (2), Daniel Volke (3) Pablo I Nikel (3), Didier Mazel (2), Fernando de la Cruz (1) and Raul Fernandez-Lopez (1)\*

- (1) Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBT)- CSIC-Universidad de Cantabria. Santander. Spain
- (2) Institut Pasteur, Paris , France.
- (3) The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

[raul.fernandez@unican.es](mailto:raul.fernandez@unican.es)

Because their metabolic versatility and their photosynthetic nature, cyanobacteria are promising candidates for the generation of carbon-neutral biofuels and CO<sub>2</sub> capture strategies. The development of a cyanobacteria-based biotech is limited, however, by the relatively slow growth rate they exhibit, when compared to heterotrophic bacteria. Natural isolates of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 show a remarkable variability in terms of growth rate despite their genetic homogeneity, thus suggesting a considerable degree of phenotypic plasticity. To study this end, we performed a long-term evolution experiment, growing *Synechococcus* for 1000 generations under continuous high light conditions. The resulting strain exhibited a growth rate nearly 3 times faster than the wild type, yet this growth advantage was contingent on the continuous supply of light at high intensities. As a tradeoff, the evolved strain was unable to grow in conventional light-dark cycles, and suffered from darkness-induced lethality. Genome sequencing showed that this extreme phenotypic change was achieved with just 4 point mutations. Sequential introduction of candidate mutations into the genome of the *wt* allowed us to identify those responsible for the phenotype. Live-cell fluorescence microscopy, along with transcriptomic and metabolomic analyses, were used to dissect the molecular causes behind the different growth rates. Results showed that partial abolishment of the circadian cycle at the level of *sigC*, an RNA polymerase sigma factor, allowed *Synechococcus* to grow significantly faster than the *wt*, yet this growth was contingent on a continuous photosynthetic activity for redox detoxification. Our results demonstrate that minor adjustments of internal circuitry are enough for *Synechococcus* to quickly adapt to radically different light regimes. Moreover, genes mutated in our study are conserved across most cyanobacterial species, opening the possibility of developing fast-growing strains of industrial interest.



## **Diseño de nuevas herramientas moleculares útiles en la prevención de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en plantas de tratamiento de aguas residuales.**

David Correa Galeote<sup>1,2</sup>, Lizandra Pérez Bou<sup>2,3</sup>, Belén Rodelas<sup>1,2</sup>, Alejandro González Martínez<sup>1,2</sup>, Jesús González López<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología.

<sup>2</sup> Universidad de Granada, Instituto del Agua, Sección de Microbiología y Tecnologías Ambientales.

<sup>3</sup> Universidad de La Habana. Departamento de Microbiología y Virología.

[dcorrea@ugr.es](mailto:dcorrea@ugr.es)

El uso incorrecto de las sustancias antibióticas ha derivado en el aumento de la aparición de bacterias resistente a antibióticos (ARB), lo que reduce su efectividad terapéutica. De manera específica, las estaciones depuradoras de tratamiento de aguas residuales (EDAR) constituyen un importante reservorio de ARB, siendo fundamental analizar su dinámica para prevenir la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos (ARG) en el medio ambiente. En este sentido, la PCR a tiempo real (qPCR) ha sido ampliamente utilizada para la cuantificación de los distintos ARG. Sin embargo, la precisión de estas herramientas moleculares frecuentemente está comprometida debido a su incapacidad para amplificar de manera global la compleja diversidad de las poblaciones de ARB.

Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo diseñar nuevas herramientas moleculares con una mayor precisión en la detección y cuantificación de los genes de resistencia a antibióticos beta-lactámicos (*ampC*, *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM* y *mecA*), ya que son los agentes antimicrobianos más empleados en la práctica clínica.

Con esta finalidad se seleccionaron las secuencias ortólogas a estos genes depositadas en la base de datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) y se diseñaron las correspondientes parejas de primers en el software Geneious Prime (Biomatters). Además, se construyeron los estándares necesarios para la cuantificación absoluta de los distintos ARG, tras la validación de los nuevos primers tanto *in silico* como *in vivo*. Finalmente, se cuantificaron los ARG en muestras de biomasas de dos EDARs, una a escala real y otra a escala piloto.

De este modo, la puesta a punto de los distintos protocolos de qPCR permitió la cuantificación del número de copias de los distintos genes de resistencia a beta-lactámicos en las biomasas, cuyas abundancias fueron estadísticamente diferentes tanto entre plantas de tratamiento como entre fechas de muestreo, lo que indica que la dinámica de estas poblaciones es altamente cambiante. Por otra parte, las abundancias de las distintas poblaciones de ARB variaron entre sí, lo que sugiere una selección de los mecanismos de resistencia prevalentes en las distintas EDARs.

Por lo tanto, las nuevas herramientas moleculares diseñadas permiten una cuantificación efectiva de las ARB y son útiles para el estudio de la dinámica de los ARG beta-lactámicos en muestras de EDAR así como en otros ecosistemas.



## Producción de nanocelulosa bacteriana por *Starkeya* sp. STN1A

Castillo-Rodríguez, Inés; Fernández-González, Rocío; Martirani-von Abercron, Sophie-Marie; Marín, Patricia; Zegers, Jaccoline; Pacheco, Daniel y Marqués, Silvia

Departamento de Protección Ambiental, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada  
[sophie.martirani@eez.csic.es](mailto:sophie.martirani@eez.csic.es)

La enorme capacidad de los microorganismos de contribuir a la economía circular se ha venido aplicando con éxito a la recuperación de residuos, especialmente valiosa cuando los regenera en productos de valor añadido. Entre ellos, la capacidad para sintetizar nanocelulosa en forma prácticamente pura ha ampliado notablemente el campo de aplicación de esta biotecnología. La nanocelulosa bacteriana, un biopolímero ecológico, seguro, biodegradable y químicamente puro, se considera una alternativa atractiva al uso de fibras sintéticas derivadas del petróleo, perfectamente aplicable a la fabricación de materiales compuestos. Hasta ahora esta capacidad se ha centrado en un pequeño grupo de bacterias pertenecientes a las Acetobacterias, capaz de excretar al medio cantidades abundantes de nanocelulosa. A partir de cultivos de enriquecimiento en residuos de petróleo, hemos aislado la cepa *Starkeya* sp. STN1B perteneciente a las *Xanthobacteraceae* por su capacidad para producir nanocelulosa creciendo con naftaleno como única fuente de carbono [1, 2]. La cepa tiene una gran diversidad metabólica y es capaz de utilizar un elevado número de sustratos, incluyendo una variedad de residuos agrícolas e industriales. La celulosa producida tiene las características típicas de nanocelulosa bacteriana, constituida por fibras de aproximadamente 60 nm de diámetro y varias micras de longitud. Los datos de FTIR y difracción de rayos X confirman que se trata de celulosa de tipo I. A partir de STN1B y mediante selección en naftaleno, hemos aislado el mutante espontáneo STN1A con una capacidad muy aumentada de producir celulosa. La comparación de ambos genomas muestra que STN1A presenta una delección de 62 kb, que incluye un cluster *rpf* modificado que codifica para un sistema de *quorum sensing* (QS) dependiente de factores de señalización difusibles (autoinductores), con similitudes con el sistema bien caracterizado de *Xanthomonas*. El genoma de la cepa incluye un operón de tipo III para la síntesis de celulosa (semejante al de *Agrobacterium*) y las rutas necesarias para el metabolismo de glicerina. Mediante mutagénesis dirigida hemos demostrado que el sistema *rpf* es el responsable de la alta tasa de producción de la cepa al alterar los niveles de c-di-GMP que controlan la actividad de la celulosa sintasa, y hemos identificado la molécula que actúa como autoinductor del sistema de QS.

### Referencias

- [1] Marín P, Martirani-Von Abercron SM, Algar I, Castañeda-Cataña M, Pacheco-Sánchez D, Eceiza A, Marqués S. 2019. *Microb Biotechnol* **12**:662-676. [doi: 10.1111/1751-7915.13399](https://doi.org/10.1111/1751-7915.13399)
- [2] Martirani-Von Abercron SM, Marín P, Solsona-Ferraz M, Castañeda-Cataña MA, Marqués S. 2017. *Microb Biotechnol* **10**:1781-1796. [doi: 10.1111/1751-7915.12842](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12842)

### Agradecimientos

Este trabajo es parte de los proyectos de I+D+i PLEC2021-008210 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la "Unión Europea NextGenerationEU/PRTR", y P20\_00328, financiado por la Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades de la Junta de Andalucía y cofinanciada por FEDER Andalucía 2014-2020 "Crecimiento inteligente: una economía basada en el conocimiento y la innovación".





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Expresión heteróloga de proteasas virales en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae***

Óscar A. Barbero, Elba del Val, Marta Valenti, María Molina, Víctor J. Cid, Teresa Fernández-Acero.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

[oscaralb@ucm.es](mailto:oscaralb@ucm.es)

Las proteasas virales son proteínas necesarias para la maduración de aquellos virus que expresan su material genético en forma de una única poliproteína. Además, también pueden actuar como factores de virulencia, siendo capaces de procesar proteínas fundamentales para llevar a cabo una respuesta inmunitaria efectiva contra el virus que está produciendo la infección. Muchos virus necesitan de estas proteasas para continuar con su ciclo vital, como el VIH o el virus de la gripe. Entre ellos se encuentra el SARS-CoV-2, agente etiológico de la pandemia que se desencadenó en 2020, que es un virus de ARN monocatenario polaridad + cuyo genoma se organiza en 14 ORFs, 2 de los cuales dan lugar a 2 poliproteínas (pp1a y pp1ab) que, a su vez, tras su maduración, dan lugar a 16 proteínas no estructurales. Para procesar estas poliproteínas y poder seguir su ciclo replicativo, el SARS-CoV-2 presenta 2 proteasas de cisteína: PLpro (nsp3d) y 3CLpro (nsp5 o Mpro).

En el presente trabajo hemos expresado y estudiado las proteasas PLpro y 3CLpro junto con sus versiones catalíticamente inactivas en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es una excelente plataforma de estudio debido a su versatilidad, su simplicidad y su homología con las células eucarióticas superiores. Mediante ensayos de crecimiento en medio sólido hemos analizado los efectos de su expresión, observando una inhibición drástica del crecimiento cuando se sobreexpresa 3CLpro, mientras que la sobreexpresión de PLpro produce una inhibición parcial del crecimiento que puede incrementarse al someter a la levadura a distintas condiciones de estrés. Esta inhibición del crecimiento ha sido el primer paso para poner a punto un modelo de ensayo farmacológico en *Saccharomyces cerevisiae*, en el que compuestos capaces de inhibir de forma selectiva y eficaz a las proteasas provocan una recuperación del crecimiento. Para ello, hemos empleado cepas carentes de bombas de eflujo para impedir la salida de los compuestos de la célula, optimizando así el efecto inhibitorio de dichos compuestos. La validación de este modelo para 3CLpro utilizando inhibidores conocidos de esta proteasa (GC376 o mPro N3) ha mostrado resultados prometedores en cuanto a su aplicabilidad.

**Agradecimientos**

Esta investigación está financiada por el proyecto de investigación S2017/BMD-3691 (InGEMICS-CM) de la Comunidad de Madrid y Fondos Estructurales Europeos.



## Optimization of the *in vivo* mutagenesis system T7-DIVA for directed evolution of proteins

Álvarez, B., Crespo, D., Fernández, L.A.

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

[balvarez@cnb.csic.es](mailto:balvarez@cnb.csic.es)

The directed evolution of proteins has the potential to generate proteins with new or improved functions (e.g. antibodies with increased affinity, enzymes with enhanced or new activities, cell receptors recognizing new ligands, etc.). In our laboratory we have previously developed an *in vivo* directed evolution method that allows the continuous evolution of proteins by iterative cycles of diversification and selection[1]. This method was named T7-DIVA (T7-targeted dCas9-limited *in vivo* mutagenesis) and its specificity is based on placing a T7 promoter downstream of the target gene and directed towards it. The target gene is integrated in single copy in the *Escherichia coli* genome to avoid genetic redundancy and thus facilitating a continuous evolution process. The T7 promoter is recognized by a T7 RNA polymerase (T7RNAP) that is fused to a base deaminase (BD) enzyme with mutagenic capacity. The T7RNAP would start the transcription moving along the target gene, dragging the BD that would introduce mutations. The BD of the fusions could be the cytosine deaminases (human AID, rat rAPOBEC1 or lamprey pmCDA1) and the adenine deaminase Tada7.10 that create transitions C:G to T:A and T:A to C:G, respectively. The high processivity of the T7RNAP provokes the generation of off-target mutations beyond the target gene, so to protect the downstream regions from the mutagenic activity of the fusion, the method employs three molecules of dCas9 bound to the DNA directed with three specific crRNAs that blocks the progression of the fusion. This strategy reduces up to 15 times the frequency of mutations in the protected areas but not a total blockade. It has been described that deletions and point mutations in the thumb domain of the T7RNAP presented reduced processivity[2, 3]. In order to strengthen the dCas9 blockade of the T7-DIVA, we designed different versions of AID-T7RNAP fusion with deletions and point mutations in the thumb domain of the T7RNAP. These AID-T7RNAP versions presented reduced activity or processivity, thus reducing the off-target mutations and significantly improving the control of the T7-DIVA system.

1. Álvarez, B., et al., *In vivo diversification of target genomic sites using processive base deaminase fusions blocked by dCas9*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 6436.
2. Bonner, G., E.M. Lafer, and R. Sousa, *The thumb subdomain of T7 RNA polymerase functions to stabilize the ternary complex during processive transcription*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(40): p. 25129-25136.
3. Briebe, L.G., V. Gopal, and R. Sousa, *Scanning mutagenesis reveals roles for helix n of the bacteriophage T7 RNA polymerase thumb subdomain in transcription complex stability, pausing, and termination*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10306-13.



## **Diseño *in silico* y obtención de cepas mejoradas en la producción de ectoínas en *Chromohalobacter salexigens* mediante Ingeniería metabólica de sistemas**

Martínez-Martínez, L., Salvador, M., Nieto J.J., Argandoña M., Vargas, C.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.  
[loumartinez@us.es](mailto:loumartinez@us.es)

*Chromohalobacter salexigens* es una bacteria halófila, productora natural de solutos compatibles en respuesta al estrés osmótico y térmico, que le permite crecer óptimamente en un rango amplio de salinidades (0.5 - 3 M NaCl en medio mínimo). Entre estos compuestos se encuentran las ectoínas, con un enorme potencial biotecnológico debido a sus propiedades bioestabilizadoras y protectoras [1]. Para facilitar la obtención de cepas superproductoras de estos osmoprotectores, se emplean herramientas de Biología de Sistemas, como los Modelos metabólicos a Escala Genómica (GEM), que permiten simular computacionalmente el metabolismo celular.

Para abordar este objetivo, previamente desarrollamos un GEM de *C. salexigens*, denominado iLM541, obtenido a partir de una reducción parcial del modelo previo iFP764 [2], diseñado para simular la respuesta metabólica celular a baja y elevada salinidad (0,6 M y 2,5 M de NaCl), condiciones de baja y elevada producción de ectoínas, respectivamente. Este modelo se utilizó junto con el algoritmo OptKnock [3] para predecir mutantes “knockout” que generaran cepas optimizadas en ambas condiciones. Así, el algoritmo predijo, en ambos casos, la eliminación de tres reacciones del metabolismo central de *C. salexigens*, y sus genes asociados. Además, se empleó el modelo iLM541 para comprobar la influencia que tenían estas perturbaciones genéticas en el comportamiento metabólico celular, mediante un análisis de flujos *in silico*. Para ello, se utilizó el método de “Monte-Carlo random sampling”, que calcula las diferencias de distribución de flujos metabólicos entre la cepa silvestre y los mutantes, para analizar su reordenamiento. Finalmente, se implementaron las predicciones, obteniéndose *in vivo* mutantes “knockout” simples y múltiples (eliminando los genes asociados a las tres reacciones), se estudió el patrón de crecimiento de estas cepas a diferentes salinidades y se determinó la concentración intracelular de ectoínas.

Los resultados obtenidos muestran diferencias en el perfil de flujos y de crecimiento del mutante múltiple con respecto a la estirpe silvestre, así como una mayor acumulación de ectoínas en ambas salinidades. Esto indica que el modelo metabólico iLM541 es capaz de simular *in silico* el metabolismo de *C. salexigens*, siendo una herramienta eficaz para el diseño racional de cepas superproductoras de ectoínas.

### **Referencias:**

1. Pastor, J.M., Bernal, V., Salvador, M., Argandoña, M., Vargas, C., Csonka, L., Nieto, J.J., Cánovas, M. 2013. Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. J. Biol. Chem. 288:17769-17781
2. Piubeli, F., Salvador, M., Argandoña, M., Nieto, J.J., Bernal, V., Cánovas, M., Vargas, C. 2018. Insights into metabolic osmoadaptation of the ectoines-producer bacterium *Chromohalobacter salexigens* through a high-quality genome scale metabolic model. Microb. Cell Fact. 18:134.-149.
3. Burgard, A.P., Pharkya, P., Maranas, C.D. 2003. Optknock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. Biot.Bioeng. 84:647-57.

### **Financiación:**

Proyecto (PID2019-111273RB) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación I00/AEI/10.13039/501100011033. Programa Operativo FEDER 2014-2020 y Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad de la Junta de Andalucía (US-1380847).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Identificación y análisis de clusters biosintéticos de biosurfactantes y sideróforos en bacterias halófilas moderadas

Arranz A, Antón T, Nieto JJ, Vargas C, Argandoña M

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.  
[aarras02@gmail.com](mailto:aarras02@gmail.com)

En la actualidad, los compuestos anfílicos, tales como los biosurfactantes y algunos tipos de sideróforos, presentan un elevado interés biotecnológico debido a su naturaleza dual (hidrófila e hidrófoba) que posibilita la formación de estructuras supramoleculares como las micelas. Estas estructuras tienen múltiples aplicaciones en medicina, cosmética, farmacia, alimentación y agricultura. El objetivo de este trabajo es aprovechar la versatilidad metabólica, bajos requerimientos nutricionales y capacidad de adaptación a condiciones adversas de las bacterias halófilas moderadas para encontrar y generar nuevos biosurfactantes como sideróforos con propiedades específicas para la Industria.

Para ello, se han recopilado más de 900 especies de bacterias halófilas moderadas a partir de publicaciones científicas y bases de datos. Posteriormente, en los genomas disponibles, se ha realizado una búsqueda y análisis de los grupos de genes biosintéticos (BGC, "biosynthetic gene cluster") responsables de la síntesis de biosurfactantes y sideróforos mediante la herramienta bioinformática de predicción antiSMASH (1). En total, de los 472 genomas analizados, se han identificado más de 140 y 160 BGCs que codifican para la producción de biosurfactantes y sideróforos, respectivamente. Estos BGCs están presentes en diversas clases bacterianas, entre las que destacan las clases Gammaproteobacteria y Bacilli, para ambos tipos de compuestos. En lo que respecta a la diversidad taxonómica, estos BGCs han sido identificados en más de 50 y 70 géneros diferentes para cada uno de los compuestos de interés, siendo *Halomonas*, *Halobacillus* y *Marinobacter* los géneros más representativos. Asimismo, cabe resaltar la variabilidad estructural y genética encontrada en los genomas de los potenciales productores de los compuestos de interés. Destaca especialmente el grupo de los sideróforos, en el cual se han identificado 29 tipos distintos de clústeres biosintéticos, mientras que en el caso de los biosurfactantes se han predicho 7 tipos. En base a los resultados obtenidos, se llevará a cabo una selección de posibles cepas productoras, que asegure la máxima diversidad taxonómica y estructural, las cuales serán posteriormente analizadas *in vivo* para confirmar la actividad biosintética. El siguiente paso será la obtención de nuevos compuestos híbridos "a la carta", combinando elementos de las distintas moléculas de interés mediante ingeniería genética.

### Referencia:

(1) Kai Blin et al (2021) antiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49: W29-W35. DOI 10.1093/nar/gkab335.

### Financiación:

This project has received funding from the European Community's H2020 Programme under the Grant agreement Nr. 101000794.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**Bacterias promotoras del crecimiento de plantas asociadas al aumento en concentración de metano.**

Adoración Barros-Rodríguez<sup>1,2</sup>, Carlos García-Gálvez<sup>2</sup>, Yasmira Enrique-Cruz<sup>2</sup>, María García-Toledo<sup>1</sup>, Pamela Pacheco<sup>1</sup>, Antonio Castellano-Hinojosa<sup>1</sup>, Maximino Manzanera<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto de Microbiología, Instituto del Agua. Universidad de Granada.

<sup>2</sup>VitaNtech Biotechnology S.L. Granada.

[manzanera@ugr.es](mailto:manzanera@ugr.es)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR del inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) son alternativas ecológicas a los fertilizantes químicos tradicionales. Sin embargo, para ser competitivos en el mercado, su costo de producción debe reducirse empleando nutrientes alternativos como parte de sus medios de cultivo. Las emisiones de metano representan una gran amenaza para el medio ambiente al contribuir significativamente al calentamiento global. El uso del metano como fuente de carbono para el crecimiento de PGPR podría constituir una alternativa de bajo costo ya que es un residuo, y por otro lado con su empleo contribuimos a reducir la emisión de gases de efecto invernadero. En el presente estudio describimos el aislamiento y caracterización de comunidades bacterianas mixtas que consisten en bacterias oxidadoras de metano (metanótrofas) y no metanótrofas asociadas como un biofertilizante alternativo.

**Agradecimientos:**

Este trabajo se ha realizado gracias a los proyectos financiados por la Junta de Andalucía (Ref: P18-RT-976) y por el Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2017-91737-EXP) y la Unión Europea, así como a la Empresa VitaNtech Biotechnology S.L..



## **Desarrollo de un biosensor de proteínas amiloides basado en la porina OmpF ensamblada en nanodiscos**

M. Luz Blasco-Santamaría, Rafael Giraldo

Dpto. de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, Campus Cantoblanco, Madrid

[ml.blasco@cnb.csic.es](mailto:ml.blasco@cnb.csic.es), [rgiraldo@cnb.csic.es](mailto:rgiraldo@cnb.csic.es)

Los amiloides son agregados muy estables formados por ensamblajes beta-laminares de proteínas. Presentan un potencial citotóxico acusado, estando implicados en la contaminación persistente de suelos y vegetales (priones), mientras que, cuando son secretados por la microbiota intestinal, actúan como agentes proinflamatorios en la etiología de enfermedades neurodegenerativas. La detección de la presencia de dichos agregados, su neutralización y eliminación son objetivos de gran interés para la biorremediación de ambientes naturales y por su posible aplicación profiláctica en biomedicina. Nuestro objetivo es diseñar, a partir de proteínas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, biosensores específicos de amiloides. Con tal fin, se generó recientemente una adhesina sintética a partir de OmpF, una porina de la membrana externa de *Escherichia coli* con capacidad para fijar proteínas y péptidos amiloides en la superficie bacteriana (1). En esta comunicación, presentamos la reconstitución de dichas adhesinas en sistemas modelo *in vitro* de membrana (nanodiscos), para realizar ensayos de interacción que permitan caracterizar con detalle el reconocimiento de los amiloides por la porina. Los nanodiscos son bicapas lipídicas nanoparticuladas que pueden autoensamblar proteínas de membrana, formados a partir de fosfolípidos y una proteína helicoidal anfipática (*membrane scaffold protein*, MSP) (2). Los nanodiscos permiten tener mantenidas solubilizadas moléculas únicas de proteínas de membrana ofreciendo ventajas sobre liposomas o micelas de detergente en términos de tamaño y estabilidad, permitiendo así acometer estudios de microscopía y espectroscopía con moléculas únicas. Las adhesinas OmpF integradas en nanodiscos permitirán la caracterización biofísica *in vitro* de las interacciones entre las bacterias biosensoras y sus dianas amiloides *in vivo*.

### **Bibliografía**

1. Vendrell-Fernández S, y col. (2022) *ACS Synth Biol* 11: 655-667.
2. Ritchie, T.K., y col. (2009) *Methods in Enzymology* 464: 211-231.



## A fast and reliable genetic barcoding strategy to confirm antibiotic resistance genotype-phenotypes in *Mycobacterium abscessus*

J. Calvet-Sera<sup>1,2\*</sup>; E. Crespo-Yuste<sup>1,2</sup>; C. Martín<sup>1,2,3</sup>; A. Martín<sup>4</sup>; J. Gonzalo-Asensio<sup>1,2,5\*\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Genética de Micobacterias, Dpto. Microbiología. Fac. Medicina, Universidad de Zaragoza, IIS Aragón, Zaragoza; <sup>2</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid; <sup>3</sup>Servicio de Microbiología Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza; <sup>4</sup>Department of Microbiology, Institute of Experimental and Clinical Research, Laboratory of Medical Microbiology, Université catholique de Louvain (UCLouvain) & Syngulon, Seraing, Belgium; <sup>5</sup>Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI)

\* [icalvet@unizar.es](mailto:icalvet@unizar.es), \*\* [jagonzal@unizar.es](mailto:jagonzal@unizar.es)

Infections caused by nontuberculous mycobacteria are increasing worldwide (1). Of those, *Mycobacterium abscessus* is the major cause of infections, especially in patients with cystic fibrosis or chronic obstructive disease (2, 3). Similarly to multidrug-resistant (MDR) tuberculosis, *M. abscessus* diseases are difficult to treat due to the limited therapeutic arsenal and development of drug resistance (4), resulting in a treatment success rate less than 50% (5)

A clinical isolate of *M. abscessus* showing bedaquiline resistance was sequenced, and a novel mutation in the *atpE* gene was identified. To establish a direct genotype-phenotype relationship of the D29A mutation, we developed a recombineering-based method (6) consisting of the specific replacement of the desired mutation in the chromosome of the *M. abscessus* ATCC19977 reference strain. The substrate used in recombineering carried a genetic barcode consisting of silent mutations in codons flanking the *atpE* D29A mutation. After selection of bedaquiline resistant colonies, transformed with substrates, carrying either the sole D29A mutation, or the mutation with the barcode, we obtained similar numbers of bedaquiline resistant transformants. These colonies were confirmed by Sanger sequencing and allele-specific PCR, demonstrating the presence of the genetic barcode in its specific location in the chromosome. All recombinant strains displayed the same profile of bedaquiline resistance compared to the original clinical isolate from which the D29A mutation was identified. In addition, we also demonstrate the suitability of this method to directly assess an unrelated mutation in the *atpE* gene, A64P, also conferring bedaquiline resistance. To confirm the reproducibility of this technique, we successfully reproduced results of the D29A and A64P mutations using two independent reference strains of *M. abscessus*. Analogs of these two mutations have been reported also in *M. tuberculosis* (7).

Overall, our genetic barcoding strategy represents a fast and reliable approach to confirm potential antibiotic resistance mutations identified by current genome sequencing techniques, as facilitates allele confirmation by PCR without need of Sanger sequencing, shortening times. We envisage a potential extension of this technique to mycobacteria other than *M. abscessus*, and also its application to study virulence, physiology and biological traits of the *Mycobacterium* genus.

1. Ratnatunga, C. N. *et al.* The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Frontiers in Immunology* (2020). PMID: 32194556
2. Griffith, D. E. *et al.* Treatment of *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease. *Chest* (2022). PMID: 34314673
3. Floto, R. A. *et al.* US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* (2016). PMID: 26666259
4. Nessar, R., Cambau, E., Reyat, J. M., Murray, A. & Gicquel, B. *Mycobacterium abscessus*: A new antibiotic nightmare. *J. Antimicrob. Chemother.* (2012). PMID: 22290346
5. Victoria, L., Gupta, A., Gómez, J. L. & Robledo, J. *Mycobacterium abscessus* complex: A Review of Recent Developments in an Emerging Pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (2021). PMID: 33981630
6. van Kessel, J. C. *et al.* Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat. Rev. Microbiol.* (2008). PMID: 18923412
7. Segala, E. *et al.* New mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-Ring structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2012). PMID: 22354303



## **La región N-terminal de TasA es esencial en proceso de amiloidogénesis y formación de biofilm en *B. subtilis***

Laura Domínguez García, Jesús Cámara-Almirón, Antonio de Vicente y Diego Romero.

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"-Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Bulevar Louis Pasteur, 31 (Campus Universitario de Teatinos), 29071 Malaga, Spain.

Las proteínas amiloides tienen la tendencia natural de formar fibras insolubles a partir de monómeros solubles, un proceso que implica la formación de agregados de distintos tamaños, y con distintas conformaciones. Una de las características definitorias de las fibras amiloides es el enriquecimiento en láminas beta que confieren propiedades tintoriales, bioquímicas y biológicas. A pesar de preservar la denominación patológica, los amiloides median funciones que son esenciales para la homeostasis celular o la adaptación al entorno. En *Bacillus subtilis*, la proteína amiloide TasA desempeña varias de estas funciones: i) estructural, contribuyendo al ensamblaje de la matriz extracelular, ii) celular, preservando la fluidez y funcionalidad de la membrana, iii) señalización, manteniendo ciertas subpoblaciones celulares. Por lo tanto, resulta esencial conocer los residuos o dominios de la proteína que hacen posible a TasA transitar entre las distintas conformaciones, como paso previo a entender esta diversidad de funciones. En trabajos previos (1), estudiamos las propiedades estructurales de TasA en su forma fibrilar, y mediante la digestión con proteínasa K demostramos la existencia de una región resistente en la mitad amino terminal y que denominamos el núcleo amiloide. En este trabajo se ha estudiado esta región mediante el uso de diversas aproximaciones, genética, bioinformáticas, bioquímicas o biofísicas. Como resultado hemos detectado la existencia de residuos aminoácidos y regiones conservadas que parecen ser esenciales al menos en el proceso de amiloidogénesis, y por tanto en el papel estructural involucrado en la formación de biofilm.

(1) El Mammeri, Nadia et al. 2019. Molecular architecture of bacterial amyloids in *Bacillus* biofilms. *The FASEB Journal*. 33: 12146-12163.

Trabajo financiado por: Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107724GB-I00), European Research Council Starting Grant (BacBio 637971) and Junta de Andalucía PAIDI 2020 (P20\_00479). Trabajo realizado por Laura Domínguez García con beca FPI (PRE2020-094975)





XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## Isolation and characterisation of microbial consortia for the degradation of emerging pollutants

Maitane Juárez-Mugarza, Pilar Navarro-Gómez, José Manuel Garrido, Amando Flores, Inés Canosa

Universidad Pablo de Olavide, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC, Junta de Andalucía, 41013 Seville, Spain  
[icanper@upo.es](mailto:icanper@upo.es)

Emerging pollutants are defined as any chemical of synthetic or natural origin that is uncontrolled in the environment, with ecological and potential adverse effects on human health. Among these pollutants, there are certain pharmaceuticals of particular concern worldwide. At present, wastewater treatment plants (WWTPs) are not able to prevent this environmental threat, as even in very low quantities, they can cause chronic toxicity and endocrine disruption in humans and aquatic fauna. Our research group has isolated bacterial consortia from these WWTPs, capable of biodegrading naproxen (NPX) and ibuprofen (IBU), two anti-inflammatory compounds whose use has spread dramatically in recent decades. Currently, we have isolated several IBU or NPX degrading consortia from samples obtained from the WWTP of Úbeda (Jaén) and Copero (Seville) by successive enrichments in the corresponding pollutant. Experiments carried out by our research group show that there is a positive correlation between the growth of the consortia and the degradation of the anti-inflammatory agents, which confirms their ability to use them as the sole source of carbon in their growth and to degrade them completely. It has not been possible to select isolated bacteria capable of using the compound on their own, indicating the requirement for more than one microbial strain to degrade these drugs. Comparison of the IBU-degrading consortia with the gene cluster described for the bacterial degrading bacterium *Rhizorhabdus wittichii* MPO218<sup>1</sup> previously isolated in our group, shows that some of the genes present in the consortium may be shared in the pathway described for this strain.

1. Aulestia, M., Flores, A., Acosta-jurado, S., Santero, E. & Camacho, E. M. Genetic Characterization of the Ibuprofen-Degradative Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* (2022) doi:10.1128/AEM.00388-22.

This work has been carried out as part of two Master's thesis and with funding from the Ayudas Puente para la Concurrencia al Plan Estatal de I+D from the Plan Propio de Investigación from UPO



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



**pETS-IBECGLOW: A new generation of bacteria promoter-probe and transposon-delivery plasmids**

Domingo Marchan del Pino, Eduard Torrents

Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC),  
[dmarchan@ibecbarcelona.eu](mailto:dmarchan@ibecbarcelona.eu)

Bacterial processes are conditioned by the genic expression from the microorganisms that are under specific environment condition. For that, the analysis of the different parameters which can affect the general phenotype of the bacteria is a good way to study this phenomena. Reporter genes like fluorescent proteins (FP) allowed the study of gene promoter activities and it's regulation *in vivo* or in *in vitro* models. Nowadays several FPs are used for different objectives due to the fact that they are a non-invasive tool in molecular biology. Transcriptional fusions between a promoter of interest and this FPs are a good way to measure the gene activity and it can be done in a plasmid. These are known as promoter-probe vectors, but it's use requires the presence of a selection pressure for its stability and that is usually conferred by an antibiotic addition. For that it is desirable to integrate the promoter-reporter fusions in the bacterial genome to avoid the requirement of antibiotic addition for the plasmid maintenance and integrity. Homologous recombination using suicide vectors, and the utilization of mobile elements like Tn5 transposon system are two main techniques used to insert foreign DNA fragments into the bacterial genome.

In this work, a new generation of promoter-probe and transposon-delivery vectors namely pETS-IBECGLOW were designed and developed. These vectors contain the genes encoding for different FPs, under the regulation of the three promoters of *Pseudomonas aeruginosa* ribonucleotide reductases (RNRs) classes. The plasmids are designed to improve the promotor-dependent FPs expression and preventing the non-specific background leaking.

**Aknowledgements**

This study was partially supported by grants to ET from the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, MINECO, and Agencia Estatal de Investigación (AEI), Spain, co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, FEDER, European Union (RTI2018-098573-B-100), the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2017SGR-1079), the European Regional Development Fund (FEDER), Catalan Cystic Fibrosis association and Obra Social "La Caixa". DM is supported with a FI grant from the Generalitat de Catalunya (2020-FI-B-00175).



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



## **Desarrollo de un sistema de edición genómica CRISPR-Cas de aplicación generalizada en bacterias Gram-negativas**

Guadalupe Martín Cabello, Andrea García Alcaide, Estela Sanz Martí, Sergio Serrano Corral, Marta Pulido Sánchez, Aroa López Sánchez y Fernando Govantes

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Universidad Pablo de Olavide, Consejo Superior de Investigaciones científicas y Junta de Andalucía)

[gmarcab@upo.es](mailto:gmarcab@upo.es)

La rápida emergencia de las herramientas de edición genética basados en los sistemas de inmunidad adquirida CRISPR-Cas presentes en un buen número de bacterias y arqueas ha representado la mayor revolución de la última década en lo que respecta a la manipulación genética dirigida de una gran variedad de organismos. A pesar de que entre las bacterias Gram-negativas se encuentra una inmensa variedad de organismos de gran interés biológico, clínico, ambiental y biotecnológico, los métodos avanzados de edición genómica solo se han aplicado en un número limitado de especies. Con objeto de facilitar la implantación de esta metodología en un número amplio de bacterias Gram-negativas con mínimos requerimientos, hemos desarrollado una plataforma, denominada DEMOCRISPR, compuesta de una colección de vectores plasmídicos de amplio espectro para la producción de (i) las proteínas Cas de distintos sistemas CRISPR-Cas, (ii) gRNAs específicos compatibles con dichos sistemas, (iii) sistemas de reparación mediante empalme no homólogo de extremos (NHEJ), y (iv) sistemas de reparación dirigida por recombinación (HDR) de diversos orígenes. En paralelo, hemos construido una serie de vectores plasmídicos con *reporters* fluorescentes para cuantificar la eficiencia de los procesos de corte de doble cadena y reparación mutagénica. El uso de plásmidos de amplio espectro de hospedador compatibles entre sí para la producción de los complejos endonucleasa CRISPR y los sistemas de reparación, acompañados de espaciadores y secuencias diana estandarizados en *reporters* fluorescentes facilita la exportación de la plataforma a diversas bacterias Gram-negativas sin necesidad de diseñar gRNAs específicos para dianas presentes en cada organismo. Como prueba de principio, en este trabajo presentamos resultados que muestran la implementación de la plataforma DEMOCRISPR en distintas bacterias Gram-negativas.

Este trabajo está financiado por el Programa Operativo FEDER Andalucía, convocatoria 2018 (proyecto UPO-1264127; IP: Fernando Govantes)



**Transcriptionally-dependent plasmid DNA interference mediated  
by a native type III-D CRISPR-Cas system in the pathogen *Vibrio vulnificus***

Alejandro González-Delgado<sup>1,3</sup>, Eva Sanjuán<sup>2</sup>, Nicolás Toro<sup>1</sup>, Carmen Amaro<sup>2</sup>, Daniel Cabrerizo<sup>1</sup> & Francisco Martínez-Abarca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Structure, Dynamics and Function of Rhizobacterial Genomes, Grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain.

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Biotecnología y Biomedicina (BIOTECMED) Fac. Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia. Edificio de investigación. C/ Dr. Moliner, 50, 46100. Burjassot. Valencia. Spain

<sup>3</sup>Current address: Gladstone Institute of Data Science and Biotechnology, San Francisco, CA, USA, [fmabarca@eez.csic.es](mailto:fmabarca@eez.csic.es)

Type III CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR associated genes) systems provide immunity against mobile genetic elements such as phages and plasmids through a mechanism which involved both RNA and DNA cleavage. This ability of type III CRISPR-Cas systems has been used to develop cutting-edge gene-knockdown technologies. Here, we explore the effector activity, measured as plasmid interference, produced by an endogenous type III-D CRISPR complex present in the pathogen strain of YJ016 of *Vibrio vulnificus* (1). We found that this effector module requires a transcriptionally active DNA target to confer immunity against plasmid entry. Furthermore, we show that this RT-CRISPR-Cas system is present as a genomic island of several *Vibrio* species(1,2). Thus, our results settles the basis for the development of novel tools for *Vibrio* genera genome editing based on a native type III-D CRISPR-Cas system.

1. González-Delgado, et al. (2019). NAR 47, 10202–10211.

2. Toro, N., et al. (2019). RNA Biol 16 1486–1493

This work was supported by Grants: THINKINAZUL/2021/027 from ThinkInAzul programme and BIO2017-82244-P; PID2020-113207GB-I00; PID2020-120619RB-I00 of MCIN (Ministerio de Ciencia e Innovación de España) with funding from European Union NextGeneration EU (PRTR-C17.11) and AICO/2020/076 funded by GV (Generalitat Valenciana).



## **Assembly and disassembly of a bacterial killing machine. The importance of recycling the sheath of the Type VI secretion system**

Marina Murillo-Torres<sup>1</sup>, Cristina Civantos<sup>1</sup>, Joaquín Bernal-Bayard<sup>2</sup>, Despoina A.I. Mavridou<sup>3</sup> and Patricia Bernal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

<sup>3</sup> Department of Molecular Biosciences, University of Texas at Austin, Austin (Texas), USA

[mmtorres@us.es](mailto:mmtorres@us.es)

The Type VI Secretion System (T6SS) is a bacterial harpoon-like nanomachine mainly involved in inter-bacterial competition. In the soil bacterium and biocontrol agent *Pseudomonas putida*, it provides the ability to outcompete deleterious phytopathogens such as *Xanthomonas campestris*, protecting plants from their attack<sup>1</sup>.

The T6SS macromolecular structure is formed by a membrane complex, a baseplate and a tail. The tail contains an inner tube (Hcp) loaded with toxins and is surrounded by a high-energy contractile sheath of TssBC proteins. TssBC conformational change leads to sheath contraction, that propels the inner tube outside the attacking and inside the target cell, for toxins delivery. At that point, the contracted sheath is in a low-energy configuration unable to polymerase and contract again. The T6SS-specific AAA+ ATPase, ClpV, regenerates the initial TssBC high-energy configuration allowing a new round of sheath polymerisation and firing. Consistent with this, previous studies in *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* show that ClpV is relevant to maintain T6SS functionality<sup>2-4</sup>. Therefore, a deeper understanding of ClpV in *P. putida* opens the door to optimise T6SS efficiency to enhance the biocontrol capabilities of this agent.

Here, we study ClpV from a functional and biochemical perspective. We use the secretion of the inner tube constituent, Hcp1, as a hallmark of T6SS functionality. A strain lacking *clpV1* was deficient in Hcp1 secretion, implying the T6SS was not functional. The levels of Hcp1 were restored to wildtype levels in a complemented strain as seen by western blot. Interestingly, wildtype levels could be increased by overexpressing *clpV1*. As expected for the secretion assays data, a *clpV1* mutant strain displayed a reduced ability to kill *E. coli* in competition assays. These data indicate that *P. putida* T6SS efficiency could be modulated by ClpV and thus, understanding its interplay with the T6SS complex will allow us to do so. To this end, we identified ClpV1 interaction partners by bacterial two hybrid assays: ClpV1 interacts with the sheath stabilizer TagB1<sup>5</sup> and the core components TssK1 (baseplate), TssA1 (organiser) and TssB1 (tail). This suggests ClpV1 could be positioned in a baseplate and/or tail level to access the sheath as soon as required.

1. Bernal *et al.* (2017). ISME J. 11(4):972-87.
2. Förster *et al.* (2014). J Biol Chem. 289(47):33032-43.
3. Douzi *et al.* (2016). Sci Rep. 6:1-13.
4. Basler *et al.* (2012). Nature. 483(7388):182.6.
5. Bernal *et al.* (2021). PNAS. 118 (7) e2008500118

This work was supported by 2020 Talent Attraction grant of the Universidad de Sevilla to PB.



XIII Reunión del grupo especializado  
**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**  
Granada, 7-9 septiembre 2022



### Developing competition assays in *Bacillus subtilis*

Octavio Reyes-Matte, Javier López-Garrido

Max Planck Institute for Evolutionary Biology  
[reyesmatte@evolbio.mpg.de](mailto:reyesmatte@evolbio.mpg.de)

The quantification of fitness through competition assays has become the gold standard in microbial systems. In these assays, two microbial strains or populations labelled with different markers (usually fluorescent proteins of different colours) are grown together, thereby allowing the direct measurement of their relative contributions to future generations. While showcased in common model microorganisms such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella enterica*, this framework is not well established in the spore-forming bacterium *Bacillus subtilis*. This has impaired the progress of evolutionary biology approaches to study this organism. In this work, we aim at developing a versatile workflow to perform competition assays in *B. subtilis*. We have constructed a collection of *B. subtilis* strains that contain genes encoding fluorescent proteins of different colours, inserted at ectopic chromosomal loci and expressed from constitutive promoters of different strengths. We have screened the collection for strains that produce fluorescent proteins at levels high enough to be detected using standard methods such as flow cytometry, without significantly affecting cell growth and survival. As proof of concept, we are using the selected strains to quantify fitness defects associated with mutations that affect different steps of spore formation. We hope that these strains will help other researchers in the *Bacillus* community to experimentally test evolutionary biology ideas.



### **Enhancement of *Phaeodactylum tricornutum* cell growth under iron deficiency conditions by the heterologous expression of a green algal plastocyanin**

Carmen Castell, Encarnación Díaz-Santos, Luis G. Heredia-Martínez, Luis López-Maury, José M. Ortega, Manuel Hervás, José A. Navarro, [Mercedes Roncel](mailto:Mercedes Roncel)

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, cicCartuja, Universidad de Sevilla-CSIC, Sevilla.  
[mroncel@us.es](mailto:mroncel@us.es)

Cytochrome  $c_6$  is the only electron carrier between cytochrome  $b_6f$  and photosystem I in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, as this organism lacks the copper protein plastocyanin as an alternative carrier. We have investigated whether the heterologous expression in *P. tricornutum* of a functional green algal plastocyanin can enhance photosynthetic activity and cell growth. For this purpose, transformed *P. tricornutum* strains were obtained expressing a single mutant (E85K) of the plastocyanin of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, which had previously been shown to be the most effective in reducing *in vitro* photosystem I of *P. tricornutum*. The *C. reinhardtii* E85K plastocyanin gene was placed under the control of the flavodoxin promoter to ensure its expression under low iron conditions, in which native cytochrome  $c_6$  levels drastically decrease and become limiting for photosynthetic activity. Our results indicate that even the relatively low intracellular concentrations of holo-plastocyanin detected ( $\approx 4 \mu\text{M}$ ) are sufficient to promote higher growth (up to 60%) under iron-deficient conditions compared to the WT strain, measured as higher cell densities, pigment content, active photosystem I, global photosynthetic rates per cell and even cell volume. Furthermore, the presence of plastocyanin as an additional photosynthetic electron carrier appears to decrease the over-reduction of the plastoquinone pool. Consequently, it promotes an improvement in the maximum quantum yield of both photosystem II and I, together with a decrease in photoinhibition of the acceptor side of photosystem II –associated with a reduced oxidative stress–, a decrease in peroxidation of membrane lipids in the chloroplast, and a lower degree of limitation on the donor side of photosystem I. In summary, the heterologous plastocyanin expressed in *P. tricornutum* appears to act as a functional electron carrier, alternative to the native cytochrome  $c_6$  under iron-limiting conditions, and thus promotes an increased cell growth compared to WT cells.



## Discovering novel c-di-GMP activated EPS in bacteria

Daniel Perez-Mendoza<sup>1</sup>, Manuel Döring<sup>2</sup>, Broder Rühmann<sup>2</sup>, Volker Sieber<sup>2</sup>, Juan Sanjuán<sup>1</sup> and Jochen Schmid<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada, Spain.

<sup>2</sup>Chair of Chemistry of Biogenic Resources, Technical University of Munich, Schulgasse 16, 94315 Straubing, Germany.

<sup>3</sup>Present address: Institute of Molecular Microbiology and Biotechnology, University of Münster, Münster, Germany

Daniel Pérez Mendoza: [dpmendoza@eez.csic.es](mailto:dpmendoza@eez.csic.es)

Bacterial exopolysaccharides (EPS) are secreted biopolymers with often critical roles in bacterial physiology and ecology. In addition to their biological role, there is increasing interest for EPS in a wide variety of industrial sectors such as textiles, wastewater treatment, biomedical bio-based material, pharmacology and food additives. This renders microbial EPS a desirable alternative to those polysaccharides of plant and algal origin in the urgent required replacement of oil-based commodity substances. EPS are synthesized and exported by highly specific biosynthetic machineries, usually repressed or exhibiting inactive conformations, which are turned on in particular and often unknown environmental or physiological conditions. However, interestingly, they often share common regulatory schemes. For instance, the production of many EPS are known to be activated by the universal bacterial second messenger c-di-GMP (1).

We believe that the natural diversity of bacterial biopolymers remains largely unexplored. Artificially elevating c-di-GMP contents represents an attractive approach to unveil natural EPS by deregulating its biosynthesis and promoting its massive production under laboratory conditions. Indeed, we have previously shown that artificially increased c-di-GMP levels rendered the overproduction of a novel EPS, never described in bacteria before (2). Thus, we designed an automated high throughput screening (HTS) approach, for the discovery of new c-di-GMP activated EPS from large bacterial strain collections. This HTS is based on the combination of a genetic approach for artificially rising intracellular c-di-GMP with a reliable and efficient carbohydrate fingerprinting that allow the detection of new EPS chemical structures and composition (3). Using this research pipeline, a total of 315 environmental bacterial strains from different phylogenetic taxa have been evaluated. A quantitative (amount) and qualitative (sugar composition) analysis of c-di-GMP activated EPS was obtained. Nearly 10% of them have been selected for further characterization as promising candidates to produce novel EPS.

(1) Pérez-Mendoza, D. & J. Sanjuán (2016) *Curr. Opin. Microbiol.* 30, 36-43.

(2) Pérez-Mendoza, D., M.A. Rodríguez-Carvajal, L. Romero-Jiménez, G.A. Farias, J. Lloret, M.T. Gallegos & J. Sanjuan (2015). *Proc Natl Acad Sci USA*: 112: E757-765.

(3) Schmid, J., B. Rühmann, V. Sieber, L. Romero-Jiménez, J. Sanjuán & D. Pérez-Mendoza (2018). *Methods in Molecular Biology*. 1734, 263-275.







# **ÍNDICE DE PARTICIPANTES**



Apellidos	Nombre	Correo	Comunicación*
Alonso del Valle	Aida	aalonso@cnb.csic.es	P9, P14
Álvarez Escribano	Isidro	isidro.alvarez@csic.es	<b>P35</b> , P50
Álvarez González	Beatriz	balvarez@cnb.csic.es	P124
Álvarez Mena	Ana	alvarezmena@uma.es	<b>P62</b>
Amaral Piubeli	Francine	piubeli@us.es	P81
Antón Rodríguez	Tania	taniaantonrguez@gmail.com	P126
Aragón	Virginia	virginia.aragon@irta.cat	P74
Argandoña Bertrán	Montserrat	montseab@us.es	P51, P63, P125, P126
Arranz San Martín	Alba	aarras02@gmail.com	P126
Arroyo Mateo	Antonio	antonioam@uma.es	P36
Asensio López	Javier	javier12695@gmail.com	<b>P108</b>
Balbontín Soria	Roberto	rbalbontin@us.es	P10
Barbero Úriz	Óscar Alberto	oscaralb@ucm.es	<b>P123</b>
Barros Rodríguez	Adoración	dorybarros12@gmail.com	P127
Benítez Páez	Alfonso	abenitez@cipf.es	P82
Berlanga Clavero	María Victoria	mvictoriaberlanga@uma.es	P98
Bernal Bayard	Joaquín	jbbayard@us.es	P10, P103, P113, P115, P135, <b>P37</b>
Bernal Guzmán	Patricia	pbguzman@us.es	P37, P43, P94, P96, P103, P135
Beuzón López	Carmen	cbeuzon@uma.es	P97, P101
Blanco Fuertes	Miguel	miguel.blanco@irta.cat	
Blanco Torres	Paula	pablanca@ucm.es	P16, P18, <b>P80</b>
Blasco Santamaría	María de la Luz	ml.blasco@cnb.csic.es	P128
Bonillo López	Laura	laura.bonillo@irta.cat	<b>P74</b>
Bonive Boscan	Alejandro David	bonive@evolbio.mpg.de	P38
Bravo Bravo	Marc	marc.bravo@uab.cat	P39
Bullones Bolaños	Andrea Simone	abullones25@gmail.com	<b>P103</b> , P113
Cabello Alemán	Lucía	lcabello@ugr.es	P40
Cabrera Rodríguez	Juan José	juan.cabrera@eez.csic.es	<b>P117</b>
Cabrera Fisac	Alba	acabrera@cnb.csic.es	P42, P49, P67
Calvet Seral	Juan	jcalvet@unizar.es	P64, P129
Calvo Fernández	Cristina	crical02@ucm.es	P11, P15, P23, P24
Camacho Fernández	Eva María	emcamfer@upo.es	P12
Campos Pardos	Elena	elenacampos@unizar.es	<b>P109</b>
Canosa	Inés	icanper@upo.es	P83, P131
Carvajal Holguera	Rocío	rociocarvajal06@gmail.com	P4, P13
Casadesús Pursals	Josep		P4, P13, P16, P41, P81
Casas Román	Ariana	ariana.casas@eez.csic.es	<b>P95</b>
Castillo Rodríguez	Inés	casroines@gmail.com	<b>P122</b>
Catalán Moreno	Arancha	arancha.catalan@csic.es	P104, P110
Cebrián Sastre	Esmeralda	esmeralda.cebrian@cnb.csic.es	<b>P5</b>
Cerna Vargas	Jean Paul	jpcernavargas@gmail.com	<b>P61</b> , P66
Contreras Moreno	Francisco Javier	currocm@ugr.es	<b>P118</b> , P40
Correa Fiz	Florencia	flor.correa@irta.cat	P74,
Correa Galeote	David	dcorrea@ugr.es	<b>P121</b>
Crespo Yuste	Estefanía	ecyuste@gmail.com	P64, P129
Daddaoua	Abdelali	daddaoua@ugr.es	P65

Apellidos	Nombre	Correo	Comunicación*
Dapa	Tanja	tanja.dapa@gmail.com	<b>P75</b>
de la Fuente Hidalgo	Javier	fuentehidalgo91@gmail.com	P14
Díaz Peña	Rocío	rociodiazpena@gmail.com	P42
Dolcet Negre	Marta María	martadolcet1@gmail.com	P11, P15, P23, P84
Domínguez García	Laura	domgarlaura@uma.es	P130
Durán Wendt	David	david.duran@uam.es	P43, P55, P94
Escudero	José Antonio	jaescudero@ucm.es	P16, P18, P80, P86, P90
Fernández Favieres	Francisco Javier	javierffavieres@gmail.com	P23, P24, P27, P84
Fernández Fernández	Rocío de la Encarnación	rocio-ff@us.es	P4, P16
Fernández González	María del Rocío	rocio.fernandez@eez.csic.es	P122
Fernández González	Antonio José	antonio.fernandez@eez.csic.es	P76, P85, P92
Fernández Herrero	Luis Ángel	lafdez@cnb.csic.es	P106, P117, P124
Fernández López	Manuel	manuel.fernandez@eez.csic.es	P76, P85, P92
Fernández López	Raúl	raul.fernandez@unican.es	<b>P120</b>
Ferrándiz Avellano	María José	mjferrandiz@isciii.es	<b>P33, P45</b>
Flores Díaz	Amando	aflodia@upo.es	P12, P83, P131
Gallegos Fernández	Mª Trini	maritrini.gallegos@eez.csic.es	P44, P95
García Franco	Ana Ángeles	ana.garcia@eez.csic.es	<b>P116</b>
García López	Miriam	miriamgarcia@isciii.es	P45
García López	Carla	carlagarcia291298@gmail.com	P111
García Martínez	Mª Begoña	begona.garcia@unavarra.es	P17, <b>P102</b>
García Pastor	Lucía	luciagarciapastor@gmail.com	P80, P86, P90
García Tomsig	Natalia I.	natalia.garcia@eez.csic.es	<b>P29</b>
García Valero	Rosa María	rgarcia5@us.es	<b>P63</b>
Garmendia Antoñana	Nahiara	nahiara.garmendia@unavarra.es	P17, P102
Garmendia García	Juncal	juncal.garmendia@csic.es	P108, P112
Garzón Villar	Andrés	agarvil@upo.es	P89
Genova	Roberta	roberta.genova@studenti.unipd.it	P66
Gil Campillo	Celia	celia.gil@csic.es	P112
Giraldo Suárez	Rafael	rgiraldo@cnb.csic.es	P93, P128
Godoy Alba	Patricia	patricia.godoy@eez.csic.es	P116
González Delgado	Alejandro	alejandro.gonzalez@gladstone.ucsf.edu	<b>P119, P134</b>
González Zorn	Bruno	bgzorn@ucm.es	<b>P3, P8, P11, P15, P23, P24, P27, P84</b>
Gonzalo Asensio	Jesús	jagonzal@unizar.es	P64, P109, P129
Govantes Romero	Fernando	fgovrom@upo.es	P28, P44, P54, P133
Grifé Ruiz	Montserrat	montsegrife@uma.es	<b>P99</b>
Guedes García	Sabina K.	sabina.guedes@eez.csic.es	P29
Gutiérrez Diánez	Alba María	gutierrezalba96@gmail.com	P46
Herencias	Cristina	cherodr@gmail.com	<b>P2</b>
Hernández Piñero	Sara Belén	sarita.belen.hernandez@gmail.com	<b>P31</b>
Hipólito Carrillo de Albornoz	Alberto	hipolito440@hotmail.com	P18, P80, P86
Jiménez Leiva	Andrea	andrea.jimenez@eez.csic.es	P49, P67
Jiménez Zurdo	José I.	jjz@eez.csic.es	P29
Kieffer	Nicolas	nicolas.kieffer@gmx.fr	
Krell	Tino	tino.krell@eez.csic.es	P59, P61, P66, P68, P70, P73
Laborda Martínez	Pablo	plaborda@cnb.csic.es	<b>P1</b>

Apellidos	Nombre	Correo	Comunicación*
Llamas Lorente	Marian	marian.llamas@eez.csic.es	P48, P60
López Escarpa	David	davidlescarpa@gmail.com	<b>P107</b>
López Garrido	Javier	lopezgarrido@evolbio.mpg.de	P38, P136
López Igual	María del Rocío	rocio.lopez@ibvf.csic.es	P77, P87, P120
López Maury	Luis	llopez1@us.es	<b>P30</b> , P137
López Montesino	Sara	saralo08@ucm.es	P47
López Sánchez	Aroa	arlopsan@upo.es	P28, P44, P54, P133
Lucero López	Leticia	llucero@cnb.csic.es	<b>P93</b>
Lucía Quintana	Ainhoa	ainhoalq@unizar.es	P19
Mancera Miranda	Laura	lauramm@uma.es	<b>P97</b> , P101
Manzanera Ruiz	Maximino	manzanera@ugr.es	P127
Marchan del Pino	Domingo	dmarchan@ibebarcelona.eu	P132
Marcos Torres	Francisco Javier	franciscojavier.marcos@eez.csic.es	P48, P60
Marín Quero	Patricia	patricia.marin@eez.csic.es	P88
Marina Moreno	Alberto	amarina@ibv.csic.es	<b>P57</b>
Marqués Martín	Silvia	silvia@eez.csic.es	P88, P122
Martín Basanta	Marta	m.martin@uam.es	P43, P55, P94
Martín Blecua	Isabel	imartin@cnb.csic.es	P20
Martínez-Abarca	Francisco	fmabarca@eez.csic.es	P134
Martirani Von Abercron	Sophie Marie	sophie.martirani@eez.csic.es	P88, P122
Matamoros Rodríguez	Bosco	bosrodri@ucm.es	<b>P3</b> , P8, P24, P27
Matilla Vázquez	Miguel Ángel	miguel.matilla@eez.csic.es	P59, P61, P66, P68, P70, P73
Molina Castro	Yésica	ymolcas@upo.es	
Molina Delgado	Lázaro	lazaromolina@eez.csic.es	P100
Molina Henares	María Antonia	nene.molina@eez.csic.es	P69
Monteagudo Cascales	Elizabet	elizabethmoca@gmail.com	P61, P66, P70
Montero Beltrán	Elisa	elisamonterobeltran25@gmail.com	<b>P28</b>
Moreno Albiger	Renata	rmoreno@cnb.csic.es	P34
Murillo Torres	Marina	mmtorres@us.es	P135
Muro Pastor	Alicia María	alicia@ibvf.csic.es	P31, P35, P50
Muro Pastor	María Isabel	imuro@ibvf.csic.es	<b>P32</b> , P46
Muruzabal Galarza	Ane	ane.muruzabal@csic.es	<b>P104</b> , P110
Nadal Jiménez	Pol	polnadal@gmail.com	P21
Nieto Gutiérrez	Joaquín José	jjnieto@us.es	P51, P63, P125, P126
Nisa Martínez	Rafael	rafael.nisa@eez.csic.es	P71
Ortiz Millán	Gabriela	gabriela.ortiz@uab.cat	
Pacheco Sánchez	Daniel	daniel.pacheco@eez.csic.es	P122
Palacios Gorba	Carla	carla.palaciosgorba@uchceu.es	<b>P78</b>
Parés Guillén	Elena	epares@cnb.csic.es	<b>P34</b>
Paulino Carvalho	André Filipe	apaulino@ucm.es	
Pellicer Moya	Teresa	tpellicer@htba.com	
Pérez Arnaiz	Patricia	patricia.pereza@uam.es	P52, P56
Pérez Lorente	Alicia Isabel	perezlorente@uma.es	<b>P72</b>
Pérez Mendoza	Daniel	dpmendoza@eez.csic.es	P138
Pérez Padilla	Verónica	veronica.perez@eez.csic.es	P53
Pérez Pulido	Antonio	ajperez@upo.es	P89

Apellidos	Nombre	Correo	Comunicación*
Prieto Nieto	Amalia	amaliapr@ucm.es	P90
Pulido Sánchez	Marta	mpulsan@upo.es	P28, P54, P133
Pulido Vadillo	Mario	mpulid02@ucm.es	<b>P8</b> , P15, P27, P84
Quereda Torres	Juan José	juan.quereda@uchceu.es	P78
Ramiro Martínez	Paula	paularamiromartinez@gmail.com	<b>P79</b>
Ramos Morales	Francisco	framos@us.es	P10, P37, P103, P113, P115
Recio Muñoz	María Isabel	isabel.recio@eez.csic.es	
Reyes-Matte	Octavio	reyesmatte@evolbio.mpg.de	P136
Rico Jiménez	Miriam	miriam.rico@eez.csic.es	<b>P59</b>
Rivas Marín	Elena	erivmar@upo.es	P91
Rivilla Palma	Rafael	rafael.rivilla@uam.es	P55
Rodríguez	Jerónimo	jeronimo.rodriguez.beltran@gmail.com	P43, P55, P94
Rojo de Castro	Fernando	frojo@cnb.csic.es	P34
Roncel Gil	Mercedes	mroncel@us.es	P30, P137
Ruano Gallego	David	druano@cab.inta-csic.es	<b>P106</b>
Rubio Canalejas	Alba	arubio@ibecbarcelona.eu	<b>P58</b>
Rufián Plaza	José Sebastián	rufian@uma.es	P101
Ruiz Albert	Javier	javieruizal@uma.es	P97, P101
San Millán Cruz	Álvaro	asanmillan@cnb.csic.es	P2, P9, P14
Sánchez Hidalgo	Marina	marina.sanchez@medinaandalucia.es	P22
Sánchez Jiménez	Ana	ana.sj309@gmail.com	<b>P60</b>
Sánchez Méndez	Irene	iresan06@ucm.es	P3, P8, P11, P23
Sánchez Romero	María Antonia	mtsanchez@us.es	<b>P4</b> , P13, P16, P97, P112
Segura Mejías	Alicia	aliciasegura265@gmail.com	<b>P77</b> , P87
Serna Bernaldo	Carlos	carlsern@ucm.es	P3, P15, P24, P84
Solano Goñi	Cristina	cristina.solano@unavarra.es	P17, P102
Soto Ospina	Carlos Yesid	cysotoo@unal.edu.co	<b>P114</b>
Streparola	Gaia	gaia.streparola@irta.cat	
Teso Pérez	Claudia	claudiatepe@correo.ugr.es	<b>P6</b>
Toledo Arana	Alejandro	a.toledo.arana@csic.es	P108, P110
Torrents Serra	Eduard	etorrents@ibecbarcelona.eu	P25, P58, P132
Uruén García	Cristina	cristinauruen@gmail.com	P26
Valenti Sanguino	Marta	martva02@ucm.es	<b>P105</b> , P123
Vallejo Grijalba	Claudia	cvallejo1@us.es	P115
Valverde	Claudio	cvalver@unq.edu.ar	
Vázquez Arias	David	david.vazquez@uam.es	P43, <b>P94</b>
Velando Soriano	Félix	fxvelando@gmail.com	P61, P66, P68, P73
Velasco Amo	María del Pilar	mpvelasco@ias.csic.es	<b>P96</b>
Velázquez Molina	Francisco Javier	fjvm90@gmail.com	
Verdú Cano	Carlos	carlos.verdu@uam.es	P52, P56
Vicente Lasa	Ana	ana.vicente@eez.csic.es	P92
Wedel	Emilia	emiliawe@ucm.es	P3, P8, P11, P27

\*Los números en negrita indican presentación oral.





**E.KAMYR**