

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio de bacterias resistentes a la desecación. *Exiguobacterium* sp. Helios

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Castillo López

DIRECTORES

Juana María Navarro Llorens
José Luis García López

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Estudio de bacterias resistentes a la desecación.

Exiguobacterium sp. Helios

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

María Castillo López

DIRECTORES

Dra. Juana María Navarro Llorens

Dr. José Luis García López

Madrid, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de doctorado:

Bioquímica, biología molecular y biomedicina



TESIS DOCTORAL

Estudio de bacterias resistentes a la desecación.

Exiguobacterium sp. Helios

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

María Castillo López

DIRECTORES

Dra. Juana María Navarro Llorens

Dr. José Luis García López

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS MARGARITA SALAS

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Madrid, 2024

El trabajo descrito en esta Tesis doctoral ha sido realizado en el Grupo de Ingeniería Metabólica perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España) y en el Grupo de Biotecnología Medioambiental, perteneciente al Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del Centro de Investigaciones Científicas Margarita Salas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIBMS-CSIC) (Madrid, España).

La investigación ha sido financiada por la beca de Formación del Personal Investigador del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad en I+D+i (PRE2019-087933), y por los proyectos BIO2015-66960-C3-1-R, BIO2016-79736-R y PID2019-110612RB-I00 del Ministerio de Economía y Competitividad de España, RTI2018-095584-B-C41-42-43-44 del Ministerio de Ciencia e Innovación de España, y por la beca CSIC 2017 2 0I 015.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	17
I. RESUMEN	21
II. SUMMARY	27
III. INTRODUCCIÓN	31
1. La vida en hábitats extremos	33
2. Resistencia / tolerancia a la desecación o xerotolerancia	36
2.1. Mecanismos de resistencia.....	40
2.2. Esporulación	40
2.3. Latencia	42
3. Aplicaciones de las bacterias extremófilas.....	49
4. Bioprospección de nichos novedosos	53
4.1. Astrobiología.....	54
4.2. El panel solar.....	55
5. El género Exiguobacterium	57
IV. OBJETIVOS.....	63
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	69
2. Medios y condiciones de cultivo	72
2.1. Obtención de condiciones anaeróbicas.....	74
2.2. Cultivo en biorreactor	75
3. Ensayos con bacterias extremófilas	76
3.1. Recogida de muestras del panel solar	76
3.2. Aislamiento de cepas bacterianas resistentes a desecación	76
3.2.1. Detección y descarte de bacterias formadoras de esporas	77
3.3. Identificación de las cepas xerotolerantes	77
3.4. Ensayos de resistencia	78
3.4.1. Xerotolerancia.....	78
3.4.2. Crecimiento en condiciones de temperatura y pH extremas	78
3.4.3. Crecimiento en condiciones de estrés osmótico.....	79
3.4.4. Crecimiento en presencia de metales y metaloides	79
3.4.4.1. Caracterización de nanopartículas de selenio	79
3.4.5. Resistencia a UV	80
3.4.6. Inmovilización de células	80
4. Experimentos de transferencia génica.....	81

4.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	81
4.2. Transformación de células de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios.....	81
4.2.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	81
4.2.2. Transformación de células de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios mediante electroporación.....	82
5. Técnicas de manipulación de ADN.....	83
5.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	83
5.2. Extracción de ADN cromosómico	83
5.3. Extracción de ADN plasmídico en <i>E. coli</i>	84
5.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa (PCR)	84
5.5. Secuenciación de fragmentos de ADN	84
5.6. Secuenciación, ensamblaje y análisis bioinformático del genoma de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	85
6. Técnicas de manipulación de ARN.....	86
6.1. Extracción de ARN total de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	86
6.2. Secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) y análisis informáticos	87
7. Técnicas cromatográficas	88
7.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	88
8. Técnicas de microscopía	88
8.1. Microscopía óptica.....	88
8.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	89
8.3. Microscopía de fuerza atómica.....	89
8.3.1. Método de AFM para medir la rigidez y la fuerza de adhesión en un punto de la muestra (Espectroscopía de Fuerzas)	91
8.3.2. Método de AFM para tomar imágenes.....	95
8.3.2.1. <i>Jumping</i>	95
8.3.2.2. Dinámico sin contacto.....	95
VI. RESULTADOS	97
CAPÍTULO 1. ESTUDIO GENÉTICO Y FENOTÍPICO DE LA BACTERIA EXIGUOBACTERIUM SP. HELIOS	99
1. Aislamiento, selección e identificación de ceas xerotolerantes de un panel solar	101
1.1. Muestreo y aislamiento de bacterias xerotolerantes	101
1.2. Selección de bacterias xerotolerantes e identificación	103
2. Análisis del genoma de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios.....	105

2.1. Secuenciación y anotación del genoma de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	105
2.2. Comparación genómica de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios y <i>E. sibiricum</i> 255-15	110
3. Estudio de las poliextremofilias de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios.....	115
3.1. Crecimiento en diferentes condiciones de temperatura y pH.....	115
3.2. Crecimiento en condiciones de estrés osmótico	118
3.3. Resistencia a presencia de metales y metaloides	120
3.3.1. Producción de SeNPs.....	123
3.3.2. Inmovilización de células de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios.....	124
3.4. Resistencia a UV.....	125
3.5. Resistencia al estrés hidrodinámico en biorreactor.....	127
4. Desarrollo de protocolos de transformación.....	130
4.1. Sensibilidad a antibióticos.....	130
4.2. Transformación génica mediante electroporación.....	131
4.2.1. Selección de plásmidos.....	131
4.2.2. Establecimiento de las condiciones de electroporación.....	133
4.2.3. Desarrollo de un protocolo de modificación cromosómica	138
4.2.3.1. SEVA siblings	138
4.2.3.2. Vector pK18mob	142
4.3. Transformación genética mediante conjugación.....	143
4.4. Transformación genética mediante competencia natural	144
4.4.1. Identificación de genes de competencia natural	144
4.4.2. Establecimiento de las condiciones de competencia natural.....	146

CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE CONFIEREN XEROTOLERANCIA A LA BACTERIA *EXIGUOBACTERIUM* SP. HELIOS MEDIANTE ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y TRANSCRIPTÓMICOS

1. Resistencia a la desecación o xerotolerancia.....	149
2. Estudio de la morfología de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	153
3. Estudio de las propiedades mecánicas de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios.....	158
3.1. Inmovilización de la muestra	158
3.2. Medida de la rigidez de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios.....	158
3.3. Comparación de la rigidez entre especies	162
3.4. Recuperación de células desecadas.....	164
3.5. Estudio de la topografía.....	166
3.5.1. Estudio de la estructura de la pared celular.....	166

3.5.2. Estudio de la adhesión.....	168
4. Estudio de los mecanismos de xerotolerancia mediante análisis transcriptómico	169
4.1. Principales cambios de expresión observados en la fase estacionaria del cultivo.....	171
4.1.1. Genes de movilidad.....	171
4.1.2. Metabolismo del ácido fenilacético	174
4.1.3. Morfología, pared celular y EPS.....	175
4.1.4. Genes de estabilidad de membrana	177
4.1.5. Genes relacionados con esporulación.....	178
4.1.6. Estrés osmótico y oxidativo	181
4.1.7. Reparación de ADN	182
4.1.8. Proteínas de respuesta al frío.....	183
4.2. Principales diferencias en el transcriptoma de las bacterias desecadas	184
CAPÍTULO 3. ESTUDIO METABÓLICO DE <i>EXIGUOBACTERIUM SP. HELIOS</i>	187
1. Degradación de compuestos de interés	189
2. Estudio del metabolismo anaerobio en <i>Exiguobacterium sp. Helios</i>.....	192
3. Estudio de las auxotrofías de <i>Exiguobacterium sp. Helios</i>.....	195
3.1. Metabolismo del azufre	195
3.2. Aminoácidos de cadena ramificada.....	195
4. Estudio del metabolismo del acetato en <i>Exiguobacterium sp. Helios</i>	196
4.1. Crecimientos en matraz.....	198
4.2. Análisis transcriptómico en presencia de acetato	200
4.3. Hipótesis propuesta para a utilización del acetato como fuente de carbono y energía	208
4.4. Análisis de metabolitos por HPLC	210
VII. DISCUSIÓN.....	215
1. Caracterización del poliextremófilo <i>Exiguobacterium sp. Helios</i>.....	217
1.1. <i>Exiguobacterium sp. Helios</i> : aislamiento y genoma	217
1.2. Estudio de la poliextremofilia	218
1.3. Desarrollo de herramientas genéticas.....	221
2. Estudio de la xerotolerancia de <i>Exiguobacterium sp. Helios</i>.....	222
2.1. Resistencia a la desecación del género <i>Exiguobacterium</i>	222
2.2. Relación entre morfología y xerotolerancia.....	224
2.3. Propiedades mecánicas	225

2.4. Mecanismos de xerotolerancia.....	228
2.4.1. Cambio en las concentraciones de metales	229
2.4.2. Cambios metabólicos	230
2.4.3. Incremento de la concentración intracelular de osmolitos y solutos compatibles.....	231
2.4.4. Producción de moléculas que estabilizan a las proteínas tipo chaperonas y proteasas que degraden proteínas dañadas	231
2.4.5. Regulación de la expresión de captadores de ROS	231
2.4.6. Reparación del daño al ADN.....	232
2.4.7. Cambios en la membrana y la pared celular	232
3. Metabolismo de <i>Exiguobacterium sp. Helios</i>.....	235
3.1. Metabolismo del acetato	236
VIII. CONCLUSIONES.....	241
IX. REFERENCIAS.....	245
X. ANEXOS	273

ABREVIATURAS

μF	Microfaradio
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AAIm	<i>Average Amino acid Identity</i> , Identidad Media de Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Microscopía de Fuerza Atómica
Amp	Ampicilina
ANIm	<i>Average Nucleotide Identity</i> , Identidad media de nucleótidos
ARD	<i>Absolute percentage deviation</i> , Desviación Absoluta del Porcentaje
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
a_w	Actividad de agua
BCKADH	<i>Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase</i> , deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cat	Gen de expresión de la cloranfenicol acetiltransferasa
CBM	<i>Carbohydrate-Binding Module</i> , Módulo de Unión a Carbohidratos
CDS	<i>Coding sequence</i> , Secuencia Codificante
Cm	Cloranfenicol
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> , Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
COG	<i>Clusters of Orthologous Genes</i> , Grupos de Genes Ortólogos
COX	Citocromo C Oxidasa
CSP	<i>Cold Shock Proteins</i> , Proteínas de Shock por Frío
Cys	Cisteína
DAD	<i>Dyode Array Detector</i> , Detector de Fotodiodos en Serie
DAP	Ácido diaminopimélico
DEG	<i>Differentially Expressed Gene</i> , Gen Diferencialmente Expresado
Din	<i>Damage-inducible protein</i> , Proteína inducible por daño en el ADN

ABREVIATURAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifostato
DO _{600nm}	Densidad óptica medida a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray spectroscopy</i> , Fluorescencia de Rayos X por Energía Dispersiva
EPS	Exopolisacárido
FC	<i>Fold Change</i> , veces de inducción
g·L ⁻¹	Gramos por litro
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente
Glu	Ácido glutámico
Gy	Gray (dosis de radiación ionizante)
h	Hora(s)
HEPES	N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> , cromatografía líquida de alta eficacia
HR	Humedad relativa
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i> , Ácido indolacético
ICL	Isocitrato liasa
Ile	Isoleucina
IMN	Instituto de Micro y Nanotecnología
k _{bac} o k _n	Constante de fuerza de la bacteria
Km	Kanamicina
kV	Kilovoltio
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i> , bacterias acidolácticas
LacZ	β-galactosidasa del gen <i>lacZ</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i> , medio de cultivo enriquecido
LCB	<i>Locally Collinear Block</i> , bloques colineales locales
LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina
M	Molar
MCP	<i>Methyl-accepting Chemotaxis Protein</i> , proteína de quimiotaxis aceptora de metilo
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> , sitio de clonaje múltiple
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minuto(s)
MiNa	Servicio de Micro y Nanofabricación
mL	Mililitro
MMC	Mitomicina C
<i>mrfp</i>	Gen de expresión de la proteína roja fluorescente
MS	Malato sintasa
N·m ⁻¹	Newton por metro

NAD/NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> , reparación por escisión de nucleótido
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i> , unión de extremos no homólogos
nm	Nanómetro
Nt	Nucleótido(s)
O/N	<i>Overnight</i> , durante toda la noche
°C	Grados Celsius
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , Marco abierto de lectura
p/v	Relación peso-volumen
pb	Par(es) de bases
PBP	<i>Penicilin-binding protein</i> , proteína de unión a penicilina
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PET	Polietileno tereftalato
PFOR	Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa
PG	Peptidoglicano
PGPB	<i>Plant growth-promoting bacteria</i> , bacterias promotoras del crecimiento de plantas
Phe	Fenilalanina
Psp	<i>Phage shock proteins</i> , proteínas de respuesta a la infección por fagos
R	Radio de la bacteria
RAST	<i>Rapid Annotation Using Subsystem Technology</i>
RBS	<i>Ribosome Binding Site</i> , sitio de unión al ribosoma
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i> , proteína roja fluorescente
Rif	Rifampicina
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> , número de integridad de ARN
RNA-seq	Secuenciación masiva de ARN
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SAED	<i>Selected Area Electron Diffraction</i> , Patrón de difracción electrónica del área seleccionada
SEM	Scanning Electron Microscopy, Microscopía Electrónica de Barrido
SeNPs	<i>Selenium Nanoparticles</i> , Nanopartículas de selenio
SM	<i>Starvation medium</i> , medio de inanición
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA

ABREVIATURAS

Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Relación volumen-volumen
Val	Valina
VOC	<i>Volatile organic compound</i> , compuesto orgánico volátil
Ω	Omnio

I. Resumen

I. RESUMEN

En las últimas décadas, se ha intensificado el descubrimiento de ambientes extremos y de los organismos que los habitan, ampliando el conocimiento sobre cómo funciona la vida tanto en la Tierra como fuera de ella. Aunque los extremófilos incluyen miembros de los tres dominios de la vida, arquea, bacteria y eucariota, se ha desarrollado un gran interés hacia las bacterias que viven en ecosistemas extremos con el propósito de entender las estrategias de supervivencia únicas evolucionadas por estos organismos extremófilos y usarlas para desarrollar aplicaciones biotecnológicas. Entre las bacterias extremófilas, tienen interés especial las bacterias xerotolerantes o resistentes a la desecación, que son capaces de perder casi toda el agua al sufrir estrés hídrico, pero recuperar sus funciones normales tras la rehidratación.

Los mecanismos por los cuales una bacteria es capaz de resistir la desecación son principalmente dos: la esporulación, que es una forma de resistencia metabólicamente inactiva y que la presentan miembros de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*, entre otros; y la latencia, que engloba un abanico de mecanismos de resistencia que protegen a la célula, ralentizan su metabolismo y le permiten recuperarse cuando desaparece el estrés.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo general la caracterización de la bacteria xerotolerante *Exiguobacterium* sp. Helios, aislada de las placas solares, descifrando los mecanismos que le confieren poliextremofilia. Para abordar este objetivo general se marcaron los siguientes objetivos parciales: 1) el estudio genético y fenotípico de la bacteria *Exiguobacterium* sp. Helios.; 2) el estudio de los mecanismos que confieren xerotolerancia a la bacteria *Exiguobacterium* sp. Helios mediante análisis morfológicos y transcriptómicos y 3) el estudio metabólico de *Exiguobacterium* sp. Helios.

Los antecedentes de esta tesis doctoral son la bioprospección de la microbiota de un nicho extremo, los paneles solares. Esta tesis doctoral comienza con la descripción en detalle de uno de los aislados obtenidos en ese análisis, del aislado xerotolerante *Exiguobacterium* sp. Helios. Esta bacteria mostró una relación cercana con la bacteria *Exiguobacterium sibiricum* 255-15, aislada de permafrost siberiano. La comparación de los genomas de *Exiguobacterium* sp.

Helios y *E. sibiricum* 255–15 reveló varias similitudes y diferencias interesantes. Ambas cepas contienen un conjunto de genes relacionados con la transformación por competencia, sugiriendo que podrían tener competencia natural, y un conjunto incompleto de genes relacionados con la esporulación; es más, estas cepas no producen esporas, sugiriendo que estos genes podrían estar relacionados con la xerotolerancia. La xerotolerancia no había sido descrita previamente como una característica del género *Exiguobacterium*, pero ambas cepas, Helios y 255–15, mostraron una resistencia comparable a la descrita en la cepa modelo de xerotolerancia *Deinococcus radiodurans*. La resistencia a la desecación o xerotolerancia de células en su forma vegetativa (no esporulada) es un tema de gran interés en agricultura o en la industria alimentaria, y que sigue suscitando preguntas acerca de qué mecanismos están implicados en esta tolerancia. Además, en esta tesis se han explorado diversos protocolos de transformación genética, consiguiendo transformantes que expresan proteína fluorescente, siendo esta la primera vez que una bacteria del género *Exiguobacterium* ha sido modificada genéticamente.

El estudio morfológico de la forma de resistencia responsable de la poliextremofilia de *Exiguobacterium* sp. Helios a través de diferentes técnicas de microscopía y el análisis de sus capacidades mecánicas empleando microscopía atómica de fuerza permitió la descripción en detalle de los cambios significativos observados en la morfología celular después de la desecación, que sugieren que la superficie de la estructura celular juega un papel importante en la xerotolerancia. Por último, se trató de desengranar los mecanismos de resistencia a desecación y los cambios en la expresión genética que debe sufrir la célula para adquirir la morfología resistente empleando tecnologías ómicas como el estudio del transcriptoma.

Por otro lado, se analizaron los resultados obtenidos mediante la validación del modelo metabólico elaborado por el grupo de Ingeniería Metabólica de Sistemas del Instituto de Biología Integrativa de Sistemas I2SysBio (UVEG-CSIC). Este modelo metabólico constituye el primero publicado del género *Exiguobacterium* y será vital para el análisis de su metabolismo. Se comprobó la validez del modelo metabólico con crecimientos en diferentes fuentes de carbono

I. RESUMEN

como azúcares o compuestos aromáticos, así como la capacidad de la bacteria de crecer en condiciones de anaerobiosis, ayudando a ajustar las simulaciones del modelo a los ensayos *in vivo*. La construcción del modelo metabólico destacó la ausencia de genes necesarios para la degradación de varios compuestos que se había comprobado *in vivo* que son degradados por Helios como, por ejemplo, la degradación del acetato, que se ha estudiado en detalle en esta tesis.

II. Summary

In recent decades, the discovery of extreme environments and the organisms inhabiting them has been intensified, expanding our knowledge of how life functions both on Earth and beyond. Although extremophiles include members from all three domains of life—archaea, bacteria, and eukaryotes—there has been a particular interest in bacteria living in extreme ecosystems with the purpose of understanding the unique survival strategies evolved by these extremophilic organisms and using them to develop biotechnological applications. Among extremophilic bacteria, special attention has been given to xerotolerant or desiccation-resistant bacteria, capable of losing almost all water under water stress but recovering their normal functions upon rehydration.

The mechanisms by which bacteria can resist desiccation primarily include two: sporulation, a form of metabolically inactive resistance found in members of the genera *Clostridium* and *Bacillus*, among others; and latency, encompassing a range of resistance mechanisms that protect the cell, slow down its metabolism, and enable recovery when stress disappears.

The overall objective of this doctoral thesis is the characterization of the xerotolerant bacterium *Exiguobacterium* sp. Helios, isolated from solar panels, deciphering the mechanisms that confer polyextremophilia. To address this general objective, the following specific objectives were outlined: 1) Genetic and phenotypic study of the bacterium *Exiguobacterium* sp. Helios; 2) Study of the mechanisms conferring xerotolerance to the bacterium *Exiguobacterium* sp. Helios through morphological and transcriptomic analyses and 3) the metabolic study of *Exiguobacterium* sp. Helios.

As a result of the bioprospecting of the microbiota in an extreme niche, solar panels, this doctoral thesis emerged, starting with the detailed description of the xerotolerant isolate *Exiguobacterium* sp. Helios. This bacterium showed a close relationship with the bacterium *Exiguobacterium sibiricum* 255–15, isolated from Siberian permafrost. The comparison of the genomes of *Exiguobacterium* sp. Helios and *E. sibiricum* 255–15 revealed several interesting similarities and differences. Both strains contain a set of genes related to competence transformation, suggesting they might have natural competence, and an

II. SUMMARY

incomplete set of genes related to sporulation; furthermore, these strains do not produce spores, suggesting that these genes might be related to xerotolerance. Xerotolerance had not been previously described as a characteristic of the genus *Exiguobacterium*, but both Helios and 255-15 strains showed xerotolerance comparable to that described in the model xerotolerant strain *Deinococcus radiodurans*. The desiccation resistance or xerotolerance of cells in their vegetative form (non-sporulated) is of great interest in agriculture or the food industry and continues to raise questions about the mechanisms involved in this tolerance. In addition, various genetic transformation protocols were explored, achieving transformants expressing fluorescent protein. This is the first time that a bacterium of the genus *Exiguobacterium* has been genetically modified.

The morphological study of the resistance form, responsible for the polyextremophilia of *Exiguobacterium* sp. Helios through different microscopy techniques and the analysis of its mechanical capabilities using atomic force microscopy allowed for a detailed description of significant changes observed in cell morphology after desiccation, suggesting that the surface of the cell structure plays a crucial role in xerotolerance. Finally, an attempt was made to unravel the mechanisms of desiccation resistance and the changes in gene expression that the cell must undergo to acquire resistant morphology using omics technologies such as transcriptome studies.

On the other hand, the results were analyzed by validating the metabolic model developed by the Systems Metabolic Engineering group of I2SysBio (UVEG-CSIC). This metabolic model is the first one published for the genus *Exiguobacterium* and it will be essential for the analysis of its metabolism. The validity of the metabolic model was confirmed with growth on different carbon sources such as sugars or aromatic compounds, as well as the bacterium's ability to grow under anaerobic conditions, helping to adjust model simulations to *in vivo* experiments. The construction of the metabolic model highlighted the absence of genes necessary for the degradation of several compounds that had been demonstrated *in vivo* to be degraded by Helios, such as acetate degradation, which has been studied in detail in this thesis.

III. Introducción

1. La vida en hábitats extremos

Hasta no hace mucho tiempo, se creía que la vida solo podía encontrarse en unos rangos muy estrechos de condiciones ambientales de temperatura, presión, acidez, alcalinidad o salinidad. De este modo, las condiciones fisiológicas más favorables fisiológicas descritas para el crecimiento de microorganismos son una temperatura de 37°C, un pH de 7,4, una presión de 1 atm y una concentración salina de hasta un 3% (Merino et al., 2019). Se define como extremófilos a aquellos organismos que son capaces de resistir y sobrevivir lejos de esos parámetros en cuanto a, por ejemplo, factores como la temperatura, el pH, la salinidad o la presión o incluso con una combinación de estos factores en ambientes definidos como hostiles para la vida (Canganella & Wiegel, 2011). Desde que el primer extremófilo no formador de esporas, *Thermus aquaticus*, fuese aislado hace ya 50 años (Brock & Freeze, 1969), se han encontrado muchos organismos en ambientes extremos como aguas termales, lagos salinos, desiertos, lagos alcalinos o ácidos, zonas altamente radioactivas o irradiadas y en las profundidades del mar (Coker, 2023; Kumar et al., 2022). Sin embargo, resulta curioso que una vez adaptados algunos de estos extremófilos no son capaces de prosperar en entornos lejos de esas condiciones ambientales extremas (Seckbach et al., 2013).

Aunque el término extremófilo englobe a bacterias, arqueas, hongos, algas, virus y protistas ciliados, la mayor parte de ellos son procariotas (Zgonik et al., 2021). Los microorganismos extremófilos presentan una gran capacidad para habitar ambientes hostiles y sobrevivir bajo condiciones bióticas y abióticas extremadamente adversas que son letales para otras formas de vida, como en nichos extremadamente calientes, en el hielo, en soluciones con alta fuerza iónica, o en condiciones de pH extremos ácidos o alcalinos (Rampelotto, 2013). Gracias a los avances tecnológicos, es posible actualmente aislar especies de estos medios tan extremos considerados hasta ahora inhabitables, aunque a menudo es necesario optimizar y encontrar un método adecuado de aislamiento (Molina-Menor et al., 2023; Wang et al., 2022).

Los microorganismos extremófilos pueden dividirse en dos amplias categorías: i) Extremófilos, que requieren una o más condiciones extremas para

III. INTRODUCCIÓN

crecer; ii) extremo-tolerantes, que pueden tolerar valores extremos de uno o más parámetros fisicoquímicos mientras crecen de forma óptima en condiciones normales (Gerday & Glansdorff, 2007).

En las últimas décadas ha aumentado el interés por las bacterias capaces de sobrevivir e incluso de desarrollarse de manera óptima en ambientes extremos, con el propósito de entender las estrategias de supervivencia únicas evolucionadas por estos organismos extremófilos y usarlas para desarrollar aplicaciones biotecnológicas (Kaur et al., 2019; Milojevic & Weckwerth, 2020; Zannier et al., 2022). En esta tesis doctoral nos vamos a centrar en las bacterias extremófilas aisladas de un panel solar.

De acuerdo con el parámetro fisicoquímico que determina la condición ambiental extrema en un determinado hábitat, las bacterias extremófilas pueden clasificarse en diferentes grupos (Tabla I1). No obstante, muchas de estas bacterias se incluyen en varias categorías y se clasifican como poliextremófilas porque pueden vivir en diferentes ambientes extremos. Por ejemplo, muchas fuentes termales también son ácidas o alcalinas y ricas en metales pesados; las profundidades del océano son generalmente frías; o los lagos hipersalinos también son muy alcalinos (Orellana et al., 2018; Rekadwad et al., 2023; Varrella et al., 2020).

Para estudiar la poliextremofilia en las bacterias se necesitan organismos que puedan servir como modelos. Aunque se han estudiado los genes y proteínas responsables de las propiedades extremófilas mediante su expresión en organismos modelo como *Escherichia coli* y los experimentos ómicos han proporcionado alguna información, ofreciendo un enfoque proteómico (Zannier et al., 2022), transcriptómico (Xue et al., 2019) o metagenómico (Cowan et al., 2015), estos estudios no pueden reemplazar a los análisis que deben realizarse *in vivo* con las bacterias extremófilas.

Algunos ejemplos de estos organismos modelo extremófilos son: *Leptospirillum ferriphilum* (acidófilo), *Natronomonas pharaonis* (alcalófilo y halófilo), *Bacillus halodurans* (halófilo), *Halobacterium* sp. NRC-1 (halófilo y radiófilo), *Deinococcus radiodurans* (radiófilo), o *Thermus thermophilus* (termófilo) (Coker, 2019).

Tabla I1. Tipos de bacterias extremófilas según el tipo de condición extrema.
Adaptado de Rekadwad, (2023).

Tipo de extremófilo	Condición extrema	Ejemplo	Referencia
Acidófilos	pH < 5	<i>Acidithiobacillus ferriphilus</i> sp. nov.	(Falagán & Johnson, 2016)
Basófilos	pH > 9	<i>Alkalibacterium</i> sp.	(Park et al., 2012)
Halófilos	> 1,5 M NaCl	<i>Halomonas nitroreducens</i> strain WB1	(Chikkanna et al., 2018)
Radiófilos	< 1000 Gy radiación gamma	<i>Deinococcus radiodurans</i>	(Blasius et al., 2008)
Piezófilos o barófilos	Alta presión (110 MPa)	<i>Shewanella</i> strains WP2, WP3	(Wang et al., 2004)
Psicrófilos o criófilos	<20°C	<i>Pseudomonas putida</i> ATH-43	(Rodriguez-R & Konstantinidis, 2016)
Termófilos	>45°C	<i>Methanofollis tationis</i>	(Orellana et al., 2018)
Xerófilos (xerotolerantes)	<0,8 a _w	<i>Burkholderia grimmiae</i> R27	(Tian et al., 2013)

D. radiodurans, una bacteria no esporuladora, es una cepa referente no sólo de resistencia a radiación xerotolerancia, sino que además ha sido propuesta como “chasis” biotecnológico con interés industrial y sistema modelo para estudiar los factores metabólicos que sustentan la poliextremofilia y, en particular, la tolerancia a la irradiación y a la desecación (Gerber et al., 2015). La extraordinaria capacidad de *D. radiodurans* para sobrevivir a altas dosis de radiación ionizante ha sido postulada como una adaptación a la desecación, debido a que ambos factores de

III. INTRODUCCIÓN

estrés llevan a la formación de roturas en la doble cadena de ADN (Mattimore & Battista, 1996).

Se ha descrito para esta bacteria algunos procesos en biorreactores, enfocados en la optimización del medio de cultivo y el aumento de la biomasa (He, 2009) y recientemente en la producción de compuestos de valor añadido (Helalat et al., 2021). Además, se han desarrollado varias herramientas genéticas y puede ser modificada para llevar a cabo diferentes aplicaciones biotecnológicas (Brim et al., 2000; Brumwell et al., 2022).

De todos estos tipos de extremofilia mostrados en la [Tabla I1](#), nos vamos a centrar a continuación en la xerotolerancia.

2. Resistencia/tolerancia a la desecación o xerotolerancia

Los microorganismos que viven en ambientes en donde escasea el agua, se denominan xerotolerantes ([Tabla I1](#)). Las zonas áridas en las que sobreviven organismos xerotolerantes constituyen aproximadamente el 10% de la superficie terrestre del planeta y se prevé que este área aumentará sustancialmente como resultado del cambio climático y los procesos de desertificación impulsados por la actividad humana (Lebre et al., 2017). La anhidrobiosis (resistencia o tolerancia a la desecación, xerotolerancia) es la capacidad que tienen algunos organismos de perder casi toda el agua cuando se secan con aire para entrar en un estado metabólico de equilibrio reversible que les permite recuperar sus funciones normales tras la rehidratación (Grzyb & Skłodowska, 2022).

Los organismos pueden experimentar estrés hídrico de dos maneras, o bien en forma de estrés matricial, causado por una baja disponibilidad de agua (desecación, congelación), o bien como estrés osmótico, resultante del aumento de la concentración de sal (Karagulyan et al., 2022). De esta manera, los organismos halófilos que crecen en altas concentraciones de NaCl también son xerófilos. Todo esto ha llevado a que se ha tendido a confundir en ocasiones la desecación con el

estrés osmótico, lo que ha exigido definir más estrictamente qué se entiende por este proceso de desecación (Bosch et al., 2021).

Una definición cuantitativa de la desecación total establece que el contenido de agua en una anhidrobiota (tolerante a la completa desecación) es menor a 0,1 g de agua disponible por 1,0 g de peso seco celular (Alpert, 2005). Se sabe que la mayoría de las bacterias no se pueden dividir a una actividad de agua $a_w < 0,91$ aunque el valor límite de la actividad de agua a partir del cual se da la supervivencia, es muy dependiente del microorganismo (Bosch et al., 2021). Se ha propuesto un límite teórico de supervivencia para los tres dominios de la vida de $a_w = 0,61$ (Stevenson et al., 2015).

Los microorganismos xerófilos son microbios que pueden crecer con poca disponibilidad de agua o baja actividad de agua ($a_w < 0,8$) (Kanekar & Kanekar, 2022). Sin embargo, en términos prácticos, los xerófilos obligados no existen, ya que estos organismos invariablemente tienen actividades fisiológicas y bioquímicas óptimas con una actividad de agua mucho mayor. Por lo tanto, el término xerotolerante podría ser más apropiado para describir organismos que son capaces de resistir el estrés xérico, pero que no requieren una baja actividad hídrica para prosperar (Lebre et al., 2017).

Ante la escasez de agua intracelular, los microorganismos sufren una serie de cambios que se resumen en la [Tabla I2](#). Las bacterias en condiciones de hidratación normal pueden contener entre un 43 y un 69% de contenido en agua (Bratbak & Dundas, 1984). Cuando las bacterias se deshidratan, pasan por dos fases (Greffé & Michiels, 2020). En la primera fase, se pierde el agua extracelular incrementando la concentración de sales y solutos fuera de la bacteria la cual sufre fuertes presiones osmóticas en su interior y se genera un estrés mecánico sobre la membrana (Potts et al., 2005; J. A. C. Vriezen et al., 2007). Como consecuencia, se desplaza el agua citoplasmática al exterior y la célula se encoge y se deforma, ya que la superficie de la membrana se mantiene constante.

Las concentraciones de metabolitos e iones se incrementan dentro de la bacteria (Lebre et al., 2017). Paralelamente, el metabolismo se frena por la falta de fluidez interna, el citoplasma adquiere una consistencia parecida al cristal y las

III. INTRODUCCIÓN

moléculas encuentran dificultad para moverse en el interior (Lebre et al., 2017, Parry et al., 2014). En bacterias aerobias, el desequilibrio metabólico lleva a que se acumulen especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo causando estrés oxidativo (França et al., 2007; Fredrickson et al., 2008). Los ROS atacan a diferentes moléculas afectando a la membrana plasmática, a lípidos y proteínas y a las macromoléculas. (Figura I1). Por ejemplo, se dan reacciones de peroxidación y de desesterificación que dañan el estado micelar de la membrana, y sufre cambios estructurales importantes (Halverson & Firestone, 2000).

Tabla I2. Resumen de los cambios descritos en bacterias durante el proceso de desecación (adaptado de Greffe y Michiels, 2020; Bosch et al., 2021; Rekadwad, 2023).

Modificaciones	Referencias
Medioambientales	
Pérdida del agua extracelular y aumento de la presión osmótica sobre la bacteria.	(Potts et al., 2005; Vriezen et al., 2007)
Fisiológicas	
Daños en la membrana plasmática.	
Pérdida de volumen citoplasmático.	(Suzina et al., 2022)
Pérdida de la motilidad y capacidad de división celular.	(Kato et al., 2004; Pazos-Rojas et al., 2019; Vriezen et al., 2012)
Menor fluidez intracelular.	
La pérdida de agua dentro de la célula incrementa la concentración interna de metabolitos e iones, y hace disminuir la fluidez.	(Filipović, 2020)
Moleculares	
Acumulación de ROS.	
Formación de radicales libres por cambios en las funciones celulares.	(Bogdanov et al., 2008; Chaffey, 2003; Cooper & McNeil, 2015)
Daños en el ADN.	
Reacciones de Maillard, rupturas de la doble cadena, entrecruzamiento, etc.	(Lebre et al., 2017)

Mecanismos de protección de ADN y reparación ralentizados, el daño se acumula.

Baja actividad metabólica.

Menor fluidez en el interior de la bacteria y menor disponibilidad del agua que ralentiza el metabolismo. (Lebre et al., 2017)

Daños en las proteínas.

Estrés oxidativo que oxida las proteínas. (Fredrickson et al., 2008; García, 2011; Köhn & Kovermann, 2019)
Falta de agua intracelular que altera el plegamiento de las proteínas y produce cambios conformacionales, agregaciones, etc.

Por otra parte, la pérdida de agua en el interior bacteriano modifica propiedades de las proteínas como su estabilidad, tasas de asociación y su conformación funcional (Köhn & Kovermann, 2019). El daño estructural a proteínas provoca que pierdan funcionalidad o tiendan a agregar, causando estrés metabólico. Más aún, esta disfunción proteica lleva también a que se generen más ROS, acelere los procesos de agregación molecular, induce la peroxidación lipídica y provoca reorganizaciones de la membrana (Bednarska et al., 2013).

El estrés oxidativo se considera que puede ser la principal causa de sensibilidad a la desecación en bacterias (García, 2011). No menos importantes son los daños al ADN, que tiene lugar a través de modificaciones covalentes como rupturas del doble enlace, modificaciones covalentes o entrecruzamientos (Lebre et al., 2017). Además, los mecanismos de protección y reparación del ADN se encuentran ralentizados lo cual lleva a que los daños se vayan acumulando.

En la segunda fase de la desecación, se pierde parcialmente el agua que está asociada a las macromoléculas y que puede suponer un 15% del contenido total de agua bacteriano (França et al., 2007). Si además hay presencia de radiación solar, se generarían más ROS y la viabilidad se vería disminuida.

Otros autores en vez de dos fases durante el proceso de desecación distinguen tres etapas en función del contenido en agua celular (Bosch et al., 2021): un estado totalmente hidratado al que se denomina tipo III ($0,85 \leq a_w \leq 1,00$), el estado anhidrobiótico o tipo I ($a_w \leq 0,25$) y un estado de transición entre ambos o tipo II. De cualquier modo, el proceso de desecación es un proceso complejo debido a todos los

III. INTRODUCCIÓN

mecanismos y cambios que se desencadenan en las membranas, proteínas y DNA que llevan a la bacteria a un estado de estrés intenso que termina finalmente con la muerte de la mayoría de las bacterias (Grefe & Michiels, 2020). Las causas de muerte debido a la anhidrobiosis incluyen cambios irreversibles de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos debidos a la desnaturalización o rotura estructural, y acumulación de especies reactivas del oxígeno durante el proceso de secado, especialmente cuando tiene lugar bajo radiación solar.

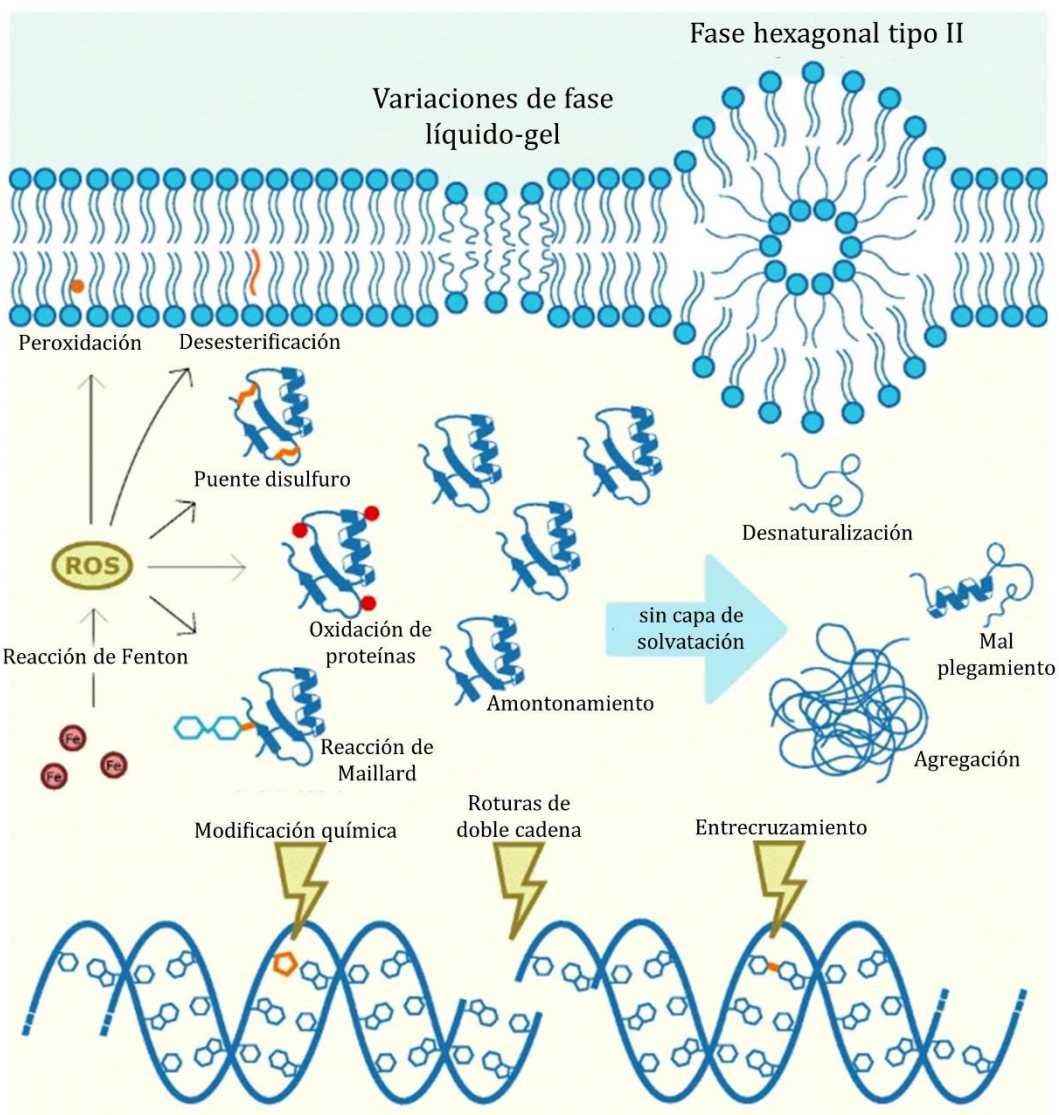


Figura I1. Esquema de los diferentes tipos de daño molecular que tienen lugar en las bacterias durante la desecación. Adaptado de Grefe & Michiels (2020).

2.1. Mecanismos de tolerancia a la desecación

Para evitar la disfunción celular y la muerte, los organismos xerotolerantes cuentan con mecanismos protectores. Veamos a continuación con más detalle los mecanismos bacterianos frente a la xerotolerancia.

2.2. Esporulación

Algunos géneros, como *Bacillus*, *Streptomyces* y *Clostridium*, han desarrollado células especializadas, denominadas esporas, para sobrevivir períodos prolongados de escasez de nutrientes o de falta de agua. Estas esporas latentes contienen un citoplasma deshidratado encerrado en una multicapa altamente protectora, haciéndolas resistentes a condiciones ambientales extremas (Gray et al., 2019).

La endospora (Figura I2) consta de un compartimento central, delimitado por una bicapa lipídica, que contiene una copia del genoma. El núcleo está rodeado por una serie de estructuras concéntricas que mantienen la latencia y la protección. El peptidoglicano (PG) de la corteza es esencial para la adquisición y el mantenimiento de la resistencia al calor, y la cubierta proteica (capa interna) que rodea la corteza la protege de la acción de enzimas degradadoras del PG (Abecasis et al., 2013).

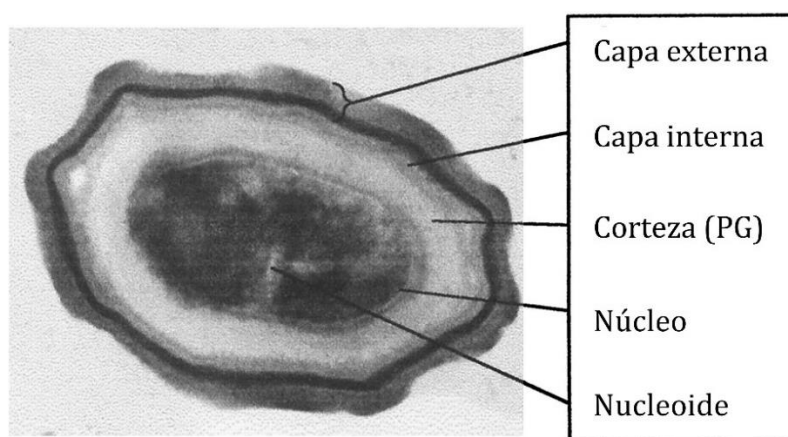


Figura I2. Corte transversal de una espora de *B. subtilis* visualizada por microscopía electrónica de transmisión (MET). Adaptado de Nicholson et al. (2000).

III. INTRODUCCIÓN

Las capas superficiales de las esporas (la cubierta y el exosporio o capa externa, cuando están presentes) también median en las interacciones ambientales de la endospora, incluida la adhesión y el reconocimiento de compuestos que desencadenan la germinación (Abecasis et al., 2013).

Las esporas son conocidas como la forma de vida más resistente de la Tierra, y se ha invertido un esfuerzo considerable en comprender los mecanismos moleculares responsables de la resistencia de las esporas a ambientes que existen en los extremos físicos de la vida terrestre (Nicholson et al., 2000). En estado latente, las esporas no experimentan ningún metabolismo detectable y exhiben un mayor grado de resistencia a diversos estreses físicos, como calor húmedo y seco, radiaciones ultravioleta y gamma, desecación extrema (incluido el vacío) y agentes oxidantes (Nicholson et al., 2000).

2.3. Latencia

La latencia o letargo es otra de las estrategias que presentan las bacterias para contrarrestar el estrés. Las células entran en un estado de actividad reducida y mayor resistencia en el que permanecen hasta que las condiciones de estrés desaparecen (McDonald et al., 2023). Las características más comunes de las formas quísticas o latentes son la presencia de envolturas celulares engrosadas, la estructura alterada de las membranas celulares, el citoplasma de grano fino o grumoso, y el nucleoide condensado (Suzina et al., 2006).

Las células latentes comparten algunos rasgos comunes asociados con la entrada, el mantenimiento y la salida de la latencia, pero la combinación específica de rasgos puede ser diferente en los distintos géneros. Además, la latencia no está definida por ningún rasgo único, sino que las células pueden emplear una variedad de mecanismos para aumentar su resiliencia ambiental y al mismo tiempo disminuir su actividad general (McDonald et al., 2023).

La latencia es una estrategia presentada principalmente por bacterias Gram-positivas y cianobacterias, aunque no exclusivamente, (García, 2011). En este sentido es interesante el caso de los quistes de *Azotobacter vinelandii*, cuyo desarrollo comienza con la reducción de nutrientes, formando una célula grande y

esférica que almacena intracelularmente gránulos de polihidroxitirato (PHB) y presenta una capa exterior compleja, además de varias capas protectoras. Estos quistes son altamente resistentes a la desecación, pero, a diferencia de las endosporas, tienen una resistencia mínima al calor (Berleman & Bauer, 2004).

Dado que durante el proceso de desecación el metabolismo está muy afectado, es de esperar que se generen moléculas protectoras y se reorganice el metabolismo desde el mismo momento que la actividad de agua sea baja. Los estudios transcriptómicos realizados en *Rhodococcus* o *Anabaena* han probado que entre 1 y 3 h desde el inicio del proceso de desecación tienen lugar cambios en la expresión a la baja mientras que los cambios al alza tienen lugar de 6 a 12 h desde el fin de la etapa de sequedad (Kato et al., 2004; LeBlanc et al., 2008). Sin embargo, otros estudios realizados en bacterias indican que en las primeras horas de desecación sí que se sobreexpresan genes relacionados con los sistemas de protección como chaperonas, proteínas frente al estrés oxidativo, sistemas de reparación del ADN, metabolismo de ácidos grasos o la síntesis de ADN entre otros (Cytryn et al., 2007; García-Fontana et al., 2016; Li et al., 2012; Palud et al., 2020; Rajeev et al., 2013). Posteriormente, en la fase de rehidratación, se observan cambios bruscos en la expresión génica. Por ejemplo, *P. putida* regula al alza el catabolismo de la fenilalanina y la tirosina tan solo 20 min desde la adición de agua probablemente para proveer de una fuente de carbono que permita obtener energía (López-Lara et al., 2020). De manera similar, el estudio metatranscriptómico realizado con microbiomas de un suelo desecado mostró que se regularon al alza genes relacionados con sistemas de transporte y motilidad mientras que se regularon a la baja genes de respuesta a estrés y genes de adquisición de carbono autótrofo tan solo 10 min después de adicionar agua (León-Sobrino et al., 2021).

Por otra parte, aunque las funciones metabólicas son muy limitadas una vez que se entra en la fase anhidrobiótica, se siguen detectando tasas de expresión, aunque muy bajas. Por ejemplo, menos del 5% de todo el genoma se expresa en *Salmonella entérica* en una a_w de 0,3 (Deng et al., 2012). De igual manera para otras bacterias como *Bradyrhizobium japonicum*, se detectó la expresión de una proteína de shock por calor Hsp20, de factores sigma, de reguladores transcripcionales y de la subunidad CtpA del *pili* (Cytryn et al., 2007).

III. INTRODUCCIÓN

Estos estudios transcriptómicos se han realizado en el laboratorio, pero existen algunos intentos de estudios *in situ* con el microbioma de una muestra de suelo desecada y así en el desierto hiperárido de Namib, se ha detectado transcripción de genes de enzimas relativas al metabolismo del nitrato y del metabolismo del 3-P-glicerato (Carlos León-Sobrino et al., 2021), lo que reafirma la idea de que se puede detectar cierto nivel de transcripción durante la fase anhidra.

Pero ¿cómo puede la bacteria sobrevivir una vez que ya permanece en la fase de desecación? Para minimizar los daños, los organismos xerotolerantes han desarrollado mecanismos únicos que les permiten mantenerse viables (Greffé & Michiels, 2020; Lebre et al., 2017) (Figura I3):

- **Cambio en las concentraciones de metales.** Se ha visto que las concentraciones de hierro y manganeso afecta al proceso de desecación. Una baja concentración intracelular de hierro es capaz de aumentar la xerotolerancia porque muchas de las reacciones que generan radicales dependen de este elemento (García, 2011). El manganeso por otra parte, forma complejos que mantienen la concentración de radicales bajo. Por ejemplo, el aumento de la relación Mn^{2+}/Fe^{2+} en *D. radiodurans* está estrechamente relacionado con la resistencia a la radiación y a la desecación. El Mn^{2+} puede proteger algunas proteínas reparadoras del ADN del daño oxidativo y así preservar la actividad enzimática (Liu et al., 2023).
- **Cambios metabólicos.** El proceso de desecación lleva a importantes cambios metabólicos con el fin de preservar energía. Se utilizan fuentes alternativas de carbono, como los ácidos grasos, para producir mayores rendimientos de ATP (Finn et al., 2013), y se reprimen procesos que consumen energía, como la motilidad flagelar. Disminuir la tasa metabólica puede también llevar a reducir la presencia de ROS (França et al., 2007). De todos modos, en algunas bacterias se ha detectado que se activan determinadas rutas durante el proceso de desecación: en bacterias desecadas de *Cronobacter sakazakii* y *B. japonicum*, se activa la ruta de las pentosas fosfato (Cytryn et al., 2007; Srikumar et al., 2019). Pero otras rutas como la glicolisis o la fosforilación oxidativa se encuentran potenciadas en varias especies bacterianas durante la desecación (Gruzdev et

al., 2012; Katoh et al., 2004; Srikumar et al., 2019). La respuesta general a la desecación se activa en fase estacionaria y se ha descrito que la tolerancia a la desecación se incrementa si este proceso tiene lugar en esta fase (Vriezen et al., 2007). Es posible que la respuesta general al estrés permita que se expresen muchos genes que den una protección cruzada a la desecación (Grefe & Michiels, 2020). Por ejemplo, permitiendo la expresión de proteínas intrínsecamente desestructuradas (Boothby et al., 2017) y expresión de proteínas de shock por calor o por frío (Xue et al., 2019).

- **Incremento de la concentración intracelular de osmolitos y solutos compatibles.** Los osmolitos reemplazan al potasio después del choque hiperosmótico y se toman del medio o se sintetizan intracelularmente (Paul, 2013). Estas moléculas orgánicas se acumulan intracelularmente para contrarrestar la presión osmótica, pero no son tóxicas a altas concentraciones. Además, son capaces de estabilizar la membrana, y previenen la formación de radicales hidroxilo al disminuir las tasas de difusión intracelular. La desnaturalización proteica puede verse también disminuida por la presencia de osmolitos que reemplazan al puente de hidrógeno de la molécula de agua. Algunos ejemplos de estos solutos compatibles son: i) azúcares como la trehalosa, la fructosa, la sacarosa, etc.; ii) polioles o derivados como glicerol, sorbitol, orcinol etc.; iii) aminoácidos o derivados como taurina, arginina, ectoína etc.; iv) metilaminas como la glicina betaína y otras betaínas; v) moléculas tipos metilsulfonio (Vilchez et al., 2018, Manzanera, 2020, González et al., 2019, Kageyama & Waditee-Sirisattha, 2022). Los efectos concretos de estos compuestos osmoprotectores dependen de la cepa en cuestión (Lebre et al., 2017). La trehalosa podría actuar no solo como una chaperona químicamente sino también como un metabolito que de modo indirecto contrarresta los procesos de acetilación y glicación de las proteínas (Laskowska & Kuczyńska-Wiśnik, 2020).
- **Producción de moléculas que estabilizan a las proteínas tipo chaperonas y proteasas que degraden proteínas dañadas** (Lebre et al., 2017). Las chaperonas permitirían el correcto plegamiento de las proteínas. Las chaperonas DnaK y DnaJ intervienen en la protección a la desecación en

III. INTRODUCCIÓN

Salmonella typhimurium (Mandal & Kwon, 2017). También se ha descrito el incremento en la co-chaperona GrpE y la proteasa ClpB en células desecadas de *Acinetobacter baumannii* (Gayoso et al., 2014). Se ha visto también sobreexpresión de chaperonas tras la desecación de *B. japonicum* (Cytryn et al., 2007).

- **Regulación de la expresión de captadores de ROS.** Los captadores de ROS, como las peroxidasas, la superóxido dismutasa y las catalasas, están regulados positivamente (Seixas et al., 2022), mientras que procesos como la fotosíntesis se regulan negativamente o incluso degradando el aparato fotosintético (Rachedi et al., 2020). La enzima superóxido dismutasa es capaz de convertir el anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno que pasa a ser degradado por catalasas y peroxidasas. La inducción de genes *chrC* y *sodF* que codifican a la superóxido dismutasa se encuentra regulada al alza durante la desecación de *B. japonicum* (Cytryn et al., 2007). También se ha descrito en células desecadas de *A. baumannii* (Gayoso et al., 2014) y de *Anabaena* sp. (Singh et al., 2013). Existen otros antioxidantes como el glutatión, el ácido ascórbico y la vitamina E que pueden prevenir el daño oxidativo y que podrían estar interviniendo en la desecación. Por ejemplo, se ha visto que la inserción de un transposón en el gen de síntesis del glutatión en *Listeria monocytogenes* lleva a que la tasa de supervivencia tras la desecación sea menor (Hingston et al., 2015).
- **Reparación del daño al ADN.** La reparación del ADN es importante durante el proceso de desecación y de hecho, se ha visto que las tres rutas de reparación del ADN están relacionadas con la xerotolerancia, permitiendo la expresión de proteínas de unión al ADN que actúan como escudo físico y proteínas reparadoras del ADN que corrigen los cortes de doble cadena (Rath & Das, 2023). Como ejemplos, los mutantes de *Ensifer meliloti* en los genes *uvr* que son parte del sistema de reparación NER (reparación por escisión de nucleótido) presentaron mayor dificultad ante desecación prolongada (Humann et al., 2009). De igual manera, se ha probado que mutantes en las rutas de reparación de recombinación homóloga y en la de NHEJ (*non-homologous end joining*),

afectan al proceso de desecación en diferentes bacterias (Aranda et al., 2011; Cytryn et al., 2007; Dupuy et al., 2017).

- **Cambios en la composición de la membrana** (modificación de los fosfolípidos de membrana). El cambio en la composición de la membrana lleva a que se modifique la fluidez evitando cambios de fase de la membrana indeseados y disminuyendo la posibilidad de sufrir estrés oxidativo. Pueden actuar por tanto como antioxidantes y mantienen la impermeabilidad iónica de la membrana celular, además de ayudar a retener agua (Liu et al., 2023). Se ha encontrado una alta saturación y altas ratios *trans/cis* de ácidos grasos monoinsaturados después del proceso de desecación, lo que lleva a disminuir la fluidez (Halverson & Firestone, 2000). Además, de este modo se evitan los fosfolípidos insaturados que son más sensibles al estrés oxidativo. Se ha visto también en bacterias xerotolerantes como *L. monocytogenes* que se evitan los ácidos grasos de cadena corta y ramificada ya que aumentan la fluidez de la membrana (Hingston et al., 2015). Además de los fosfolípidos, los lipopolisacáridos también tienen importancia durante la desecación (Mandal & Kwon, 2017). Esto se ha comprobado en células desecadas de *Salmonella enterica* (Gruzdev et al., 2012), *Rhizobium leguminosarum* (Vanderlinde et al., 2009) y *B. japonicum* (Cytryn et al., 2007).
- **Incremento de la biosíntesis de sustancias poliméricas extracelulares (e.g., exopolisacáridos, EPS) y construcción de biopelículas.** Se ha demostrado su implicación en la xerotolerancia de muchas bacterias, estando su expresión al alza en *B. japonicum*, *L. monocytogenes* y *S. enterica* (Cytryn et al., 2007; Hansen & Vogel, 2011; A. P. White et al., 2006). Los exopolisacáridos protegen de la desecación de diferentes maneras: tienen una naturaleza higroscópica sirviendo como reservorio de agua por periodos largos (Lebre et al., 2017), sirven de escudo de estreses abióticos (Casillo et al., 2018), promueven la agregación bacteriana y la formación de biopelículas y evitan la entrada compuestos tóxicos al interior celular (Vriezen et al., 2007).

Una vez que la célula detecta una reducción en la a_w , responde progresivamente en función de la intensidad y duración de la ausencia de agua. Los

III. INTRODUCCIÓN

mecanismos que se activan primero son aquellos que son los más favorables energéticamente, dejando los más especializados si estos no resultan suficientes (Bremer & Krämer, 2019; Manzanera, 2021). Aunque se desconocen los interruptores moleculares que activan estos mecanismos, se ha sugerido que los factores sigma alternativos, que están involucrados en las respuestas generales al estrés, son cruciales para coordinar la adaptación celular al estrés xérico (Lebre et al., 2017).

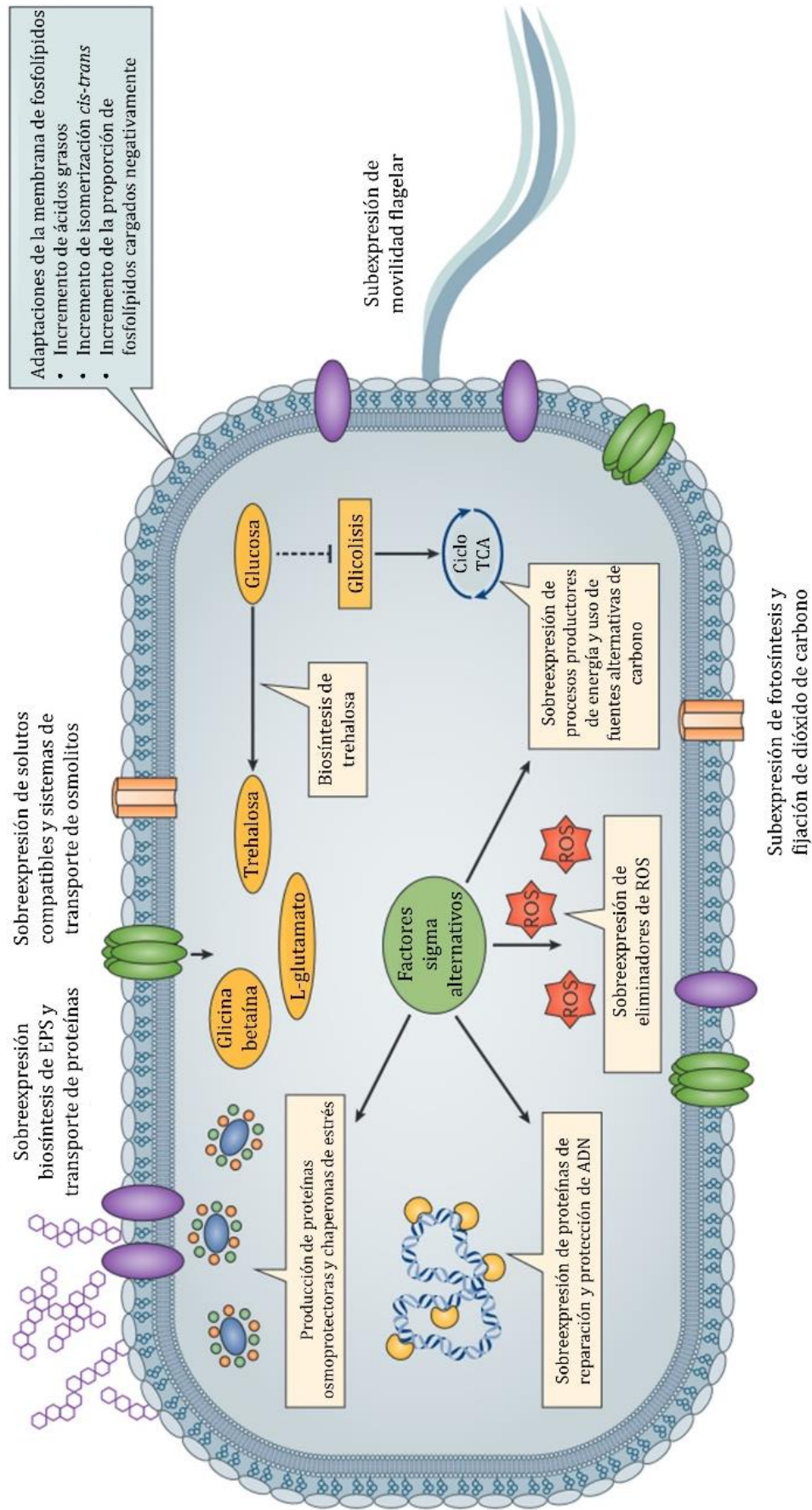


Figura I3. Mecanismos adaptativos de bacterias xerotolerantes. Ciclo TCA, ciclo del ácido tricarbóxico. Adaptado de (Lebre et al., 2017).

3. Aplicaciones de las bacterias extremófilas xerotolerantes

La bioprospección es la búsqueda de microorganismos, o sus partes (p. ej. enzimas), para desarrollar herramientas con fines biomédicos, farmacéuticos, agrícolas o aplicaciones industriales (Ayilara et al., 2023; Saeed et al., 2022; Stirk & van Staden, 2022; Tanner et al., 2018). Las bacterias extremófilas representan un gran recurso que pueden explotarse para muchas aplicaciones (Irwin, 2020). Entre estas bacterias, los microorganismos procedentes de ambientes altamente irradiados y secos ya sean naturales (p. ej. desiertos) o artificiales (p. ej. paneles solares) poseen características específicas características que los hacen interesantes desde una perspectiva biotecnológica, ya que estos microorganismos desarrollan mecanismos para hacer frente a la alta dosis de radiación (en particular, radiación ultravioleta) y al proceso de desecación.

Por ejemplo, conocer los mecanismos que llevan a resistir a la desecación puede abrir nuevos campos que permitan aplicarlo en otras bacterias. Se han realizado algunos intentos de extrapolar los mecanismos de xerotolerancia a bacterias o componentes de estas que no lo son; por ejemplo, utilizando ocho diferentes combinaciones de compuestos xerotolerantes detectados en actinobacterias, se ha conseguido proteger de la desecación a algunas enzimas (p. ej., lipasas) o microorganismos sensibles a este proceso (p. ej., *E. coli*) (Narváez-Reinaldo et al., 2010). Por esta razón, la búsqueda de nuevos xeroprotectores junto con protocolos de desecación adecuados podrían ser útiles para aplicarlos a la preservación de organismos difíciles de conservar (Manzanera, 2021).

Conocer y controlar el proceso de la desecación sería útil también para almacenar microorganismos en colecciones de cultivos, pero también tendría otras posibles aplicaciones: i) Producción de probióticos para tener cepas resistentes a la desecación o xeroprotectores para combatir el estrés oxidativo (García, 2011; SantaCruz-Calvo et al., 2013); ii) en el campo de la nutrición para obtener alimentos funcionales no perecederos o en la industria alimentaria en donde se desea prevenir la contaminación bacteriana en alimentos con escaso contenido en agua (Lopez-Rubio et al., 2006); iii) en agricultura para producir bioestimulantes o biofertilizantes resistentes a periodos de sequía (Vílchez et al., 2018); iv) en la

industria del biocombustible (Godoy et al., 2018; Yarberry et al., 2019). En todos estos casos, el peso de los inóculos bajo una forma seca y estable que fuera rehidratable por el usuario final, facilitaría el transporte, evitaría el daño por estrés que afectara a la viabilidad y disminuiría costes, pues evitaría romper la cadena del frío (Manzanera, 2021).

Otro modo de explotar a las bacterias xerotolerantes, es aprovechar su potencial de producción de compuestos que pueden ser interesantes. Por ejemplo, las abenquinas con capacidad anti-inflamatoria que se pueden obtener de *Streptomyces* sp. DB634 aislada de Salar de Tara del desierto de Atacama, Chile, una región cuyo suelo se ha comparado con Marte por sus características tan extremas (Komatsu et al., 2013; Schulz et al., 2011). En la [Tabla I3](#) se recogen otros ejemplos de biocompuestos obtenidos de organismos xerotolerantes con interés médico.

Por otro lado, la tolerancia a la desecación o xerotolerancia ofrece también perspectivas para aplicaciones directas de las propias bacterias (Chen & Jiang, 2018). Se está estudiando, por ejemplo, como microorganismos que han sido expuestos al estrés de la sequía, entre otros estreses, podrían mejorar la respuesta y aumento de la resiliencia al cambio climático de los bosques (Ahmed et al., 2022; Allsup et al., 2023; Maestre et al., 2015; Makhalanyane et al., 2015).

Sin embargo, aún es necesario desarrollar métodos innovadores para optimizar la explotación directa de los microorganismos xerotolerantes, abordando las dificultades para su cultivo a escala industrial y empleando el organismo completo como biocatalizador (Coker, 2016). De todos modos, hay que tener en cuenta también que el comportamiento de las comunidades microbianas en condiciones distintas a las del laboratorio pueden ser diferentes, ya que a menudo se tienen interacciones con el resto de las especies que pueden dar diferentes resultados. Por ejemplo, la cianobacteria *Microcoleus vaginatus* puede continuar fijando carbono a actividades de agua inferiores a los reportados en los experimentos del laboratorio cuando se ha analizado *in situ* en costras de suelo (Rajeev et al., 2013).

III. INTRODUCCIÓN

Tabla I3. Compuestos bioactivos obtenidos de actinobacterias xerotolerantes. (Adaptado de Hui et al., 2021).

Cepa	Lugar de aislamiento	Compuesto	Actividad	Referencia
<i>Streptomyces</i> sp. DB634	Salar de Tara del desierto de Atacama, Chile.	Abenquinas A y D	Anti-inflamatorio.	(Schulz et al., 2011)
<i>Streptomyces</i> sp. C34	Salar de Tara del desierto de Atacama, Chile.	Chaxamicina A-D	Antibiótico contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> Actividad antitumoral.	(Rateb et al., 2011)
<i>Lentzea</i> sp. H45	A más de 5000m de altura en el Desierto de Atacama.	Lentzeosidos A-F $C_{12}H_{22}O_5$	Inhibición de la integrasa de VIH.	(Wichner et al., 2017)
<i>Streptomyces</i> sp. DA3-7	Desierto de Arabia Saudí.	Piridina-2,5-diacetamida	Actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> . Actividad antifúngica frente a <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. neoformans</i> .	(Nithya et al., 2018)

A continuación, se revisan algunas de las posibles aplicaciones de estas bacterias xerotolerantes.

La exposición a compuestos xenobióticos es una preocupación creciente por el peligro que suponen para la salud, y por eso cada vez recibe más atención la búsqueda de procesos biológicos sostenibles, rentables y robustos para la eliminación de estos compuestos. Las bacterias extremófilas poseen sistemas enzimáticos y catalíticos para la degradación eficaz de contaminantes (Shukla & Singh, 2020), por lo que han surgido como una gran oportunidad para enfrentarse a estos contaminantes.

Los contaminantes orgánicos son una clase de compuestos orgánicos muy amplia desde el punto de vista químico, liberados en el medio ambiente como desechos tóxicos producto de aguas residuales que incluyen pesticidas, fertilizantes, hidrocarburos, fenoles, plastificantes, bifenilos, detergentes, aceites, grasas y productos farmacéuticos (Gallo et al., 2021).

Para hacer frente a este tipo de contaminantes se han encontrado extremófilos como *Geobacillus pallidus* XS2 y XS3, que se aislaron de muestras de suelo contaminadas con petróleo en el yacimiento petrolífero de Yumen, China, y fueron capaces de producir bioemulsionantes a partir de diferentes hidrocarburos (Zheng et al., 2011), o la cepa termófila (temperatura óptima 65°C) *Bacillus termoleovorans* sp. A2, con capacidad para degradar el fenol y que es insensible al estrés hidrodinámico en biorreactores con agitación (Feitkenhauer et al., 2001).

La biometalurgia es la rama de la biotecnología que explota la interacción entre microorganismos y metales. Incluye procesos microbianos como la biosorción de metales, la bioacumulación o la biominería (Gallo et al., 2021). Existen ejemplos de extremófilos empleados en la biorremediación de metales, metaloides o lantánidos, como la bioacumulación de europio por una bacteria termófila *Thermus scotoductus* SA-01 (Maleke et al., 2019), o la reducción de metales pesados como el cromo o el plomo por la bacteria *Anoxybacillus rupiensis* 19S, aislada de aguas termales en Limpopo, Sudáfrica (Jardine et al., 2018).

Otro de los objetivos de la biorremediación es la eliminación de residuos plásticos, cuyo impacto negativo afecta a seres humanos y vida salvaje. El uso de microorganismos extremófilos, que en un periodo relativamente corto de tiempo han evolucionado para adaptarse a este nuevo sustrato, abre la puerta a procesos

III. INTRODUCCIÓN

llevados a cabo bajo condiciones extremas que contribuyen a la degradación de los plásticos (Atanasova et al., 2021). Se ha estudiado la degradación de plásticos empleando termófilos, como la bacteria *Brevibacillus borstelensis*, que degrada polietileno con mayor eficiencia si éste es tratado con radiación UV (ultravioleta) (Hadad et al., 2005). Sin embargo, la aplicación industrial de estas enzimas extremófilas degradadoras de plásticos es todavía limitada debido a las dificultades de cultivo y a la reducida actividad de las enzimas (Atanasova et al., 2021).

La fermentación en estado sólido es una técnica en la que los microorganismos se cultivan en condiciones controladas en soportes sólidos con suficiente humedad para mantener el metabolismo microbiano (Krishna, 2005).

Estas fermentaciones en estado sólido surgen de la necesidad de encontrar nuevos procesos más baratos, que ocupen un menor volumen y que no necesiten esterilidad. No existen todavía muchos estudios de fermentación en estado sólido realizados con extremófilos; a modo de ejemplo, se ha reportado la producción de extremo-enzimas (actividades enzimáticas que provienen de organismos extremófilos y pueden seguir funcionando en condiciones extremas) con actividad lipasa/esterasa a partir de arqueas (Martin del Campo et al., 2015) y la producción del péptido antimicrobiano halocina C8 a partir de *Halorubrum* sp. SSR (Meknaci et al., 2014). Se ha planteado también un método novedoso de ingeniería en el que las biotransformaciones podrían mantenerse en condiciones de escasez de agua o casi sequedad (Arora et al., 2018). Para alcanzar este objetivo, sería necesario recurrir a extremófilos capaces de resistir la desecación y mantenerse activos en condiciones de baja disponibilidad de agua.

4. Bioprospección de nichos extremófilos

Los entornos poco explorados y en especial los nichos hostiles son muy prometedores para el descubrimiento de compuestos, microorganismos o consorcios con nuevas aplicaciones industriales (Tanner et al., 2018).

Hasta la fecha, los hábitats marinos extremos no se han explotado adecuadamente como recurso de quimiodiversidad. Algunos estudios recientes revelan la existencia de moléculas implicadas en las interacciones entre invertebrados y microbios en condiciones ambientales extremas (Lo Giudice & Rizzo, 2022). Existen también entornos artificiales o humanizados extremos que se encuentran habitados por microorganismos con cualidades especiales. Nos centramos a modo de ejemplo, en dos de estos entornos: los que imitan condiciones que se puedan encontrar en otros ambientes fuera de la Tierra y los paneles solares.

4.1. Astrobiología

La investigación de los extremófilos realiza una valiosa aportación al avance de la astrobiología. A través de este campo, se busca comprender la capacidad de algunos organismos para sobrevivir en la Tierra en condiciones extremas, lo que amplía la capacidad de descubrir la existencia potencial de vida en otros planetas (Irwin, 2020).

Existen múltiples hábitats en la Tierra que simulan nichos que podríamos encontrar fuera de nuestro planeta. Uno de los hábitats extremófilos más conocidos en España, Río Tinto (Huelva), es un lugar en el que el pH ácido del agua (pH 2) y la producción de minerales precipitados (p. ej., jarosita, goethita) representan un entorno geológico distintivo que es útil para la evaluación de procesos biológicos e inorgánicos comparables a los encontrados por los Rover enviados para la exploración de Marte (Thombre et al., 2020).

Otro nicho extremo, cuya comunidad microbiana singular podría ofrecer una perspectiva significativa para la posibilidad de vida en entornos fríos extraterrestres, son los manantiales del Alto Ártico canadiense. En este ecosistema, sostenido por permafrost y que presenta condiciones anóxicas, oligotróficas y con temperaturas cercanas a cero, se describió cómo la bacteria *Thiomicrothabodus*, una especie quimiolitotrofa oxidante de sulfuros, domina estas aguas, junto con actinobacterias, bacteroidetes y cianobacterias (Magnuson et al., 2021).

En los últimos años se ha intensificado la investigación del microbioma en la Estación Espacial Internacional debido a consideraciones cruciales como la salud de

III. INTRODUCCIÓN

los astronautas o a la gran oportunidad que plantea el aislamiento de nuevas especies, que podrían ser de interés en el ámbito de la Astrobiología (Thombre et al., 2020). Se ha informado del descubrimiento de nuevos organismos, como *Solibacillus kalamii* ISSFR-015, aislado de un filtro de detención de partículas de alta energía a bordo de la Estación Espacial Internacional (Thombre et al., 2020).

4.2. El panel solar

Aunque en la Tierra se pueden encontrar muchos entornos naturales extremos y complejos, se han realizado investigaciones sobre si los microorganismos pueden adaptarse a estructuras fabricadas industrialmente soportando condiciones ambientales extremas, como es el caso de los paneles solares (Dorado-Morales et al., 2016).

Las superficies de los paneles solares son de vidrio, lisas, con una capacidad mínima de retención de agua y una exposición máxima a la luz solar (orientada al ecuador). Estas estructuras artificiales se pueden encontrar prácticamente en todo el mundo, y su configuración bidimensional, inerte y no porosa, las convierten en una representación de los entornos naturales expuestos al sol, como las rocas, la filosfera o la capa superior del suelo. Además, las superficies de los paneles solares no sólo están expuestas a la desecación y a una alta irradiación, sino también a frecuentes fluctuaciones de temperatura, lo que las convierte en fuentes ideales de microorganismos resistentes al estrés (Dorado-Morales et al., 2016; Porcar et al., 2018; Satari et al., 2023).

Curiosamente, los paneles solares albergan una comunidad microbiana muy diversa, que puede proporcionar potenciales poliextremófilos (Porcar et al., 2018; Tanner et al., 2018). El análisis del metagenoma de los paneles solares en un estudio realizado por Dorado-Morales et al., 2016, indicó que su perfil se mapea próximo al de otros ambientes expuestos a luz solar, como las alfombras microbianas polares, el filoplano, las rocas orientadas al sol y los desiertos fríos y calientes, y se situaban muy lejos de los metagenomas asociados al ser humano (Figura I4).

El análisis metaproteómico reveló abundancia de proteínas implicadas en la resistencia a condiciones adversas y la formación de biopelículas, así como

diferencias entre la composición proteica en muestras tomadas durante el día y la noche, lo que sugiere que las comunidades microbianas que habitan estas superficies son biológicamente activas y poseen mecanismos de respuesta al estrés (Dorado-Morales et al., 2016). La bioprospección de este nicho tan singular ha dado como resultado el aislamiento de bacterias pigmentadas en las que se estudiaron sus propiedades antioxidantes (Tanner et al., 2019).

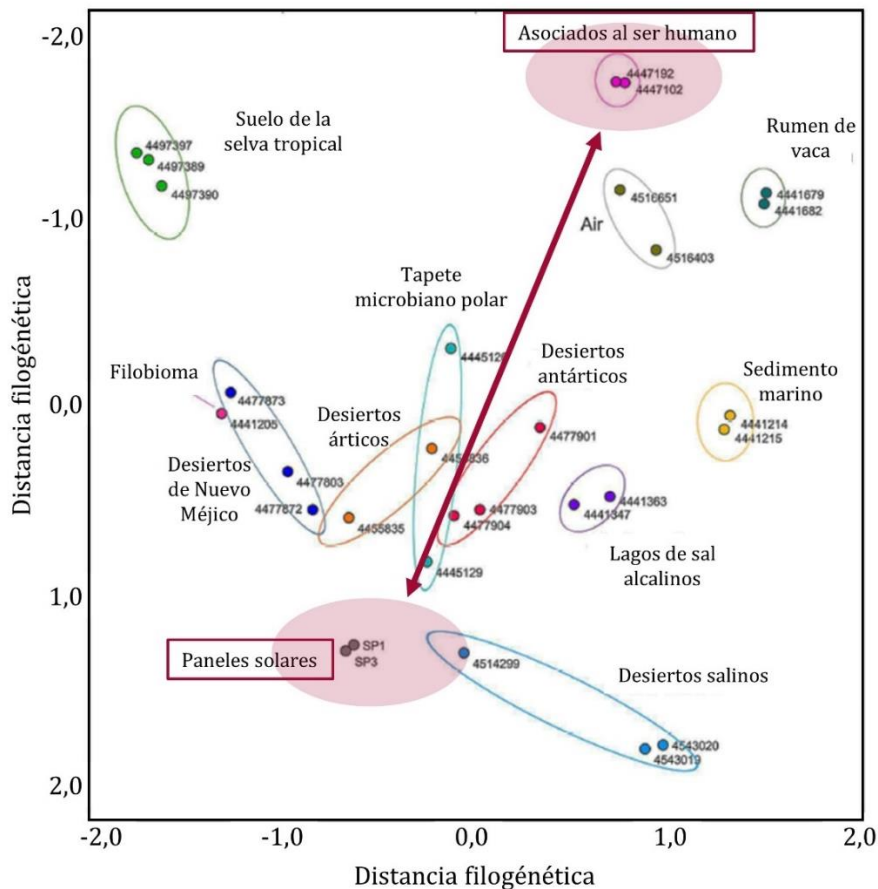


Figura I4. Contexto biogeográfico de los microbiomas de los paneles solares según se deduce de su perfil taxonómico. Análisis de coordenadas principales realizado con el perfil taxonómico de una variedad de metagenomas de diversos ecosistemas. Adaptado de Dorado-Morales et al. (2016).

Dentro del grupo de investigación en donde se ha llevado a cabo esta tesis doctoral, se aislaron del mismo panel solar la bacteria *Arthrobacter* sp. Helios, que se ha estudiado también por sus características poliextremófilas (Hernández-

III. INTRODUCCIÓN

Fernández et al., 2022), y la bacteria *Exiguobacterium* sp. Helios, cuyo estudio es el objetivo principal de este trabajo.

5. El género *Exiguobacterium*

El género *Exiguobacterium* pertenece al orden *Bacillales*, del filo con bajo contenido en G + C firmicutes, que comprende un grupo diverso de bacterias pigmentadas, Gram-positivas, anaerobias facultativas y con morfologías variables desde bacilos hasta cocos (Kasana & Pandey, 2018). *Exiguobacterium* fue propuesto como un nuevo género cerca de 40 años atrás (Collins et al., 1983), incluyendo 23 especies reconocibles en el momento de escritura de esta tesis (Tabla I4). Las cepas pertenecientes a este género han sido aisladas de una colección globalmente diversa de muestras ambientales tales como suelo, sedimentos, agua marina, permafrost, rizosfera de plantas, glaciares, efluentes industriales y respiraderos hidrotermales.

Este género se encuentra actualmente dividido en dos grupos principales, basados en un análisis taxonómico y filogenético utilizando secuencias del gen 16S ARNr: el Clado I comprende cepas aisladas de ambientes fríos, mientras que el Clado II incluye cepas de ambientes marinos alcalinos y fuentes termales (Zhang et al., 2021).

Tabla I4. Especies reconocibles del género *Exiguobacterium* y su nicho de aislamiento.

Espece	Procedencia	Referencia
<i>E. acetylicum</i>	Suelo de la rizosfera de un huerto de manzanos.	(Selvakumar et al., 2009)
<i>E. aestuarii</i>	Superficie del Mar Amarillo en Corea.	(Kim et al., 2005)
<i>E. algae</i>	Algas de la costa de China.	(Liu et al., 2021)
<i>E. alkaliphilum</i>	Lodos de drenado de aguas residuales alcalinas, Nueva Delhi Mohan.	(Mohan Kulshreshtha et al., 2013)

<i>E. antarcticum</i>	Agua del estanque de un jardín en Wolfenbuttel, Baja Sajonia, Alemania.	(Frühling et al., 2002)
<i>E. aquaticum</i>	Agua del lago Tikkar Tal, Haryana, India.	(Raichand et al., 2012)
<i>E. arabatum</i>	Intestino de un espécimen sano de <i>Penaeus vannamei</i> .	(Cong et al., 2017)
<i>E. artemiae</i>	Quistes de <i>Artemia franciscana</i> .	(López-Cortés et al., 2006)
<i>E. aurantiacum</i>	Efluente del procesamiento de patata.	(Collins et al., 1983)
<i>E. chiriqhucha</i>	Lago andino de gran altitud.	(Gutiérrez-Preciado et al., 2017)
<i>E. enclense</i>	Muestra de sedimento marino de la isla Chorao, Goa, India.	(Dastager et al., 2015)
<i>E. flavidum</i>	Lago Red Maple de la provincia de Guizhou, China.	(Meng et al., 2020)
<i>E. himgiriensis</i>	Muestra de suelo del Himalaya de la India.	(Singh et al., 2013)
<i>E. indicum</i>	Glaciar Hamta de las cadenas montañosas del Himalaya de la India.	(Chaturvedi & Shivaji, 2006)
<i>E. marinum</i>	Superficie del Mar Amarillo en Corea.	(Kim et al., 2005)
<i>E. mexicanum</i>	Quistes de <i>Artemia franciscana</i> .	(López-Cortés et al., 2006)
<i>E. oxidotolerans</i>	Drenaje de una planta procesadora de pescado.	(Yumoto et al., 2004)
<i>E. profundum</i>	El respiradero hidrotermal de aguas profundas del Pacífico nororiental (profundidad de 2600 m).	(Crapart et al., 2007)
<i>E. pavilionensis</i>	Microbialita del hipolimnio del lago oligotrófico Pavilion cerca de Lillooet, BC, Canadá.	(White et al., 2013)

III. INTRODUCCIÓN

<i>E. qingdaonense</i>	Algas de la costa de China.	(Liu et al., 2021)
<i>E. sibiricum</i>	Permafrost siberiano.	(Rodrigues et al., 2006)
<i>E. soli</i>	Muestra de morrena de los valles secos de McMurdo, Antártida.	(Chaturvedi et al., 2008)
<i>E. undae</i>	Agua del estanque de un jardín en Wolfenbittel, Baja Sajonia, Alemania.	(Frühling et al., 2002)

Los diferentes hábitats del género *Exiguobacterium* se encuentran en áreas que cubren un amplio rango de temperaturas (-12°C a +55°C) incluyendo glaciares y aguas termales, y ha sido aislado del permafrost (Vishnivetskaya et al., 2009). Algunas cepas además de su adaptación térmica son también halotolerantes, es decir, pueden crecer en un rango amplio de pH, toleran altos niveles de radiación UV, y son resistentes a metales pesados (Vishnivetskaya et al., 2009).

Además, estas bacterias presentan múltiples genes codificantes de proteínas de respuesta al estrés, como proteínas de respuesta al frío (*cold shock proteins*, CSP) (Vishnivetskaya et al., 2014) y también proteínas necesarias para multirresistencia a metales como el arsénico (Castro-Severyn et al., 2017). Estas habilidades sugieren que las especies de *Exiguobacterium* pueden ser consideradas como un nuevo modelo a explotar de bacterias poliextremófilas.

El género *Exiguobacterium* posee una amplia gama de capacidades metabólicas y de resistencia al estrés, lo que puede contribuir a su amplia distribución en la naturaleza. Se han identificado en los genomas de varios *Exiguobacterium* los genes que codifican múltiples tipos de proteínas responsables de la hidrólisis de carbohidratos, entre ellas, las más extendidas son las implicadas en la degradación del almidón, la celulosa y la quitina (Gangoiti et al., 2016; Lv et al., 2022; Vijayalaxmi et al., 2013). Estos polisacáridos son los más abundantes en la naturaleza, tanto en ecosistemas terrestres como marinos, lo que podría explicar que los miembros del género *Exiguobacterium* ocupen nichos tan variados. También

se han identificado numerosas peptidasas en los genomas del género *Exiguobacterium*, siendo las más abundantes la metalopeptidasa M23 o la serina peptidasa S08, importantes para la degradación de peptidoglicanos extracelulares o la utilización de fuentes de nitrógeno del medio ambiente (Zhang et al., 2021).

En cuanto a la biosíntesis de aminoácidos, las rutas clásicas para la biosíntesis de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina), además de la síntesis de treonina, fenilalanina y tirosina, se encuentran incompletas en el genoma de varios *Exiguobacterium* (Rodrigues et al., 2008; White et al., 2019), sugiriendo que presentan auxotrofías para estos aminoácidos. Las vías de biosíntesis de los otros aminoácidos están presentes (Rodrigues et al., 2008). Varios estudios profundizan en el metabolismo de *E. sibiricum*, la bacteria más cercana filogenéticamente a nuestra cepa de estudio *Exiguobacterium* sp. Helios, mediante el análisis del genoma y experimentos fisiológicos. En cuanto al metabolismo de carbohidratos, presenta todos los genes necesarios para la vía de Embden-Meyerhoff (glucólisis), gluconeogénesis y la vía no oxidativa de las pentosas fosfato (no la rama oxidativa). También es destacable el gran número de enzimas destinadas a la degradación de polímeros de carbohidratos que presenta esta especie en su genoma, incluyendo varias α -amilasas, α -glucosidasas o pululaninas, y podría almacenar polímeros como el glicógeno o α -D-glucanos insolubles (Gangoiti et al., 2016; Rodrigues et al., 2008; Shingarova et al., 2023). No se han encontrado genes de la vía de activación del sulfato, lo que sugiere que *E. sibiricum* no puede utilizar sulfato y requiere una fuente orgánica de azufre, como metionina, cisteína o metiltioribosa.

Muchas cepas de este género poseen rasgos únicos que han sido explotados por sus aplicaciones biotecnológicas e industriales, incluyendo producción de enzimas, aplicaciones en agricultura, o biorremediación (Tabla 15). Un ejemplo de esto es su uso en la producción de bioetanol a partir de azúcares fermentados del bagazo de caña mediante enzimas lignocelulolíticas producidas por *Exiguobacterium* sp. VSG-1 (Vijayalaxmi et al., 2013).

También se han empleado para la producción de enzimas como la β -galactosidasa de *E. acetylicum* (Aburto et al., 2019) o la investigación de enzimas

III. INTRODUCCIÓN

novedosas como la nueva subfamilia de enzimas glucósido hidrolasa 70 4,6- α -glucanotransferasa encontrada en *E. sibiricum* 255-15 (Gangoiti et al., 2016). Además, se han empleado en biorremediación para la degradación de 4-cloroindol (Arora & Bae, 2015), o para la formación de biopelículas que alteran las propiedades de la superficie del poliestireno e inician la biodegradación (Chauhan et al., 2018).

Tabla I5 Aplicaciones industriales de *Exiguobacterium* spp.

Cepa	Aplicación	Referencia
Bioestimulantes y germinación		
<i>Exiguobacterium</i> sp. S17	Bio-inoculante para la promoción del crecimiento vegetal y estrategias de bio-fortificación con selenio en plantas hortícolas.	(Marfetán et al., 2023)
<i>Exiguobacterium</i> sp.	Promueve el crecimiento de plantas (en Fenugreek, <i>Trigonella foenum-graecum</i>)	(Rajendran et al., 2012)
Medicina y salud		
<i>Exiguobacterium</i> sp. MB2	El extracto microbiano pigmentado inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	(Bandi et al., 2023)
<i>E. acetylicum</i> S01	Carotenoides con propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias. Como suplemento, incrementa la resistencia de <i>Carassius auratus</i> a la infección por <i>Aeromonas hydrophila</i> .	(Jinendiran et al., 2020) (Jinendiran et al., 2019)
Biorremediación		
<i>E. marinum</i> a-1	Degradación del polipropileno sin aditivos.	(Sun et al., 2023)
<i>E. antarcticum</i>	Degradación del tereftalato.	(Hwang et al., 2023)
<i>Exiguobacterium</i> sp. DR11	Para la formación de biopelículas que alteran las propiedades de la superficie del poliestireno e inician su biodegradación.	(Chauhan et al., 2018).

<i>E. mexicanum</i> M7	Degradación de tolueno.	(Barghoth et al., 2023)
<i>E. alkaliphilum</i> B-3531D	Biorremediación (degradación de petróleo y otros hidrocarburos).	(Delegan et al., 2021)
<i>Exiguobacterium</i> sp. As-9	Eliminación del arsénico en aguas.	(Pandey & Bhatt, 2015)
<i>Exiguobacterium</i> sp. strain LM-IK2	Degradación del polietileno de baja densidad.	(Maroof et al., 2022)
<i>Exiguobacterium</i> sp. PMA	Degradación del 4-cloroindol.	(Arora & Bae, 2015)
Otras aplicaciones		
<i>E. alkaliphilum</i> VLP1	Utilización de una proteasa alcalina como aditivo en detergentes.	(Hemsinli & Gurkok, 2023)
<i>Exiguobacterium</i> sp.	En consorcio, forma parte de la cámara de biocátodo desnitrificante en una pila generadora de energía.	(Han et al., 2021)
<i>Exiguobacterium</i> sp. VSG-1	Producción de bioetanol a partir de azúcares fermentados del bagazo de caña mediante enzimas lignocelulolíticas.	(Vijayalaxmi et al., 2013)
<i>E. acetylicum</i>	Producción de enzimas como la β -galactosidasa.	(Aburto et al., 2019)

Pese a que muchas cepas de este género presentan propiedades que permitirían reconocerlas como novedosos “chasis” biotecnológicos, hasta el momento, nadie ha desarrollado herramientas genéticas para modificar estas bacterias. Además, tan solo algunos estudios ómicos se han realizado para entender los mecanismos de adaptación al frío (Baraúna et al., 2017; Dall’Agnol et al., 2014) o a la elevada salinidad (Patel et al., 2018) de *Exiguobacterium*.

IV. Objetivos

Esta tesis doctoral tiene como objetivo general la caracterización de la bacteria xerotolerante *Exiguobacterium* sp. Helios, aislada de las placas solares, descifrando los mecanismos que le confieren poliextremofilia. Este conocimiento es de gran interés porque permitiría explorar un nuevo modelo biotecnológico de microorganismo multirresistente, y generar una cartera de tecnologías genéticas que permitan desarrollar nuevos procesos a gran escala tanto industrial como ambiental, pero bajo condiciones de elevada escasez de agua. Para abordar este objetivo general se marcaron los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Estudio genético y fenotípico de la bacteria *Exiguobacterium* sp. Helios. Al proceder de un nicho tan particular y de carácter extremófilo como son las placas solares, la cepa Helios se postula como una posible factoría celular para expresar genes de interés biotecnológico. Para llevar a cabo el estudio genético y fenotípico, distinguimos estos subobjetivos:

- 1.1. Caracterización de las propiedades poliextremófilas de *Exiguobacterium* sp. Helios.
- 1.2. Secuenciación y anotación del genoma.
- 1.3. Desarrollo de herramientas genéticas. Optimización de protocolos de transformación de *Exiguobacterium* sp. Helios.

Objetivo 2: Estudio de los mecanismos que confieren xerotolerancia a la bacteria *Exiguobacterium* sp. Helios mediante análisis morfológicos y transcriptómicos. La xerotolerancia es la principal característica de la cepa y el estudio de los mecanismos que confieren dicha propiedad, que se anticipan a raíz del análisis genómico y transcriptómico, puede abrir un campo nuevo de conocimiento y de aplicaciones biotecnológicas. Por esta razón, para el estudio de los mecanismos xerotolerantes de *Exiguobacterium* sp. Helios, planteamos estos subobjetivos:

- 2.1. Análisis de la xerotolerancia como característica del género *Exiguobacterium*. Estudio de la resistencia a la desecación bajo diferentes condiciones de cultivo.
- 2.2. Estudio de las propiedades que confieren la adaptación a condiciones xéricas mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión, y microscopía de fuerza atómica.
- 2.3. Estudio de la xerotolerancia mediante análisis transcriptómico. Hipótesis sobre posibles mecanismos de xerotolerancia.

IV. OBJETIVOS

Objetivo 3: Estudio metabólico de *Exiguobacterium* sp. Helios. Los modelos metabólicos a escala genómica abren muchas opciones para entender el metabolismo de las bacterias, pero necesitan validarse. Por esta razón, para el estudio metabólico de *Exiguobacterium* sp. Helios, se plantea:

- 3.1.** Validación del modelo metabólico a escala genómica mediante cultivo en diferentes fuentes de carbono.
- 3.2.** Análisis de las rutas metabólicas de la bacteria con especial énfasis en las rutas metabólicas alternativas o novedosas. Análisis de auxotrofías.

V. Materiales y métodos

1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en esta tesis doctoral se recogen en la [Tabla M1](#) junto con sus genotipos y características relevantes. Los plásmidos empleados se muestran en la [Tabla M2](#).

Tabla M1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	ciación	Origen
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>l hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>glnV44 thi-1</i> <i>recA1 gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>) <i>U169 deoR</i> (ϕ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i>)	Thermo Fisher Scientific
DH10B	<i>l</i> , Δ (<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>) <i>7697</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
W	vestre	ATCC 9637
Cepas aisladas del panel solar		
<i>Arthrobacter</i> sp. Helios	vestre	(Hernández-Fernández et al., 2022)
<i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	vestre	(Castillo et al., 2021)
<i>Exiguobacterium</i> spp.		
<i>E. sibiricum</i> 255-15	vestre	DSM 17290
<i>E. antarcticum</i>	vestre	DSM 14480
<i>E. mexicanum</i>	vestre	DSM 16483
<i>E. marinum</i>	vestre	DSM 16307
<i>E. alkaliphilum</i>	vestre	DSM 21148
Cepas control		
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Cepa silvestre	DSM 20539T/46620T
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	Cepa silvestre	(Kunst et al., 1997)
<i>Pseudomonas putida</i>		

V. MATERIALES Y MÉTODOS

DOC21	vestre	Cedida por Elías Rodríguez Olivera (Universidad de León)
DOC21 Δ33	Δm ^R , <i>Pseudomonas putida</i> DOC21 con el gen de la enzima isocitrato liasa delecionado	Cedida por Elías Rodríguez Olivera (Universidad de León)
KT2440	vestre	(Nelson et al., 2002)

Tabla M2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Descripción	Referencia
pSEVA251	<i>Δ</i> RSF1010. Vector de expresión con sitio de clonaje múltiple (MCS)	(Silva-Rocha et al., 2013)
pSEVA637	<i>Δ</i> pBBR1. Vector de expresión con gen constitutivo <i>gfp</i>	(Silva-Rocha et al., 2013)
pSEVA3b67Rb	<i>Δ</i> pUC, <i>ori</i> pTHT15. Vector satélite que contiene el gen constitutivo <i>mRFP1</i> , compatible como reportero para <i>E. coli/B. subtilis</i>	(Wright et al., 2015)
pRCR12	plícón SH71rep, gen reportero: <i>mrfp</i> , promotor: pX. Tamaño: 4,6 kb	Solmeglas S.L. (Mohedano et al., 2015)
pBSd141R	MCS-IIS F2, Amp ^R , <i>ori</i> pRO1600/ColE1, MCS-IIS B1	(Radeck et al., 2017)
pBSc243C	ΔUC18 MCS, MCS-IIS E1, Km ^R , <i>ori</i> pRO1600/ColE1, MCS-IIS C2, Cat ^R	(Radeck et al., 2017)
pCR™4Blunt-TOPO	Δm ^R , <i>lacZα-ccdB</i> , <i>ori</i> pUC. Vector suicida para clonaje de fragmentos romos	Invitrogen
pBS143amyS	<i>ori</i> pRO1600/ColE1, <i>amyS</i> up, Cat ^R , <i>lacZα</i> *-pUC18 MCS, <i>amyS</i> down.	Este trabajo
pK18mob	<i>Δ</i> ColE1, Mob ⁺ , <i>lacZα</i> , vector suicida para la construcción de mutantes por inserción mediante recombinación homóloga	(Schäfer et al., 1994)
pK18amyCherry	<i>Δ</i> ColE1, Mob ⁺ , zonas de homología para gen <i>amyS</i> , MCS y gen constitutivo <i>mRFP1</i>	Este trabajo

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue encargada a la empresa IDT y se muestran en la [Tabla M3](#), donde se indica su secuencia y la aplicación de los mismos.

Tabla M3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Uso
Identificación de bacterias, amplificación 16S rARN		
28F	GAGTTTGATCNTGGCTCAG	Identificación de bacterias, amplificación 16S rARN
519R	GTNTTACNGCGGCKGCTG	
63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	Identificación de bacterias, amplificación 16S rARN
1387R	GGGCGGWGTGTACAAGGC	
16S-Fwd Helios	TCAAACACTTTATGGAGAGTT TGATC	Identificación de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios, amplificación 16S rARN
16S-Rev Helios	TAGAAAGGAGGTGATCCAGC C	
Construcción vector SEVA sibling		
UP Fwd <i>amyS</i>	CTCAAGGGGTCTCCACCCATG	Amplificación fragmento aguas arriba (<i>Up</i>) del gen <i>amyS</i> de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios. Diana: zona de unión de <i>BsaI</i> subrayado, zona de corte de <i>BsaI</i> en negrita.
UP Rev <i>amyS</i>	AGACGAGGCGTGATGCTTCTC CTCAAGGGGTCTCCTCGCCTC GACTTCCGCTTGATTGTTCCA G	
DOWN Fwd <i>amyS</i>	CTCAAGGGGTCTCCGAGACTT	Amplificación fragmento aguas abajo (<i>Down</i>) del gen <i>amyS</i> de <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios. Diana: zona de unión de <i>BsaI</i> subrayado, zona de corte de <i>BsaI</i> en negrita.
DOWN Rev <i>amyS</i>	CCCGTTTTACTACGGGATCAA GG CTCAAGGGGTCTCCTGAGGT TGACCTGTGAACGTTCCACGA C	
TM3782	CGCAAAAAACGCACCACTACG	Secuenciación de vector final SEVA siblings
TM3783	GGTTATTGTCTCATGAGCGG	

2. Medios y condiciones de cultivo

Las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121°C (o 110°C en el caso de algunas fuentes de carbono) y 1 atm de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0,2 µm de tamaño de poro. Los antibióticos se prepararon en soluciones acuosas a 1000 mg·mL⁻¹, se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20°C.

Para cultivos de rutina, todas las cepas se crecieron aeróbicamente en medio LB (Sambrook & Russell, 2001) a 30°C, o 37°C en el caso de *E. coli*, con una agitación orbital de 200 rpm. Excepcionalmente, *D. radiodurans* se creció en medio TGY. Para el aislamiento de cepas xerotolerantes se emplearon los medios LB, R2A (R-2A Agar, Sigma-Aldrich), medio marino (Marine Agar, Sigma-Aldrich) y TSA (Tryptic Soy Agar, Sigma-Aldrich). La composición de estos medios se detalla en la [Tabla M4](#).

Tabla M4. Medios de cultivo utilizados en este trabajo.

Medio	Composición
LB	NaCl 10 g·L ⁻¹ , peptona 5 g·L ⁻¹ , extracto de levadura 10 g·L ⁻¹ (pH 7,5).
TGY	Triptona 5 g·L ⁻¹ , glucosa 1 g·L ⁻¹ , extracto de levadura 2,5 g·L ⁻¹ (pH 7,2).
R2A	Hidrolizado ácido de caseína 0,5 g·L ⁻¹ , extracto de levadura 0,5 g·L ⁻¹ , proteosa peptona 0,5 g·L ⁻¹ , almidón soluble 0,5 g·L ⁻¹ , glucosa 0,5 g·L ⁻¹ , K ₂ HPO ₄ 0,3 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ 0,024 g·L ⁻¹ , piruvato de sodio 0,3 g·L ⁻¹ , agar 15 g·L ⁻¹ (pH 7,2).
Medio marino	NH ₄ NO ₃ 1,6 mg·L ⁻¹ , H ₃ BO ₃ 22 mg·L ⁻¹ , CaCl ₂ 1,8 g·L ⁻¹ , Na ₂ HPO ₄ 8 mg·L ⁻¹ , citrato férrico 0,1 g·L ⁻¹ , MgCl ₂ 5,9 g·L ⁻¹ , MgSO ₄ 3,24 g·L ⁻¹ , peptona 5,0 g·L ⁻¹ , KBr 0,08 g·L ⁻¹ , KCl 0,55 g·L ⁻¹ , NaHCO ₃ 0,16 g·L ⁻¹ , NaCl 19,45 g·L ⁻¹ , NaF 2,4 mg·L ⁻¹ , Na ₂ SiO ₃ 4 mg·L ⁻¹ , SrCl ₂ 34,0 mg·L ⁻¹ , extracto de levadura 1 g·L ⁻¹ (pH 7,6).
TSA	Peptona de caseína 15 g·L ⁻¹ , NaCl 5 g·L ⁻¹ , peptona de soja 5 g·L ⁻¹ , agar 15 g·L ⁻¹ .
M63	KH ₂ PO ₄ 13,6 g·L ⁻¹ , (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g·L ⁻¹ , FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0,5 mg·L ⁻¹ (pH 7).

Se empleó medio mínimo M63 (Tabla M4) para crecer las células en presencia de fuentes de carbono únicas, suplementado cuando fue necesario con elementos traza (ácido nitriloacético ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{MnSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); NaCl ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{CuSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ($0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); H_3BO_3 ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); NiCl_2 ($0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); Na_2SeO_4 ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)) y vitaminas (cobalamina ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ácido pantoténico ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); riboflavina ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); piridoxamina en HCl ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); biotina ($0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ácido fólico ($0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ácido nicotínico ($0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); ácido *p*-aminobenzoico ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); tiamina en HCl ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)), además de MgSO_4 1 mM y CaCl_2 1mM. En el caso de las cepas de *Exiguobacterium* también se emplearon casaminoácidos al 0,04% (p/v).

Las fuentes de carbono y concentraciones finales en cultivo probadas fueron arabinosa (10 mM), fructosa (10 mM), galactosa (10 mM), glucosa (10 mM o 0,2% (p/v) según fuese necesario), lactosa (10 mM), maltosa (10 mM), ribosa (10 mM), sacarosa (10 mM), xilosa (10 mM), acetato de sodio (0,4% (p/v)), ácido 3-hidroxibenzoico (3 mM), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3 mM), ácido 4-hidroxibenzoico (3 mM), gentisato (3 mM) benzoato (3 mM), catecol (3 mM), citrato (0,2% (p/v)), piruvato (3 mM), ácido fenilacético (3 mM), y succinato (0,2% (p/v)). Todos los productos fueron adquiridos en Merck. El crecimiento fue monitoreado midiendo la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240.

La resistencia a antibióticos se probó en presencia de kanamicina (1–50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), gentamicina (1–20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ampicilina (12,5–100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), cloranfenicol (4–34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o espectinomicina (25–100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), que fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. La resistencia a compuestos fluorados (3-fluoroacetato, 2-fluorofenilacético, 3-fluorofenilacético, y 4-fluorofenilacético) se probó en LB a diferentes concentraciones (5-20 mM).

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4°C en placas de LB o M63 al 1,5 % de agar. Para su conservación a largo plazo las cepas

V. MATERIALES Y MÉTODOS

fueron cultivadas en su medio de crecimiento con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80°C con 20% (v/v) de glicerol.

2.1. Obtención de condiciones anaeróbicas

Para obtener condiciones de anaerobiosis, los medios de cultivo, así como las soluciones de KNO_3 (1 mM de concentración final), vitaminas y elementos traza necesarios para la complementación del medio mínimo (descritos previamente en este apartado), y todos los compuestos que fueron empleados como fuente de carbono, se dispensaron en frascos de vidrio, los cuales se sellaron con tapones de goma y arandelas de aluminio. A través del tapón de goma se inyectó una aguja conectada a una bala de nitrógeno comprimido (Air Liquide), permitiendo pasar un flujo de 0,5-1 atm de este gas al medio líquido durante varios minutos (20 o 30 min, dependiendo del volumen de aire en la botella) con el objetivo de eliminar el oxígeno como se muestra en la [Figura M1](#). Finalmente, todos los frascos fueron esterilizados mediante autoclave.



Figura M1. Esquema del proceso de obtención de anaerobiosis. El gas nitrógeno entra en la botella por la aguja más grande y desplaza el oxígeno que sale por la aguja pequeña.

Para obtener una solución anaeróbica y estéril de vitaminas (que son sensibles al calor) se realizó la misma operación descrita anteriormente, pero con frascos de vidrio con agua estéril a los que, después de ser esterilizados por autoclave, se inyectó una solución concentrada de vitaminas mediante una jeringa

conectada a un filtro estéril Millipore 0,2 µm de tamaño de poro. Tanto la filtración de las soluciones de vitaminas como la inoculación de los medios de cultivo con las distintas cepas bacterianas se realizaron en esterilidad.

2.2. Cultivo en biorreactor

Los experimentos se llevaron a cabo en biorreactores Multifors 2 (Infors AG, Suiza), con un eje agitador impulsado por imanes, siguiendo las condiciones de fermentación de la [Tabla M5](#). El medio de cultivo se esterilizó por autoclave dentro del biorreactor, y posteriormente se añadieron el antibiótico (cuando fue necesario), el inóculo y antiespumante. El pH fue controlado añadiendo NaOH 2 M o H₂SO₄ 2 M y se monitorizó en línea con un sensor EasyFerm Plus PHI Arc 225 Hamilton (Suiza). Se midió la concentración de oxígeno disuelto en línea utilizando un sensor VisiFerm DO Arc 225 Hamilton (Suiza).

Tabla M5. Condiciones de fermentación

Condiciones	Reactor A	Reactor B	Reactor C	Reactor D
Cepa	<i>E. coli</i> W	<i>E. coli</i> W	<i>Exiguobacterium</i> sp. Helios pSEVA3b7Rb	<i>Exiguobacterium</i> sp. Helios pSEVA3b7Rb
Medio	LB	LB	LB +Cm 10 µg·mL ⁻¹	LB +Cm 10 µg·mL ⁻¹
Volumen total (L)	0,5	0,5	0,5	0,5
Volumen de trabajo (L)	0,4	0,4	0,4	0,4
Temperatura (°C)	37	37	30	30
Agitación (rpm)	300	1200	300	1200
Flujo de aire (L/min)	0,4	0,4	0,4	0,4
pH	7	7	8	8
DO_{600 nm} inicial	0,2	0,2	0,2	0,2

3. Ensayos con bacterias extremófilas

3.1. Recogida de muestras del panel solar

El muestreo de las placas solares se realizó como se describe en (Dorado-Morales et al., 2016). Brevemente, la recolección de la microbiota presente en el panel solar se realizó vertiendo tampón salino fosfato (PBS) (pH 7,4) y rascando la superficie con un limpiador de cristales unido a un tubo de silicona autoclavado de 5 mm de diámetro. La suspensión líquida resultante fue transferida usando una pipeta a tubos Falcon, se guardó en hielo y fue transportada inmediatamente al laboratorio, donde se filtró mediante una membrana hidrofílica de nailon (Millipore) de 20 μm de tamaño de poro para descartar partículas, la mayoría de los hongos y de los restos orgánicos e inorgánicos de gran tamaño. Se agregó 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cicloheximida y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nistatina para evitar el crecimiento de levaduras y hongos. Las muestras se almacenaron congeladas a -80°C hasta su uso.

3.2. Aislamiento de cepas bacterianas resistentes a desecación

El aislamiento de las cepas xerotolerantes se realizó de la siguiente manera: varias alícuotas de muestras de microbiota de 100 μL del panel solar se extendieron en filtros de membrana Millipore™ (0,45 μm de tamaño de poro, 47 mm de diámetro, mezcla de ésteres de celulosa, hidrofílicos) e incubados en una estufa a 37°C con 10–15% de humedad relativa durante 10 días. Los filtros se rehidrataron con 1 ml de PBS y la suspensión bacteriana fue sembrada en placas de LB e incubadas *overnight* a 37°C . Las colonias aisladas (Figura M2.A) se crecieron individualmente en LB y fueron sometidas a ciclos de desecación sucesivos con el propósito de obtener las cepas más xerotolerantes (Figura M2.B). Las colonias aisladas finalmente se seleccionaron y conservaron a -80°C en 20% de glicerol para usos futuros.

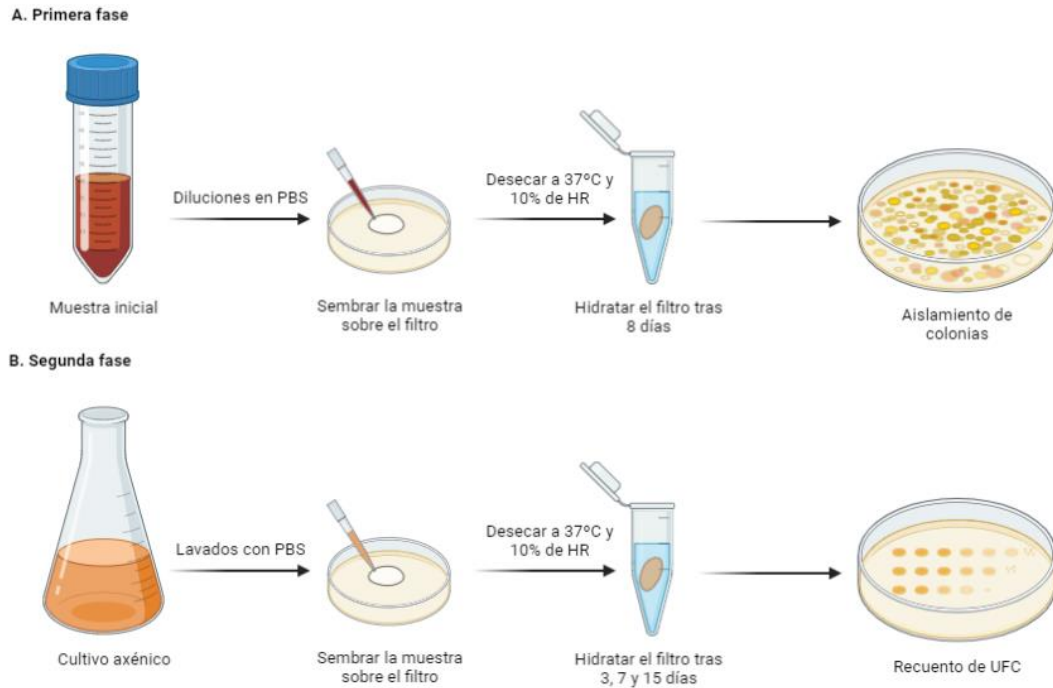


Figura M2. Esquema del experimento desarrollado para la selección de cepas xerotolerantes. **A.** Primera fase de aislamiento de cepas xerotolerantes. **B.** Segunda fase en la que se comprueba la xerotolerancia de las cepas en cultivos aislados. HR, humedad relativa. UFC, unidades formadoras de colonia, PBS, tampón fosfato salino.

3.2.1. Detección y descarte de bacterias formadoras de esporas

Para comprobar que las cepas aisladas no eran formadoras de esporas se desarrolló un protocolo basado en los datos de Cebrián et al. 2017, para inactivar la población de células vegetativas en un 90%. Se resuspendió en 1 mL de PBS (*tampón fosfato salino*) una colonia crecida en una placa de LB agar durante 4 días y se incubó durante 30-45 min a 72°C. Después se cultivó la muestra en placas de medio rico y se esperó a la aparición de colonias. Si se observan colonias la cepa era formadora de esporas y si no se observan, la cepa solo genera células vegetativas.

3.3. Identificación de las cepas xerotolerantes

La identificación de las cepas xerotolerantes aisladas se hizo mediante secuenciación del gen del 16S ARNr, empleando los oligonucleótidos que se

V. MATERIALES Y MÉTODOS

muestran en la [Tabla M3](#). Los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 1,5% y se purificaron con el QIAquick PCR Purification Kit. La secuenciación fue realizada en la empresa Secugen S.L. (Madrid, España). Las secuencias resultantes se compararon con la colección de nucleótidos del NCBI utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) optimizada para obtener únicamente secuencias altamente similares (Megablast).

3.4. Ensayos de resistencia

3.4.1. Xerotolerancia

La validación de estos ensayos de xerotolerancia se realizó empleando *E. coli* DH10B, como una cepa de referencia de baja xerotolerancia y *D. radiodurans*, como una cepa de alta xerotolerancia. Para llevar a cabo estos test comparativos, 50 μ L de cultivo de cada cepa en medio rico con una DO_{600nm} ajustada a 0,05 se depositaron en los filtros y se incubaron en una estufa a 37°C con 10–15% de humedad relativa durante varios días. Estos filtros se rehidrataron con 1 mL de PBS tras 3, 7, y 15 días. Para calcular el porcentaje de supervivencia, se realizó una cuantificación de la viabilidad celular (unidades formadoras de colonia, UFC) en placas de LB agar.

3.4.2. Crecimiento en condiciones de temperatura y pH extremas

La influencia del pH sobre el crecimiento se exploró en medio LB con pH 3, 5, 9 y 11. Para modificar el pH del medio se añadió ácido (HCl 2 M) o base (NaOH 2 M) hasta alcanzar el pH deseado. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento se evaluó a 4°C, 20°C y 37°C en medio líquido y a 42°C en medio sólido. Para ambos experimentos el control se consideró el crecimiento en LB a pH 7 y 30°C. Las cepas se inocularon en 20 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 100 mL a una DO_{600nm} inicial de 0,1. En el caso del crecimiento en medio sólido se observó la aparición de colonias en la placa. Los experimentos se llevaron a cabo siempre con al menos tres réplicas biológicas.

3.4.3. Crecimiento en condiciones de estrés osmótico

Para el test de resistencia a la salinidad, se preparó el medio LB con concentraciones finales de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 g·L⁻¹ de NaCl. Los test de resistencia a polietilenglicol (PEG) se realizaron en medio LB suplementado con 10, 20, 30 y 35% de PEG 6000. Las cepas se inocularon en 20 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 100 mL a una DO_{600nm} inicial de 0,1. Los experimentos se llevaron a cabo siempre con al menos tres réplicas biológicas.

3.4.4. Crecimiento en presencia de metales y metaloides

Para estudiar la resistencia a metales y metaloides de las cepas, utilizamos un medio mínimo Tris (Mergeay et al., 1985) con la siguiente composición para un litro de preparación: 6,06 g Tris-HCl; 4,68 g NaCl; 1,49 g KCl; 1,07 g NH₄Cl; 0,43 g Na₂SO₄; 0,2 g MgCl₂ 6H₂O; 0,03 g Ca₂Cl 2H₂O; 0,23 g Na₂HPO₄ 12H₂O; 0,005 g citrato de Fe(III)NH₄; 1 µL 25% HCl; 0,07 µg ZnCl₂; 0,1 µg MnCl₂ 4H₂O; 0,06 µg H₃BO₃; 0,2 µg CoCl₂ 6H₂O; 0,02 µg CuCl₂ 2H₂O; 0,02 µg NiCl₂ 6H₂O; 0,04 µg Na₂MoO₄ 2H₂O), suplementado con 1 g·L⁻¹ de extracto de levadura y el metal correspondiente (Sigma-Aldrich). Las concentraciones de metales utilizadas fueron 0,5–5,0 mM NiCl₂, 0,5–5,0 mM ZnCl₂, 0,5–5,0 mM K₂TeO₃, 0,5–5,0 mM NaAsO₂, 5–50 mM Na₃AsO₄, 0,1–1,2 mM CuSO₄, 0,5–5,0 mM CdCl₂, 0,5–5,0 mM AgNO₃, 0,5–10,0 mM Pb(NO₃)₂, o 0,05–50,0 mM de K₂SeO₃.

Para establecer la tolerancia a selenito de *Exiguobacterium* sp. Helios, las células se cultivaron en LB en placas multipocillo M6 de Falcon a 30°C con agitación orbital de 200 rpm utilizando 0–50 mM de Na₂SeO₃. Tras 48 h de incubación, la resistencia al selenito fue monitoreada y se determinó el crecimiento celular.

3.4.4.1. Caracterización de nanopartículas de selenio

Para la observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM), *Exiguobacterium* sp. Helios se cultivó en medio LB suplementado con 1 mM de selenito durante 24 h a 30°C con agitación orbital de 200 rpm. Las muestras se prepararon colocando gotas de cultivo de *Exiguobacterium* sp. Helios en celdas de

V. MATERIALES Y MÉTODOS

cobre cubiertas de carbono y se dejó evaporar el solvente. Las observaciones de TEM se realizaron en un microscopio JEOL model JEM-2100 operado a un voltaje de aceleración de 200 kV. La composición química de las nanopartículas de selenio (SeNPs) observadas se determinó por fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX) como se describe (Li et al., 2014). El tamaño de las SeNPs se determinó usando el programa *ImageJ* (T. J. Collins, 2007).

3.4.5. Resistencia a UV

Para evaluar la resistencia a la radiación, los cultivos fueron expuestos a diferentes dosis de UV-C, con una longitud de onda de 254 nm. Se emplearon cultivos en fase estacionaria y se diluyeron hasta una DO_{600nm} de 0,5 en PBS. Se utilizaron *D. radiodurans* y *E. coli* DH10B como bacterias modelo de elevada y baja resistencia a la radiación UV-C, respectivamente. Como control de viabilidad (100% de supervivencia) se emplearon muestras no sometidas a irradiación. Alícuotas de 2 mL de cultivo se depositaron en placas M6 descubiertas (3 cm de diámetro) y se irradiaron con una lámpara UV que situada a 9 cm de la placa emite UV-C de $460 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$, que emite también $32,88 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$ de UV-A y $27,87 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$ de UV-B. Los ensayos de irradiación se realizaron en condiciones de luz ambiente y las dosis se ajustaron a 250, 500, 750 y $1000 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$, variando el tiempo de exposición. La supervivencia después de la exposición a UV-C se evaluó mediante la capacidad de formación de colonias de las distintas bacterias. Después de la irradiación, se recogió la muestra, se prepararon diluciones decimales y se sembraron en placas sobre TGY para *D. radiodurans* y LB agar para las demás cepas. Las colonias se contaron después de 1-2 días de incubación, respectivamente.

3.4.6. Inmovilización de células

Para la inmovilización de células de *Exiguobacterium* sp. Helios en filtros de celulosa se siguió el mismo protocolo empleado para los ensayos de xerotolerancia (ver sección 3.4.1), pero ajustando la DO_{600nm} a 20 o 40, según fue necesario. Los filtros desecados durante 7 días fueron entonces transferidos a placas multipocillo M6 de Falcon.

Para la inmovilización de células de *Exiguobacterium* sp. Helios en esferas de alginato se adaptó el protocolo de (Weiss et al., 2017). Para ello se preparó alginato de sodio al 3% (Sigma-Aldrich) mezclando lentamente durante varias horas, seguido de esterilización en autoclave. Se lavaron células de *Exiguobacterium* sp. Helios cultivadas en medio LB durante 24 h en agua destilada estéril y se concentraron hasta una DO_{600nm} de 40. Las células resuspendidas se mezclaron con el alginato de sodio a 3% en una proporción 1:1 con agitación suave. En una campana estéril, se dejó caer gota a gota esta solución desde una jeringa colocada verticalmente a un vaso con un volumen de 200 mL de $CaCl_2$ 20 mM. Las gotas se mantuvieron al menos 15 min en esta solución antes de lavarlas con agua destilada estéril. Las esferas fueron entonces transferidas a placas multipocillo M6 de Falcon.

Para evaluar si las células continuaban metabólicamente activas en ambos soportes de inmovilización se incubaron con 50 μ L de LB con Na_2SeO_3 10 mM y se observó el resultado durante 24 h.

4. Experimentos de transferencia génica

4.1. Transformación de células de *E. coli*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación mediante el método de cloruro de rubidio y choque térmico (Sambrook and Russell, 2001).

4.2. Transformación de células de *Exiguobacterium* sp. Helios

4.2.1. Preparación de células electrocompetentes de *Exiguobacterium*

Para la preparación de células electrocompetentes de *Exiguobacterium* sp. Helios en primer lugar se inocularon 20 mL de medio rico LB con la cepa y se cultivó durante 24 h (fase estacionaria) a 30°C en agitación a 200 rpm. Después se enfrió el cultivo en hielo durante 15 min y se transfirió a tubos Falcon de 50 mL previamente enfriados a 4°C. Las células se recogieron mediante centrifugación

V. MATERIALES Y MÉTODOS

(3000 x g, 4°C, 15 min) y se lavaron al menos cinco veces con agua estéril fría. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de una solución fría de glicerol al 10% (v/v) y se separaron en alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf de 1,5 mL previamente enfriados. En este punto las células se utilizaron directamente para la electroporación o se conservaron a -80°C para su uso posterior.

4.2.2. Transformación de células de *Exiguobacterium* sp. Helios mediante electroporación

Para la transformación de células electrocompetentes de *Exiguobacterium* sp. Helios se incubó una alícuota de 100 µL junto con 1 µg de plásmido durante 10 min a 4°C. Esta mezcla se pasó a una cubeta de electroporación (Cell Projects) previamente enfriada. A continuación, se electroporó en un aparato Bio-Rad *Gene Pulser* (200 Ω, 25 µF y 2,5 kV). Las células se recuperaron tras 2 h en LB a 30°C con 200 rpm de agitación y fueron seleccionadas en placas de LB suplementadas con el antibiótico necesario. Para los ensayos de transformación génica se emplearon diferentes medios y tampones cuya composición se detalla en la [Tabla M6](#).

Tabla M6. Medios de cultivo y tampones empleados en los ensayos de transformación génica.

Medio o tampón	Composición
Medio SOC (<i>Super Optimal Broth + Catabolic Represor</i>)	Triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl ₂ 10 mM, MgSO ₄ 10 mM, glucosa 20 mM.
Starvation medium (SM1)	1 KH ₂ PO ₄ 0,6%, K ₂ HPO ₄ 1,4%, citrato sódico 0,07%, glucosa 0,5%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,02%, extracto de levadura 0,2%, casaminoácidos 0,025%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2%.
Starvation medium (SM2)	2 KH ₂ PO ₄ 0,6%, K ₂ HPO ₄ 1,4%, citrato sódico 0,07%, glucosa 0,5%, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,08%, extracto de levadura 0,1%, casaminoácidos 0,01%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2%, CaCl ₂ 0,05%.
Tampón PEB	Sacarosa 272 mM, MgCl ₂ 1 mM, K ₂ HPO ₄ 7 mM (pH 7,4)
Medio LBSP	LB + sorbitol 0,5 M, K ₂ HO ₄ 0,05 M, KH ₂ O ₄ 0,05 M
Tampón MSG	Sorbitol 0,5 M, manitol 0,5 M y glicerol al 10%
Medio LBMS	LB + manitol 0,5 M y sorbitol 0,5 M

5. Técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo, fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Rusell (2001). Las endonucleasas de restricción y el tampón CutSmart fueron suministradas por New England Biolabs. La enzima T4 ADN ligasa y el kit Instant Sticky-end Ligase Master Mix fueron suministrados por New England Biolabs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de ADN se purificaron mediante los kits QIAquick PCR Purification Kit o QIAquick Gel Extraction Kit, ambos de Qiagen.

Para la reacción de Golden Gate, siguiendo el protocolo establecido para la construcción de SEVA *siblings* (Radeck et al., 2017), se adaptó de la siguiente manera a los reactivos disponibles en el laboratorio: enzima *BsaI* de Thermo Fisher, tampón ligasa de New England Biolabs, T4 DNA ligase de New England Biolabs, NaCl 500 mM, BSA 1 mg·mL⁻¹.

5.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la visualización de los fragmentos de ADN se utilizaron geles 0,7% o 1,5% (p/v) de agarosa en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM (pH 8,1)), utilizando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió la sexta parte de su volumen de tampón de carga (30% (p/v) de Ficoll 400; 0,2% (p/v) de azul de bromofenol; 0,2% (p/v) de xilencianol y EDTA 40 mM (pH 8,0)). La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con Gel Red Nucleid Acid Gel Stain (Biotium) y los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador. Como marcadores de tamaño se utilizaron el Quick-Load 100 bp DNA Ladder y el Quick-Load 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs).

5.2. Extracción de ADN cromosómico

La extracción de ADN cromosómico de *Exiguobacterium* sp. Helios se realizó a partir de células cultivadas en LB a 30°C y 200 rpm hasta fase

V. MATERIALES Y MÉTODOS

estacionaria (24 h). El aislamiento y purificación del ADN genómico se realizó mediante el método de extracción con fenol-cloroformo (Green and Sambrook, 2017), con la variación de que el tiempo de incubación de la lisozima se prolonga *overnight*.

5.3. Aislamiento de ADN plasmídico en *E. coli*

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo empleando el sistema High Pure Plasmid Purification Kit (Roche), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN se realizó en un equipo Mastercycler Gradient (Eppendorf) y las enzimas que se emplearon fueron ADN polimerasa I (Biotools) y la NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech) para las PCRs de comprobación y la polimerasa Q5 High-Fidelity (New England Biolabs) o PrimeSTAR GXL (Takara) para las PCRs de clonación. Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 1,5 mM, oligonucleótidos 0,5 μM y dNTPs 0,25 mM. Los productos amplificados se purificaron con el sistema QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Los oligonucleótidos fueron proporcionados por IDT. Las condiciones de PCR fueron las descritas por cada fabricante y la temperatura adecuada de hibridación de los oligonucleótidos, optimizada por gradiente de temperaturas.

5.5. Secuenciación de fragmentos de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIBMS-CSIC) por Secugen, S.L. (Madrid, España).

5.6. Secuenciación, ensamblaje y análisis bioinformático del genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios

El genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios fue secuenciado mediante la tecnología de Illumina y fue ensamblado *de novo* por Microbes NG (<http://www.microbesng.uk>) utilizando su procedimiento habitual. Brevemente, el genoma de referencia más cercano disponible fue identificado utilizando Kraken (jhu.edu), y las lecturas se mapearon al genoma de referencia utilizando BWA mem (Burrows–Wheeler Aligner, sourceforge.net) para evaluar la calidad de los datos. El ensamblaje *de novo* de las lecturas se realizó usando SPAdes, y las lecturas se mapearon a los *contigs* resultantes, empleando BWA mem para obtener más métricas de calidad. Para alcanzar un ensamblaje del genoma superior, los *contigs* resultantes se alinearon con el genoma de *E. sibiricum* 255–15 usando los ajustes por defecto de la herramienta Mauve con el software Geneious v 2020.0 (<http://www.geneious.com>).

Para mejorar la calidad del genoma, secuenciamos el genoma mediante la tecnología de Nanopore. Se creó una librería genómica con el kit 1D Native Barcoding genomic DNA Barcode y se procesó mediante la celda de flujo FLO-MIN-106D v R9 en un equipo MinION. El ensamblaje se realizó utilizando el Galaxy Community Hub (<https://galaxyproject.org/>), primero seleccionando las lecturas mayores de 1 kb y con una calidad mayor que 10 usando el software Filtlong (v 0.2.0) (<https://github.com/rrwick/Filtlong>) y comparándolas con las lecturas de la secuenciación de Illumina utilizando el Unicycler (v 0.4.8) (<https://github.com/rrwick/Unicycler/releases/tag/v0.4.8>) con los parámetros estándar. El genoma fue anotado estructuralmente utilizando RAST Server (Aziz et al., 2008), y el sistema de anotación automatizado del genoma, funciones, nombres y propiedades generales de los productos fueron predichas usando este método. La Identidad Media de los Nucleótidos (*Average nucleotide identity, ANI*) fue calculada utilizando las mejores coincidencias (*two-way ANI*) entre dos conjuntos de datos en una herramienta en línea desarrollada por el laboratorio Kostas (Rodríguez-R y Konstantinidis, 2016).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el software Geneious v 2020.0 (<http://www.geneious.com>). El mapa circular del cromosoma se creó con el software CGViewer. El sesgo de GC representa la asimetría en la proporción de guaninas (G) respecto a las citosinas (C) en base a la fórmula $(G-C)/(G+C)$, que puede utilizarse como herramienta para identificar el origen de replicación. El mapa circular del plásmido pMCEX se creó con el software SnapGene (GSL Biotech LLC, USA). Los análisis comparativos se llevaron a cabo usando el software BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El análisis de grupos de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios se realizó con la herramienta en línea antiSMASH (Blin et al., 2023). El análisis del catabolismo de carbohidratos se realizó con la herramienta en línea CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database) (Drula et al., 2022).

6. Técnicas de manipulación de ARN

6.1. Extracción de ARN total de *Exiguobacterium* sp. Helios

La purificación del ARN se realizó partiendo de células procedentes de cultivos en diferentes fases de crecimiento, recuperadas de filtros de nitrocelulosa o diferentes fuentes de carbono, dependiendo del experimento.

Las células fueron resuspendidas en una solución de lisozima 50 mg·mL⁻¹ (Sigma) en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). A continuación, el ARN total del cultivo se aisló mediante el High Pure RNA Isolation kit (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la eliminación del ADN contaminante se empleó el DNase and Removal Treatment Kit (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración del ARN obtenido se analizó utilizando un equipo Nanophotometer (Pearl, IMPLEN).

6.2. Secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) y análisis informático

Para la secuenciación del transcriptoma completo se utilizó la tecnología de Illumina y, tanto la construcción de las librerías, como su secuenciación, fueron realizadas por Macrogen (Seúl, Corea). La integridad del ARN total extraído se analizó en un bioanalizador Agilent Technologies 2100 por la Unidad de Genómica (CAI Técnicas Biológicas) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), y se enviaron para secuenciar aquellas muestras cuyo valor de *RNA Integrity Number* (RIN) era igual o superior a 7. La secuenciación se realizó en un instrumento HiSeq™ 3000 4000 (Illumina) utilizando como reactivo TruSeq 3000 4000 SBS Kit v3.

El análisis posterior de los datos se realizó en el servicio de Bioinformática y Bioestadística del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIBMS-CSIC) utilizando las opciones por defecto en todos los programas utilizados. La calidad de las lecturas crudas se analizó con FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y se filtraron con Trimmomatic 0.39 (Bolger et al., 2014). Las lecturas filtradas se mapearon contra la secuencia del genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios (números de acceso GCA_014524545.1) utilizando STAR 2.7.9a (Dobin et al., 2013), y la cuantificación de la expresión se hizo con la función `featureCounts` perteneciente al paquete Rsubread (Liao et al., 2014) del R software 4.1.2 (R Core Team, 2021). La normalización de las lecturas cuantificadas y el análisis diferencial de expresión se realizó con DESeq2 1.36.0 (Love et al., 2014).

La clasificación en categorías COG se realizó utilizando la base de datos eggNOG (Huerta-Cepas et al., 2019) con la herramienta eggNOG-mapper v2 (Cantalapiedra et al., 2021).

7. Técnicas cromatográficas

7.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La detección de varios compuestos se realizó por HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules/CA, USA) en un sistema *Agilent 1260 Infinity II*. La fase móvil fue H₂SO₄ a 5 mM y la columna se empleó a 55°C y un flujo de 0,5 mL·min⁻¹ durante 30 min. El volumen de inyección fue de 10 µl. La detección se realizó mediante el uso de un Detector de Array de Diodo HS (G7117C) a 214 nm. El software OpenLAB CDS Chemstation Edition se empleó para el control, monitorización y evaluación de los análisis. Las muestras fueron filtradas previamente con filtros de jeringa de PVDF 0,22 µm de tamaño de poro (Branchia). Los estándares se trataron como muestras y se usaron curvas de calibración con al menos 6 puntos para la cuantificación.

8. Técnicas de microscopía

8.1. Microscopía óptica

Se recogieron muestras de cultivos en las condiciones de cultivo de estudio y se depositaron 10 µl de cada una en láminas portaobjetos para después cubrirlas con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. Los portaobjetos fueron tratados con polilisina cuando fue necesario para la inmovilización de la muestra. Las preparaciones fueron fotografiadas con un microscopio óptico Leica DFC345 FX con un objetivo 100x, y procesadas con el software LAS V4.2. Se utilizó el programa *ImageJ* (T. J. Collins, 2007) para medir la longitud celular.

Para la visualización *in vivo* de *Exiguobacterium* sp. Helios pSEVA3b7Rb cultivada en LB expresando la proteína mRFP1, se tomaron muestras del medio de cultivo y se montaron en un portaobjetos para su examen microscópico. Se utilizó el mismo equipo Leica y se excitó con una longitud de onda de 532-558 nm y se recogió la emisión en un rango de 572-648 nm.

8.2. Microscopía electrónica de transmisión

Para preparar las muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET), las células de *Exiguobacterium* sp. Helios se recogieron en las condiciones de estudio, se lavaron dos veces en PBS, y se fijaron en 3% (p/v) de glutaraldehído en PBS durante 1 h. Después, las células se lavaron de nuevo varias veces en PBS y luego se resuspendieron en 1% (p/v) de OsO₄ y 0,8% (p/v) de C₆N₆FeK₃ durante 1 h a 4°C. Tras ese tiempo, las células fueron lavadas con PBS hasta que el sobrenadante estuvo limpio y entonces se deshidrataron gradualmente con etanol (30%, 50%, 70%, 90%, y 100% (v/v); 30 min cada lavado) y finalmente fueron embebidas en resina Spurr ERL-4221, primero en una suspensión 1:1 etanol:resina durante 30 min y entonces dos veces únicamente en resina, 30 min cada vez. Para terminar, las células embebidas en la resina se transfirieron a moldes secos y limpios y se polimerizaron a 60°C durante la noche. Se obtuvieron secciones ultra finas (70 nm de grosor) mediante un microtomo utilizando una cuchilla Diatome. Las secciones se recogieron con celdas de malla de cobre de 400 cubiertas con una capa de carbono y se contrastaron con una solución de acetato de uranilo al 5% (p/v) durante 15 min seguido de una solución de citrato de plomo durante 2 min y se dejaron secar. Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230 (Jeol Ltd., Akishima, Japan) y una cámara digital CMOS, TemCam F416 de 16 MegaPixel. Se utilizó el programa *ImageJ* (T. J. Collins, 2007) para medir el grosor de la pared celular.

8.3. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) se utilizó para realizar mediciones de alta resolución de las propiedades morfológicas y mecánicas de las células, mediante la obtención de imágenes no ópticas. Para ello se empleó un microscopio de la empresa Nanotec Electrónica, compuesto por una cabeza del modelo Cervantes y una parte electrónica del modelo Dulcinea, del servicio de micro y nanofabricación (MiNa) del Instituto de Micro y Nanotecnología (IMN). Se emplearon cantilévers (o micropalanca) con recubrimiento de aluminio en la cara de la detección y sin recubrimiento en la cara

V. MATERIALES Y MÉTODOS

de la punta, con diferentes constantes de fuerza según la muestra analizada, adquiridos a la empresa Nanosensors (<https://www.nanosensors.com>) (Figura M3). Para el análisis de los datos e imágenes obtenidos se empleó el software WSxM (Horcas et al., 2007). Como soporte para las muestras se utilizó silicio dopado (P-Boro) de 3" (76,2 mm), resistencia 1-20 Ωm , grosor de 475-525 μm , orientación 100.

El principio básico de funcionamiento de un sistema AFM estándar con retroalimentación óptica se basa en una sonda, micropalanca o cantiléver (como es más ampliamente conocido) con una punta afilada (compuesta normalmente de silicio o nitruro de silicio) que escanea la superficie de una muestra. A medida que la punta del AFM se mueve sobre elementos de diferente altura, la deflexión del cantiléver cambia. Esta desviación es registrada por un haz láser reflejado en la cara del cantiléver opuesta a donde está la punta y dirigido hacia un fotodetector sensible a la posición. Un circuito de retroalimentación controla la posición del escáner para mantener una deflexión del cantiléver del AFM casi constante y, por lo tanto, una fuerza de interacción constante (Figura M3).

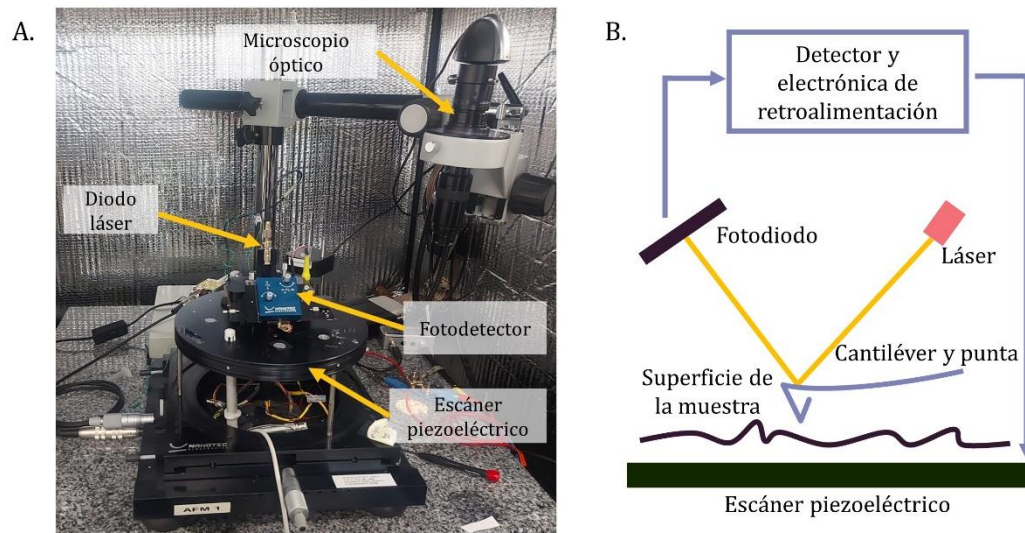


Figura M3. Funcionamiento de un sistema AFM. A. Fotografía de uno de los microscopios de fuerza atómica empleados en este trabajo. B. Diagrama del funcionamiento de los diferentes elementos que componen el AFM.

Existen diferentes métodos de operación según el tipo de muestra que estemos manejando y los datos que queramos extraer de la técnica. En esta tesis se utilizaron un método de espectroscopía de AFM y dos métodos para obtener imágenes, el método dinámico sin contacto y el *jumping* (con contacto).

8.3.1. Método de AFM para medir la rigidez y la fuerza de adhesión en un punto de la muestra (Espectroscopía de Fuerzas)

En este método (Weisenhorn et al., 1989) la punta se coloca en un punto fijo por encima de la muestra y no se mueve de forma lateral. El único movimiento es hacia abajo, al encuentro con la muestra y hacia arriba de nuevo, en dirección opuesta. Durante la realización de este movimiento de ida hacia la muestra y vuelta se registra la deflexión del cantiléver, que es proporcional a la fuerza entre punta y muestra. La curva que se obtiene se denomina Curva de Fuerza vs. Distancia (F vs. D). En la [Figura M4](#) está representado un esquema de este tipo de curva.

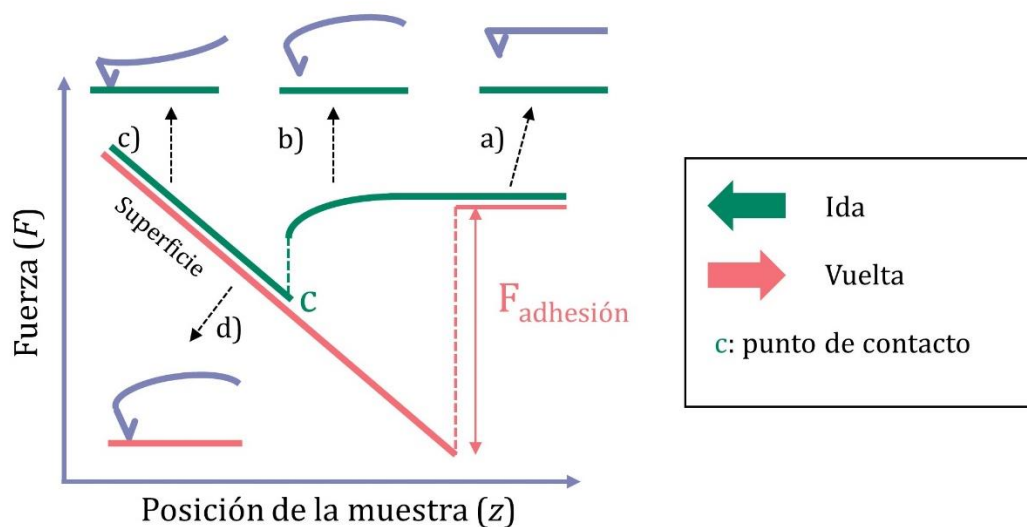


Figura M4. Representación esquemática de una gráfica de Fuerza-Distancia. El scanner piezoeléctrico mueve la muestra hacia la punta en la fase de ida y en dirección opuesta en la fase de vuelta. El movimiento de acercamiento comienza con la punta muy alejada de la muestra (a). Según se acerca comienzan a sentirse primero fuerzas atractivas (b) y después, ya en contacto con la muestra, fuerzas repulsivas (c). En el movimiento de alejamiento (vuelta), la punta permanece en contacto con la superficie durante más recorrido debido a las fuerzas de adhesión (d).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Cuando la punta está lejos de la superficie, la deflexión del cantiléver es nula, ya que no existen fuerzas ni de atracción ni de repulsión actuando sobre la punta (Figura M4a). Cuando la punta se va acercando a la superficie llega un momento en el que se las fuerzas de atracción de Van der Waals entre punta y muestra son lo suficientemente grandes como para que el cantiléver se deflexione hacia abajo (Figura M4b). Cuando la punta se acerca aún más, la punta salta al contacto con la superficie (Figura M4c). A partir de este momento, a medida que la muestra sigue viajando hacia arriba, el cantiléver se irá deflexionando más y más (Figura M4c). Durante el movimiento de vuelta, la punta sigue en contacto con la muestra durante un periodo más largo (parte lineal mayor) debido a las fuerzas atractivas de adhesión que se forman entre la punta y la muestra (la deflexión del cantiléver vuelve a ser hacia abajo) (Figura M4d). Cuando finalmente la punta se suelta del contacto, la deflexión del cantiléver vuelve a ser nula.

Cuando la punta está en contacto con una superficie rígida, solo se deflexiona el cantiléver, la superficie no cede. La curva muestra un comportamiento lineal (régimen elástico, como cuando se comprime un muelle, Figura M4): el cantiléver se deflexiona más cuanto mayor sea la fuerza aplicada a la punta, siguiendo la ley de la elasticidad de Hooke [1]. En esta fórmula, F es la fuerza entre punta y muestra, z el desplazamiento vertical y k_c es la pendiente de la curva de F vs. D . En el caso de que la superficie sea rígida, k_c nos da una idea de la dureza del cantiléver: cuanto mayor sea k_c , para un mismo desplazamiento, la fuerza aplicada por el muelle (el cantiléver) será mayor. Al valor de k_c se le denomina constante de fuerza del cantiléver, y se expresa en $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$.

$$F = k_c \cdot z \quad [1]$$

Cuando la curva de F vs. D se realiza sobre una muestra que no sea completamente rígida (más blanda, pero en régimen elástico), es de esperar que la pendiente sea más pequeña ya que, para que el cantiléver llegue al mismo nivel de deflexión (fuerza), el escáner piezoeléctrico tiene que desplazarse más: al ser la superficie más blanda, esta cede al contacto con la punta (Figura M5).

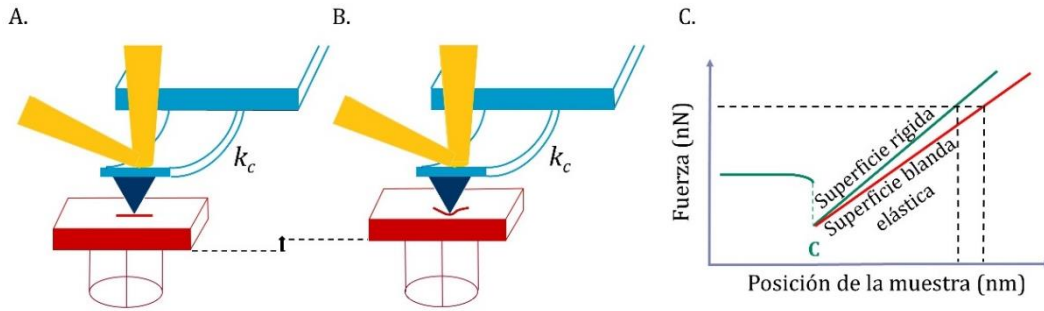


Figura M5. Representación esquemática de curvas de Fuerzas vs. Distancia para una superficie rígida y una superficie blanda, pero elástica. Para que el cantiléver alcance la misma deflexión (fuerza) cuando se realiza la curva sobre una superficie rígida (A) que sobre una superficie blanda (B), el desplazamiento del piezo hacia arriba es mayor: la punta desplaza la superficie no rígida hacia adentro. (C) La pendiente de la curva para la superficie rígida es la constante de fuerza del cantiléver. La pendiente en el caso de una superficie blanda es menor ya que la punta indenta la superficie no rígida.

Cuando la curva se realiza sobre una superficie no rígida (pero elástica), un nuevo muelle aparece en juego: el de la superficie. Como se puede observar en el esquema de la **Figura M6**, el cantiléver y la superficie no rígida pueden representarse como 2 muelles en serie. La pendiente de esta medida sobre una muestra no rígida corresponderá, en este caso, a la de una constante de fuerza efectiva compuesta por las 2 constantes de fuerza; la del muelle y la de la superficie [2]. Por lo tanto, conociendo la constante de fuerza del cantiléver, podemos hallar la dureza de la muestra ($k_{muestra}$).

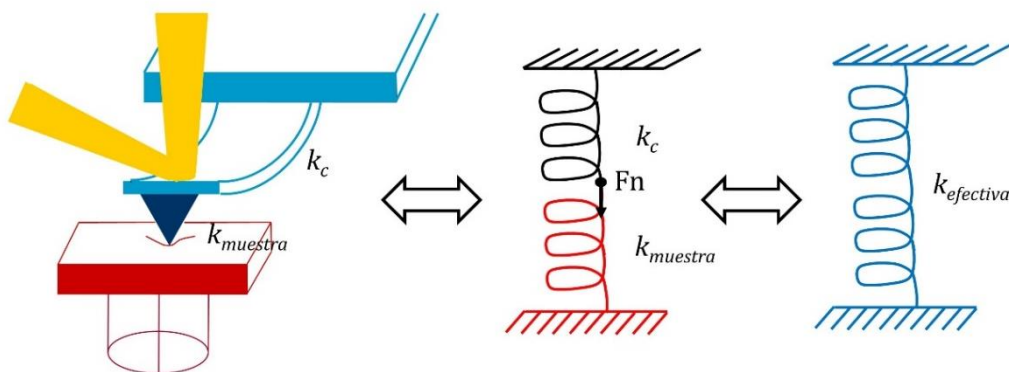


Figura M6. Representación esquemática del cantiléver y la muestra como muelles. Cuando la superficie no es rígida, el conjunto cantiléver-muestra puede representarse como un conjunto de dos muelles en serie. La dureza de la superficie no rígida ($k_{muestra}$) se puede obtener a partir de la pendiente de la curva F vs.D sobre la muestra (k_{efec}) y de k_c .

V. MATERIALES Y MÉTODOS

$$k_{efec} = \frac{k_c \cdot k_{muestra}}{k_c + k_{muestra}} \quad [2]$$

La constante de fuerza del cantiléver no debe ser mucho menor que la constante de fuerza (dureza, *stiffness*) de la muestra (bacteria) para que la constante de fuerza efectiva (constante de la muestra respecto al total de las fuerzas de los dos “muelles”) pueda ser medida.

Con el objetivo de aumentar la precisión en las medidas de la dureza de las bacterias, se realizó una calibración de la constante de fuerza de cada cantiléver a partir de los valores de la anchura y la longitud obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) del servicio de micro y nanofabricación (MiNa) del Instituto de Micro y Nanotecnología (IMN-CSIC) (Figura M7). Esta calibración nos proporciona una medida más precisa de la constante de fuerza que la que establece el fabricante.

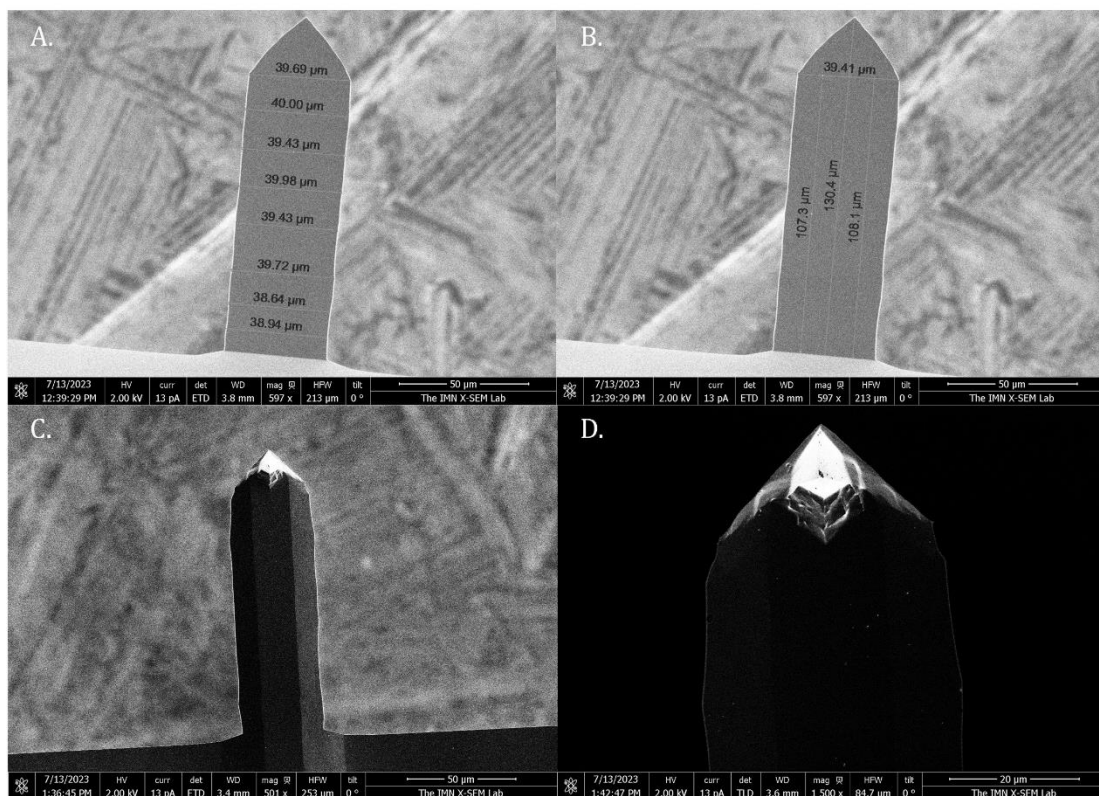


Figura M7. Calibración del cantiléver A y B. Medidas transversales y longitudinales del cantiléver para determinar su constante de fuerza. C y D. Imagen de la parte interna del cantiléver, donde se observa la punta.

8.3.2. Método de AFM para tomar imágenes

Para obtener imágenes de la muestra, la punta barre la superficie, línea a línea. Los métodos pueden ser estáticos o dinámicos. En los métodos dinámicos el cantiléver oscila verticalmente a una frecuencia cercana a la de su resonancia. En esta tesis se han utilizado, principalmente, dos métodos de medida: *jumping* y dinámico sin contacto.

8.3.2.1. *Jumping*

Esta técnica (de Pablo et al., 1998) consiste en realizar una curva de F vs. D (Figura M4) en cada punto de la imagen, línea a línea. Para componer la imagen topográfica, se registran los valores de la posición de la muestra en los que la punta ha hecho contacto con la superficie. Además de la imagen topográfica, se obtienen otras dos imágenes simultáneas: la de la dureza y la de la adhesión. Para obtener valores cuantitativos más precisos de la dureza es recomendable realizar curvas de F vs. D en cada punto, ya que en *jumping* la velocidad a la que se realizan las curvas es mucho mayor.

8.3.2.2. Dinámico sin contacto

Este método (Luna et al., 2000) aprovecha las fuerzas de interacción atractivas de Van der Waals para formar una imagen topográfica. La punta puede sentir estas fuerzas atractivas (Figura M4) cuando se encuentra lejos de la superficie, sin necesidad de estar en contacto con ella. La ventaja de este método radica en que la punta no entra en contacto con la superficie. Este hecho implica que, por una parte, a la punta no se le adhieren restos de muestra y por tanto su forma y composición no cambian y los resultados son más reproducibles. Por otra parte, la muestra no se ve perturbada por la punta, ya que no entra en contacto con ella. La desventaja reside en que es difícil mantenerse fuera del contacto con la superficie, especialmente con muestras biológicas. Esto se debe a que, si por una inestabilidad fortuita la punta contacta momentáneamente con la superficie, es frecuente que restos de material biológico se adhieran a la punta.

VI. Resultados

CAPÍTULO 1

ESTUDIO GENÉTICO Y FENOTÍPICO DE LA BACTERIA *EXIGUOBACTERIUM* SP. HELIOS

1. Aislamiento, selección e identificación de bacterias xerotolerantes de un panel solar

1.1. Muestreo y aislamiento de bacterias xerotolerantes

Como punto de partida para el proyecto HELIOS, del que surgió esta tesis, se realizó un muestreo del material depositado en los paneles solares situados en la Universidad de Valencia tal y como se describe en Dorado-Morales et al. (2016). La muestra recogida se separó en dos fracciones, una cruda (sin filtrar) y una filtrada mediante un tamaño de poro de 20 μm para seleccionar fundamentalmente bacterias y eliminar la mayoría de impurezas orgánicas e inorgánicas de mayor tamaño, hongos y levaduras. Ambas fracciones se mantuvieron a -80°C hasta el inicio de los experimentos de aislamiento. Se comenzó el estudio comparando la biodiversidad bacteriana presente en la muestra filtrada obtenida de las placas solares con una muestra filtrada de suelo obtenida en los jardines del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas. Para ello, se sembraron 50 μL de cada una de las muestras en medios convencionales para el crecimiento bacteriano: *i. e.*, LB, R2A y Marino. Las placas se incubaron durante 2 días a 30°C , observándose crecimiento de microorganismos en los 3 medios. Se comprobó que la muestra procedente del panel solar presentaba mayor diversidad de colonias bacterianas que la muestra procedente de suelo (Figura R1.1).

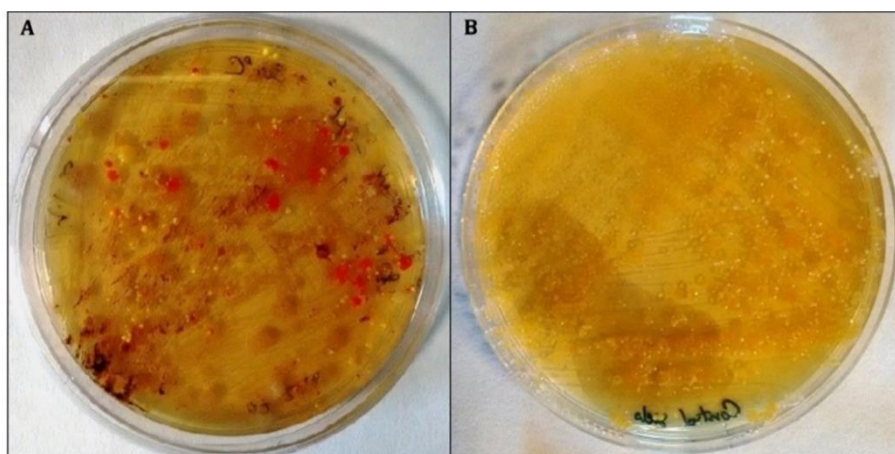


Figura R1.1. Comparación de la diversidad bacteriana. Cultivo en placa en medio rico LB: (A) Muestra tomada de una placa solar en Valencia. (B) Muestra tomada de suelo exterior del CIB.

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

Posteriormente, se procedió al aislamiento de colonias resistentes a la desecación, o xerotolerantes. Para ello, se puso a punto un protocolo de desecación en el que se depositarían las células en filtros de nitrocelulosa y se someterían a una temperatura de 37°C con una humedad relativa máxima del 10%, que es la humedad que se mantiene en las condiciones ambientales de laboratorio en el interior de la estufa.

En una primera fase del ensayo de desecación se analizó la presencia de bacterias xerotolerantes en la muestra de la placa solar filtrada en comparación con la muestra de suelo. Se rehidrataron filtros cada 24 h y se observó que la muestra de suelo no presentaba bacterias resistentes después de 48 h, mientras que en la muestra de placa solar se detectaron bacterias supervivientes tras 8 días en desecación. De esta última muestra rehidratada y sembrada se aislaron 28 colonias resistentes por agotamiento de siembra en placas de LB (Figura R1.2).

En las bacterias aisladas se analizó su ARNr 16S y se descartaron aquellas bacterias pertenecientes al género *Bacillus* que podrían ser resistentes por formación de esporas.

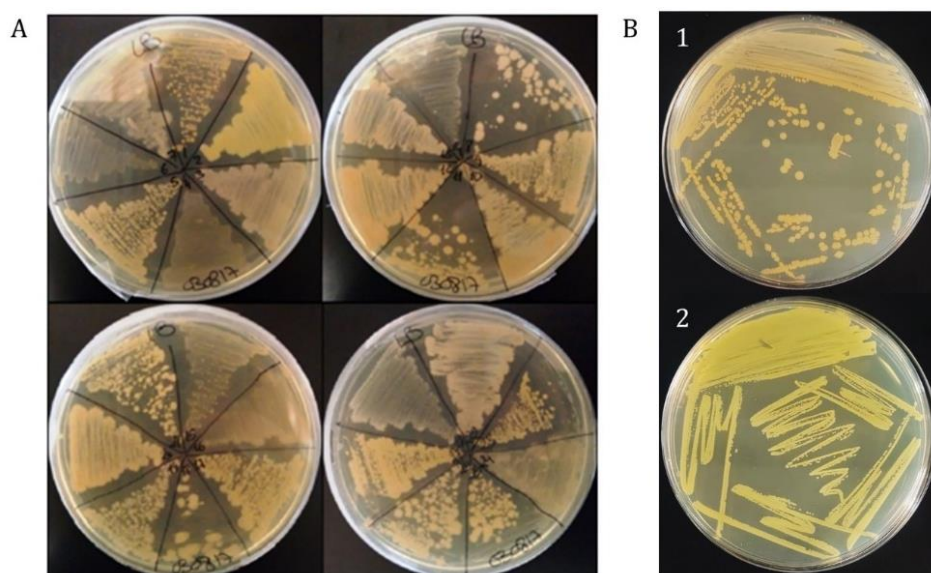


Figura R1.2. Resultados del ensayo de xerotolerancia para el aislamiento de cepas.
A. Cepas aisladas cultivadas en placas de LB tras la primera fase del ensayo de desecación.
B. Cepas xerotolerantes seleccionadas tras la segunda fase del ensayo de desecación, *Exiguobacterium* sp. Helios (1) y *Arthrobacter* sp. Helios (2).

De todas ellas se seleccionaron dos cepas de los géneros *Exiguobacterium* y *Arthrobacter* para realizar una segunda ronda de la prueba de desecación. Se seleccionaron estas dos porque las cepas de estos géneros no esporulan y por lo tanto se podía descartar *a priori* que su xerotolerancia fuese debida a la formación de esporas.

Para los posteriores análisis se utilizaron cultivos axénicos en medio LB recogidos a las 24 h de cultivo en agitación. Además, para estos nuevos ensayos se analizó en paralelo la xerotolerancia de dos bacterias como controles, una como control negativo con una cepa muy sensible a la desecación, como *E. coli* DH10B, y otra como control positivo con una cepa muy tolerante a la desecación, como *D. radiodurans*. Cuando se analizó la capacidad de supervivencia se comprobó que las dos cepas seleccionadas procedentes de las placas solares presentaron una xerotolerancia/supervivencia similar a la que presentaba *D. radiodurans* después de 8 días de desecación (datos no mostrados). Por tanto, se consideró que estas dos cepas seleccionadas presentaban una alta capacidad de xerotolerancia y se procedió a su análisis en mayor detalle.

1.2. Selección de bacterias xerotolerantes e identificación

Para garantizar que las cepas seleccionadas no eran resistentes a la desecación por el mecanismo de la esporulación, se realizó una prueba para diferenciar bacterias formadoras de esporas de las que no lo son. Para ello, se cultivaron las cepas en placa con medio LB durante 4 días. Tras este tiempo se resuspendió una colonia de cada una de las cepas en 1 mL de PBS y se incubaron en un termobloque a 72°C durante 30-45 min. Después se plaquearon las muestras en el mismo medio y se observaron los resultados. Según los datos de Cebrián et al. (2017), este tiempo y temperatura de incubación son suficientes para inactivar la población de células vegetativas en un 90%, permitiendo que las esporas presentes en la muestra sobrevivan. Por lo tanto, si aparecían colonias, esto significaba que la cepa formaba esporas y por lo tanto la descartaríamos para nuestro estudio. Este fue el caso de las cepas aisladas en primera ronda pertenecientes al género *Bacillus*, que utilizamos a modo de control. Si por el contrario no se observaban colonias, la cepa no esporulaba y se seleccionarían

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

para el estudio de su resistencia a la desecación. Este fue el caso de las dos cepas aisladas como *Exiguobacterium* y *Arthrobacter*, por lo que se continuó adelante con su análisis.

Las dos cepas xerotolerantes se identificaron como *Exiguobacterium* sp. y *Arthrobacter* sp., y se denominaron Helios. Dado que ninguna especie del género *Exiguobacterium* había sido descrita como bacteria xerotolerante hasta la fecha, y dado que ya existían varios trabajos bacterias xerotolerantes en el caso del género *Arthrobacter*, esta tesis doctoral se enfocó en el estudio de la cepa *Exiguobacterium* sp. Helios. En primer lugar, se generó un árbol filogenético utilizando el método *maximum-likelihood* con los genes ARNr 16S de dieciocho cepas representativas del género *Exiguobacterium*, de los cuales sus genomas están disponibles en el NCBI, y una cepa tipo de *Bacillus indicus* como grupo externo. La cepa *Exiguobacterium* sp. Helios se ubica en el Clado I, junto con *Exiguobacterium* sp. 9AN y *E. sibiricum* 255-15 (Figura R1.3). La cepa *E. sibiricum* 255-15 resulta ser la especie más cercana con su genoma completo depositado en la base de datos del NCBI (CP001022).

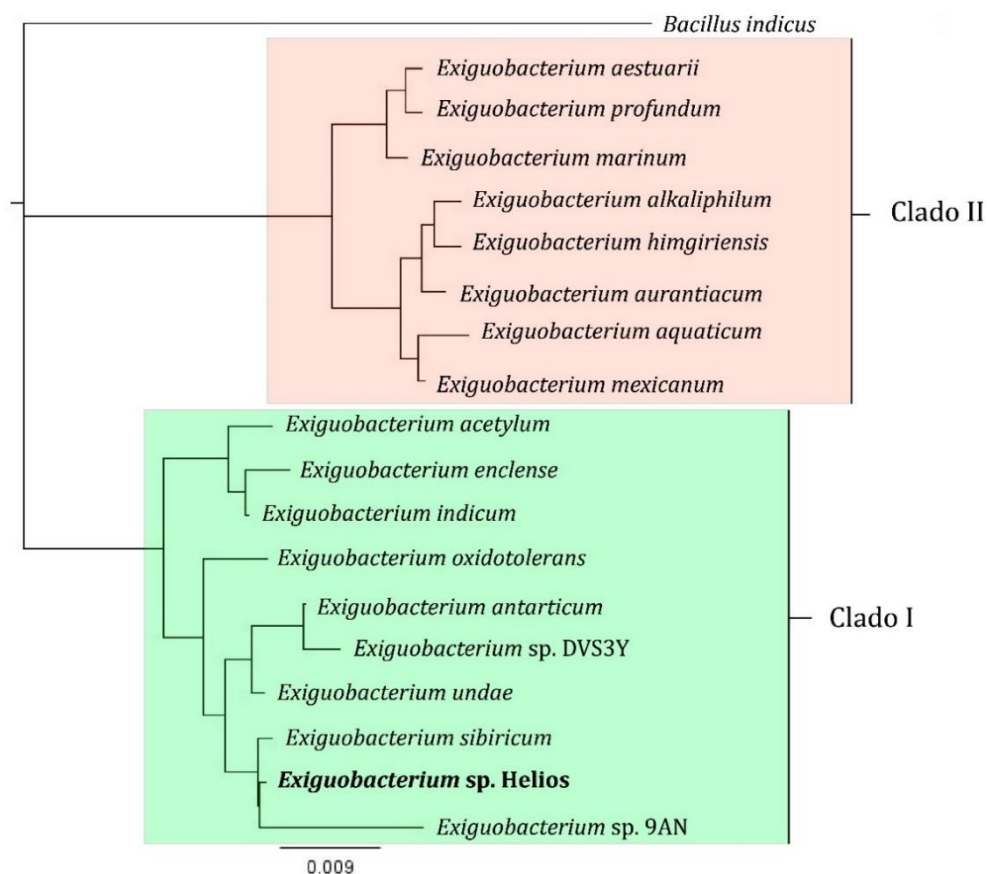


Figura R1.3. Árbol filogenético del género *Exiguobacterium* según su gen 16S ARNr. Los números de acceso son los siguientes: *E. aestuarii* (AY594264), *E. profundum* (AY818050), *E. marinum* (AY594266), *E. alkaliphilum* (EU379016), *E. himgiriensis* (JX999056), *E. aurantiacum* (DQ019166), *E. aquaticum* (JF775503), *E. mexicanum* (AM072764), *E. acetylicum* (X70313), *E. enclense* (JF893462), *E. indicum* (AJ846291), *E. oxidotolerans* (AB105164), *E. antarcticum* (DQ019164), *E. sp. DVS3Y* (AY864633), *E. undae* (DQ019165), *E. sibiricum* (CP001022), *E. sp. HELIOS* (CP053557) y *E. sp. 9AN* (AM072763). El Clado II está compuesto por las especies destacadas en color rosa, mientras que el Clado I se indica en color verde.

2. Análisis del genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios

2.1. Secuenciación y anotación del genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios

El genoma de la cepa *Exiguobacterium* sp. Helios fue secuenciado mediante la tecnología Illumina, obteniendo 1.472.423 lecturas con un tamaño medio de inserto de 526 pb y una cobertura media de 198,5. El número de *contigs* obtenido fue de 46 con un N50 de 64.238 pb, y el tamaño más grande de *contig* obtenido fue de 1.262.877 pb. Un total de 1.466.367 lecturas fueron mapeadas en el ensamblaje final, lo que supone el 99,58% del número total de lecturas. Posteriormente, se realizó una segunda secuenciación con la tecnología de Nanopore para obtener una mayor calidad de cobertura y ensamblaje. El número de lecturas obtenido fue de 105.656 con un tamaño medio de inserto de 5.722 pb. Finalmente, los *contigs* resultantes se alinearon con el genoma de *E. sibiricum* 255-15, la cepa más cercana filogenéticamente, y la secuencia se ensambló en dos *scaffolds*, uno de 3.042.310 pb con un contenido de G+C de 47,1% y otro de 110.663 pb con un contenido de G+C de 41,6%. El primero de los *scaffolds* corresponde al cromosoma y el segundo a un plásmido que se ha denominado pMCEX. La secuencia del genoma ha sido depositada en GenBank bajo los números de acceso CP053557 (cromosoma de *Exiguobacterium* sp. Helios) y CP053558.1 (plásmido pMCEX *Exiguobacterium* sp. Helios). Los parámetros del genoma de Helios son muy similares a los registrados para el resto de especies de *Exiguobacterium*. El tamaño del genoma está comprendido entre 2,8-3,4 kb, y su contenido en G+C es muy parecido al de otros integrantes del Clado I (46,5-47,5%) (Tabla R1.1).

Tabla R1.1. Características generales de los genomas del género *Exiguobacterium*. Datos obtenidos de la base de datos NCBI.

Especie	Nº acceso	Tamaño	Contenido en G+C (%)	N50	L50	Nº contigs	Nº secuencias codificantes (CDS)
<i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	CP053557.1	3,2 Mb	47	3 Mb	1	2	3125
<i>E. sibiricum</i>	CP001022.1	3 Mb	47,5	3 Mb	1	3	3024
<i>E. undae</i>	GCA_000620825.1	3,2 Mb	47,5	3.1 Mb	1	9	3181
<i>E. antarcticum</i>	GCA_000685865.1	3,2 Mb	47	1,9 Mb	1	7	3222
<i>E. oxidotolerans</i>	GCA_000702625.1	3,1 Mb	46,5	3,1 Mb	1	3	3011
<i>E. indicum</i>	GCA_001939065.1	3,2 Mb	46,5	283,7 kb	2	23	3271
<i>E. enclense</i>	GCA_900096925.1	3,3 Mb	46,5	678,8 kb	2	11	3275
<i>E. acetylicum</i>	CP075897.1	3,4 Mb	46,5	3,2 Mb	1	5	3433
<i>E. mexicanum</i>	GCA_025234665.1	2,9 Mb	52	38,5 kb	22	139	3020
<i>E. aquaticum</i>	GCA_025234795.1	2,9 Mb	52	35,5 kb	25	135	3030
<i>E. aurantiacum</i>	GCA_000702585.1	3 Mb	52,5	2,9 Mb	1	2	3000
<i>E. himgiriensis</i>	GCA_025234715.1	3 Mb	51	37,6 kb	25	151	3064
<i>E. alkaliphilum</i>	CP073101.1	3 Mb	52,5	2,9 Mb	1	3	2995
<i>E. marinum</i>	GCA_000620845.1	2,8 Mb	47	2,8 Mb	1	4	2785
<i>E. profundum</i>	CP109617.1	2,9 Mb	48	2,9 Mb	1	2	2876
<i>E. aestuarii</i>	GCA_025234735.1	2,8 Mb	47,5	25,6 kb	34	167	2928

Se han encontrado plásmidos de gran tamaño como el pMCEX en otros *Exiguobacterium*, como p1 (119.838 bp), p2 (43.790 pb) y p4 (68.355 pb) en *E. acetylicum* o como pE52 (52.136 pb) y pE73 (73.587 pb) en *E. alkaliphilum*, y algunos de tamaño más reducido como el pERprTSS-3 (4645 pb) de *E. profundum* o los pEXIG01(4.885 pb) y pEXIG02 (1.765pb) de *E. sibiricum*.

El análisis del genoma mediante la herramienta RAST mostró la presencia de 3241 secuencias codificantes, de las cuales el 28% estaban asociadas a varios subsistemas, la mayoría relacionados con aminoácidos y derivados, metabolismo proteico, carbohidratos, cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos (Figura R1.4.).

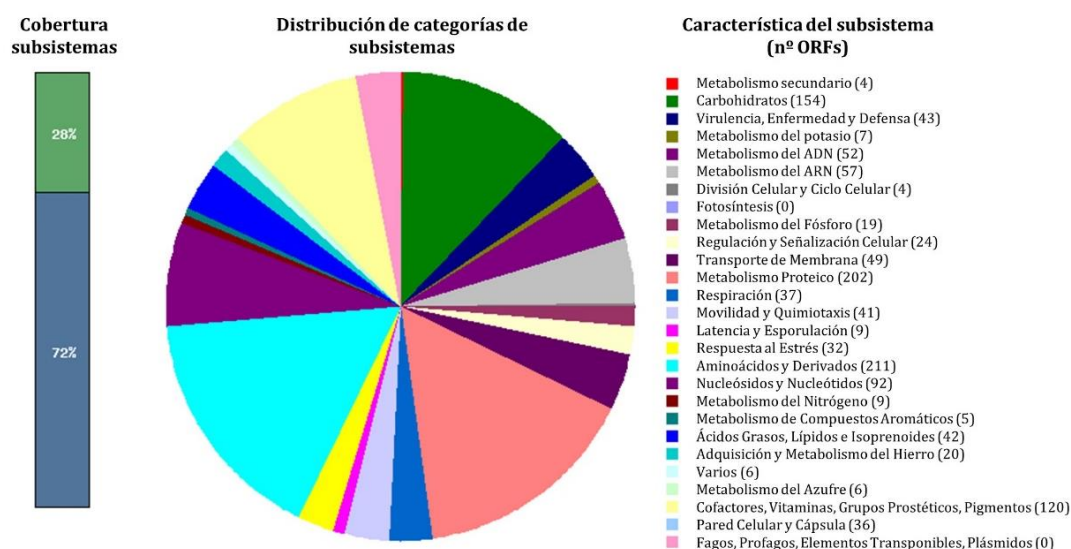
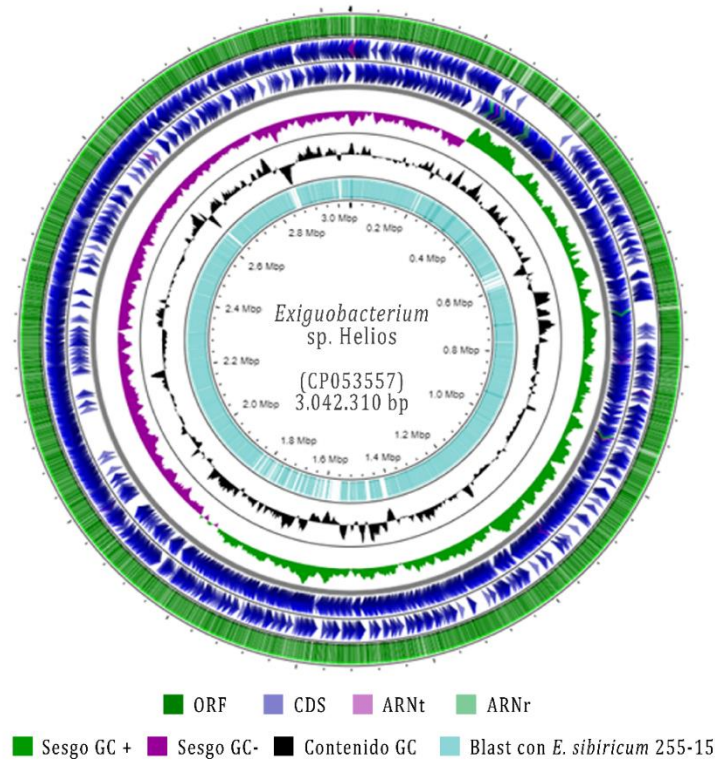


Figura R1.4. Categorías de subsistemas del genoma de *Exiguobacterium sp. Helios* anotadas por RAST.

El genoma completo de *Exiguobacterium sp. Helios* contiene 3241 marcos abiertos de lectura (ORFs), de los cuales 2144 (66%) pueden asignarse a funciones putativas, 69 a ARNt, y 26 a operones ARNc (Figura R1.5.A). El plásmido pMCEX contiene 95 ORFs, pero es destacable que solo 37 ORFs muestran homología en la base de datos del NCBI (Figura R1.5.B, Tabla R1.2).

A



B

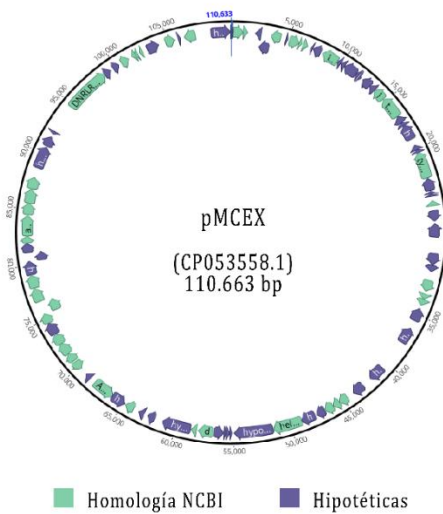


Figura R1.5. Mapa circular del genoma de *Exiguobacterium* sp. *Helios* y su plásmido pMCEX. (a) Los colores representan de fuera hacia dentro: marco abierto de lectura (ORF), secuencia codificante (CDS), ácido nucleico de transferencia (ARNt), ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), curva de sesgo de GC (verde para el positivo, violeta para el negativo), contenido en GC (negro) y un alineamiento *Blast* contra el genoma de *E. sibiricum* 255–15. La posición del genoma en una escala de 500 kb desde la base 1 se muestra en el círculo interior. (b) Mapa circular del plásmido pMCEX (Geneious v 2020.0). Las flechas azules representan genes codificantes de proteínas con homología con otras especies de la base de datos NCBI, y las flechas moradas representan proteínas hipotéticas.

Tabla R1.2. Genes anotados por el NCBI para el plásmido pMCEX con función asignada hipotética.

Locus (<i>HNY42_</i>)	Producto	ID de proteína
RS15715	Glicosiltransferasa	WP_188005513.1
RS15720	Proteína de la familia GtrA	WP_188005514.1
RS15735	Serinpeptidasa de la familia S8	WP_131504374.1
RS15745	Metalohidrolasa de plegamiento MBL	WP_188005518.1
RS15750	Proteína de la familia DUF3006	WP_188005519.1
RS15755	Proteína con dominio DUF5067	WP_188005558.1
RS15770	Metaloendopeptidasa de la familia ImmA/IrrE	WP_188005521.1
RS15810	Proteína de la familia lisozima	WP_188005559.1
RS15815	Proteína VirB4 del sistema de secreción tipo IV	WP_188005529.1
RS15845	Proteína de transferencia conjugativa de ADN, sistema de secreción tipo IV	WP_188005534.1
RS15865	Proteína con dominio hélice-giro-hélice	WP_188005538.1
RS15890	Recombinasa/integrasa tipo tirosina	WP_188005543.1
RS15895	Proteína con dominio hélice-giro-hélice	WP_188005544.1
RS15900	Proteína de la familia DUF4411	WP_188005545.1
RS15925	ATPasa de la familia AAA	WP_188005550.1
RS15930	Proteína lazo-hélice-hélice CopG	WP_188005551.1
RS15935	ATPasa de la familia AAA	WP_188005552.1
RS15950	SNF2 helicasa	WP_188005555.1
RS15980	ADN (citosina-5-)-metiltransferasa	WP_188005472.1
RS15985	Endonucleasa de discordancias en ADN Vsr	WP_188005473.1
RS16005	Proteína con dominio DUF3800	WP_188005477.1
RS16015	ATPasa de la familia AAA	WP_188005479.1
RS16025	Proteína con dominio hélice-giro-hélice	WP_188005481.1
RS16030	Proteína con dominio NTP transferasa	WP_188005482.1
RS16035	CDP-glucosa 4,6-dehidratasa	WP_188005483.1
RS16040	Proteína NAD-dependiente de la familia epimerasa/deshidratasa	WP_188005484.1
RS16050	Proteína con dominio metiltransferasa	WP_188005486.1
RS16055	Asparaginasa	WP_188005487.1
RS16060	Glicosiltransferasa	WP_188005488.1
RS16065	Proteína con dominio ATP-grasp	WP_188005489.1
RS16085	Deoxinucleósido quinasa	WP_188005493.1
RS16090	Alanina-ARNt ligasa	WP_188005494.1
RS16095	Fosfotransferasa	WP_188005495.1
RS16100	Transportador MFS	WP_188005496.1
RS16105	LD-carboxipeptidasa	WP_188005497.1
RS16125	Proteína con dominio DNRLRE	WP_188005501.1
RS16140	HNH endonucleasa	WP_188005504.1
RS16145	Sistema toxina-antitoxina tipo II RelE/ParE	WP_188005505.1
RS16150	Proteína lazo-hélice-hélice CopG	WP_188005506.1
RS16155	Proteína de la familia Yold-like	WP_188005507.1

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

RS16165	Proteína de la familia SMI1/KNR4	WP_188005508.1
RS16175	β -cetoacil-ACP sintasa 3	WP_188005510.1

Entre ellos, podemos destacar algunos genes cuya función hipotética es de posible interés; el gen *HNY42_RS16105* contiene un dominio LD-carboxipeptidasa que codifica un tetrapéptido involucrado en el reciclaje de peptidoglicano (PG). El gen *HNY42_RS16150* codifica una toxina ParE de tipo II del sistema toxina-antitoxina RelE/ParE, que consiste en una toxina estable y una antitoxina pequeña y lábil. Bajo condiciones desfavorables, la antitoxina es degradada, llevando a la activación de la toxina y provocando una parada del crecimiento, y posiblemente la muerte programada. El gen *HNY42_RS15810* codifica una proteína ComEC que podría estar involucrada en competencia natural tardía.

2.2. Comparación genómica de *Exiguobacterium* sp. Helios y *E. sibiricum* 255-15

Como ya se ha comentado, la cepa más cercana genéticamente a Helios según el árbol filogenético es *E. sibiricum* 255-15, que fue aislado del permafrost siberiano (Rodrigues et al., 2006). El genoma de *E. sibiricum* 255-15 consiste en un cromosoma de 3.040.786 pb (nº de acceso CPO01022) y dos plásmidos: pEXIG01 de 4,8 kb y pEXIG02 de 1,7 kb (nº de acceso CPO01023 y CPO01024, respectivamente).

Con estos datos se realizó un alineamiento de los genomas de *E. sibiricum* 255-15 y *Exiguobacterium* sp. Helios con el objetivo de obtener valores estadísticos de la similitud entre ellos (Figura R1.6). La alineación se llevó a cabo mediante las herramientas *en línea* del grupo del Dr. Konstantinidis (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2016) que realizan el análisis de identidad media de nucleótidos (ANIm) y de identidad media de aminoácidos (AAIm). El análisis a dos bandas mostró un 89,75% de ANI (A) y un 95,04% de AAI (B) entre Helios y *E. sibiricum*, lo que las sitúa en el límite de especie establecido por (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014), que determina que la mayoría de las especies comprenden

organismos que comparten un 95% de ANI entre ellos. Por lo tanto, aunque ambas cepas son muy cercanas genéticamente y ofrecen la posibilidad de comparar sus genomas, no puede considerarse que pertenezcan a la misma especie.

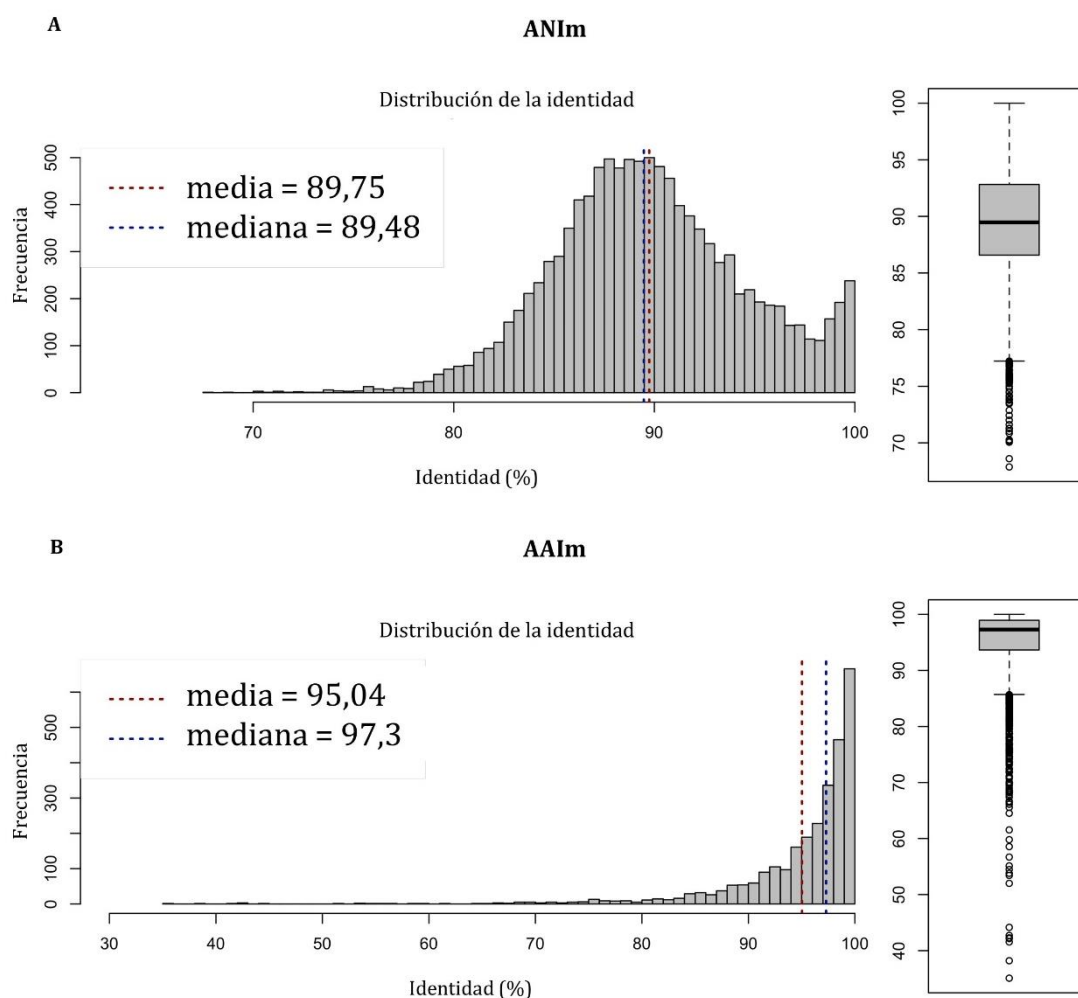


Figura R1.6. Alineamiento de los genomas de *E. sibiricum* 255–15 y *Exiguobacterium* sp. Helios. A. Análisis de identidad media de nucleótidos (ANIm). B. Análisis de identidad media de aminoácidos (AAIm).

Por otro lado, se realizó un alineamiento con la herramienta de análisis genómico Mauve con varias cepas del Clado I del género *Exiguobacterium* y el resultado reveló que *Exiguobacterium* sp. Helios comparte una organización genómica similar a la de las cepas de *E. sibiricum*, *E. antarcticum* B7 y *E. undae* (Figura R1.7). El alineamiento divide los genomas de estas 4 especies en tres bloques colineales locales o LCB (Locally Collinear Block) que determinan zonas

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

de homología entre los genomas. La identidad de estos bloques se muestra en la [Tabla R1.3](#), donde se puede observar que la mayor parte del genoma de las 4 cepas (2,6 Mb de media) se encuentra recogido en la zona de homología LCB1, cuya identidad asciende al 70,3%. Se puede observar además que la organización genómica de Helios y *E. sibiricum* 255-15 es muy similar. Sin embargo, también se puede comprobar que algunas regiones en el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios no se encuentran en el genoma de *E. sibiricum*, de acuerdo con el alineamiento Mauve y con la herramienta de alineamiento básico Blast del NCBI.

Entre los genes que no se pueden encontrar en *E. sibiricum* 255-15 pero sí en la cepa Helios ([Anexo 1](#)), destaca la existencia del clúster *HNY42_RS07465-HNY42_RS07515* que contiene los genes responsables de la síntesis del sideróforo petrobactina. Este grupo de genes también se detecta mediante la herramienta antiSMASH (Blin et al., 2023), que muestra la elevada similitud con clústeres de otros *Exiguobacterium* y varios tipos de *Bacillus* ([Figura R1.8](#)). Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro de uso extendido en agricultura para promover el crecimiento de plantas o prevenir ciertas enfermedades, y existen diversos ejemplos de microorganismos productores de sideróforos que se han empleado con este fin, como *Pseudomonas* (Höfte et al., 1991), *Brevibacillus brevis* (Sheng et al., 2020) o *B. subtilis* (Larkin, 2020).

Los dos genes que forman un operón *HNY42_RS07660-HNY42_RS07700*, codifican proteínas de la envuelta de esporas y podrían estar involucrados en la tolerancia a la desecación. El gen *HNY42_RS08215* codifica una cupina, también llamada proteína de almacenamiento de la semilla, que suele servir de reserva biológica de aminoácidos y metales. El dominio conservado de este gen, que comprende una estructura de barril beta de seis hebras, se encuentra habitualmente en el filo *Firmicutes*.

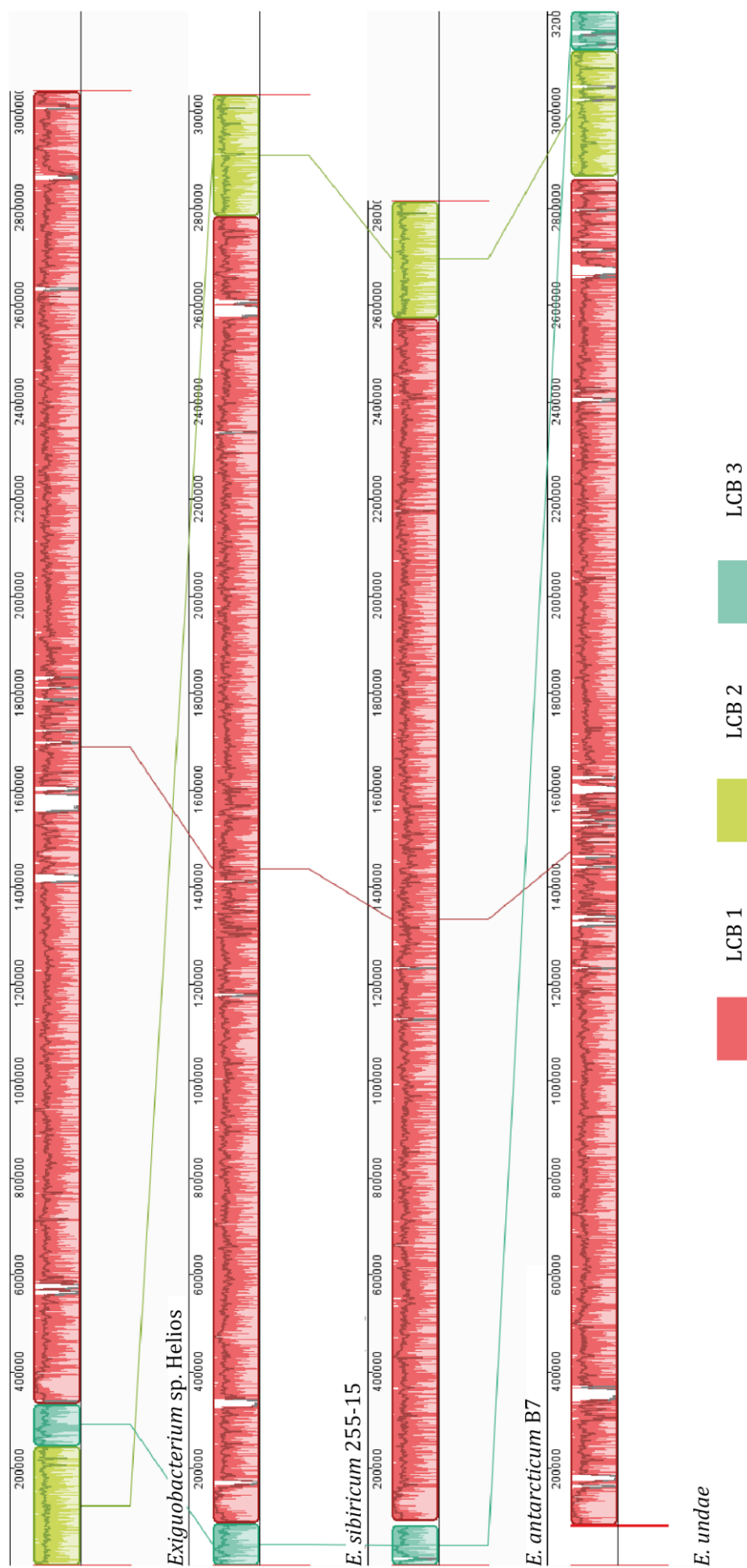


Figura R1.7. Alineamiento de los genomas de *Exiguobacterium* sp. Helios, *E. sibiricum*, *E. antarcticum* B7 y *E. undae* con la herramienta Mauve. Los bloques colineales locales (LCB, Locally Collinear Block) representados en 3 colores distintos indican zonas de alta homología

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

Tabla R1.3. Datos estadísticos de los LCBs resultado del alineamiento Mauve.

	Identidad por pares	Sitios de identidad	Longitud media
LCB 1	70,3 %	53,3 %	2.666.696 pb
LCB 2	77,3 %	63,1 %	249.515 pb
LCB 3	70,2 %	58,1 %	83.375 pb



Figura R1.8. Alineamiento del clúster de biosíntesis del sideróforo petrobactina de *Exiguobacterium* sp. Helios con los 10 clústeres homólogos de mayor identidad. Se muestra el número de acceso, localización del grupo de genes en el genoma, nombre de especie y porcentaje de genes que muestran similitud en el clúster.

Respecto al catabolismo de carbohidratos, *Exiguobacterium* sp. Helios contiene 38 glucosidasas, 22 glicosiltransferasas, 1 polisacárido liasa, 3 carbohidrato esterasas, y 12 proteínas de la familia CBM (*carbohydrate-binding module*), según la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/>). La familia CBM se caracteriza por una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una enzima

activa con un pliegue que tiene actividad de unión a carbohidratos. El número de enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glicosídicos encontradas en *E. sibiricum* es ligeramente más bajo, siendo de 26 glucosidasas, 20 glicosiltransferasas, 1 polisacárido liasa, 3 carbohidrato esterasas y 11 proteínas CBM.

Otra diferencia genómica relevante es que *Exiguobacterium* sp. Helios no posee un sistema CRISPR-CAS como el que presenta *E. sibiricum* codificado por los genes *EXIG_RS00985-EXIG_RS1015* (Anexo 2). Este mismo sistema está presente en otras cepas relacionadas como *E. profundum*.

Finalmente, el genoma de *E. sibiricum* contiene 27 transposasas que no están presentes en la cepa *Exiguobacterium* sp. Helios. Un número bajo de transposasas es beneficioso para su uso como chasis biotecnológico robusto, ya que las transposasas plantean una desventaja desde el punto de vista biotecnológico para los organismos debido a que la especificidad de secuencia de las inserciones por transposición es normalmente baja, y las transposiciones pueden alterar genes vitales (Darmon & Leach, 2014).

3. Estudio de las poliextremofilias de *Exiguobacterium* sp. Helios

3.1. Crecimiento en diferentes condiciones de temperatura y pH

Un aspecto interesante de las bacterias extremófilas es la posibilidad de cultivarlas en rangos de temperatura muy amplios. Se midió la DO_{600nm} de cultivos de *Exiguobacterium* sp. Helios tras varios días de crecimiento a 4°C, 20°C, 30°C y 37°C en medio LB (Figura R1.9.A). Pese a que en general el crecimiento bacteriano es más lento cuanto más baja es la temperatura, se observó que la cepa Helios alcanza una DO_{600nm} cercana a 8 cuando se cultiva a 4°C después de 24 h de cultivo. Se seleccionó la temperatura de 30°C como la temperatura idónea para los cultivos de rutina. Aunque a 20°C alcanza una DO_{600nm} más elevada, la fase exponencial se alcanza antes a 30°C y esto resulta más conveniente para el resto de los ensayos.

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

Para temperaturas mayores de 37°C, se realizaron las pruebas en medio sólido debido a limitaciones técnicas y para evitar también la excesiva pérdida de agua en el cultivo. Se comprobó que *Exiguobacterium* sp. Helios es capaz de crecer a 42°C en medio sólido (Figura R1.9.B).

Aunque el rango de temperatura de crecimiento para *Exiguobacterium* sp. Helios se sitúa entre 4°C y 42°C, según lo observado previamente en este género (Vishnivetskaya et al., 2009), es posible esperar que Helios sea capaz de resistir temperaturas bajo cero como las registradas en las muestras de permafrost de donde se aisló *E. sibiricum* (Vishnivetskaya et al., 2006) o temperaturas elevadas en condiciones de desecación como las registradas de media en las placas solares de las que se aisló, que alcanzaron los 51°C (Dorado-Morales et al., 2016).

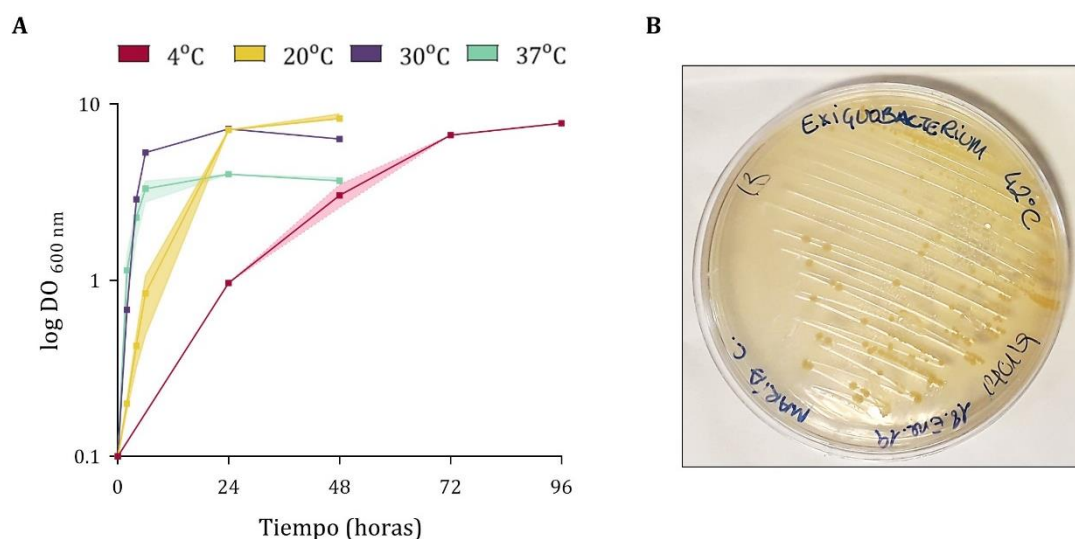


Figura R1.9. Crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios a diferentes temperaturas. A. Curvas de crecimiento a 4°C, 20°C, 30°C y 37°C en LB. La gráfica presenta el promedio de DO_{600nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar. Se parte de un inóculo inicial de DO_{600nm}=0,1. B. Fotografía de crecimientos en placa de *Exiguobacterium* sp. Helios a 42°C tras dos días.

Así mismo, la resistencia a las variaciones de pH también es un factor interesante para el uso biotecnológico de una cepa y una característica de algunas cepas extremófilas. Se ajustó el pH del medio LB añadiendo HCl o NaOH hasta conseguir unos valores de pH de 3, 5, 9 y 11, y posteriormente observar el crecimiento de la cepa Helios en ese medio, utilizando como controles las especies

E. sibiricum y *E. antarcticum* (Figura R1.10). Las tres especies crecen bien a pH 7,5 y 9, incluso llegan a crecer significativamente a pH 11. Se midió el pH final de los cultivos y se observó que en el caso de los cultivos a pH 9 y 11, éste descendía a pH 8 y 8,5, respectivamente.

Sin embargo, tan solo *Exiguobacterium* sp. Helios y *E. sibiricum* fueron capaces de crecer a pH 5, y ninguna de ellas creció a pH 3. Se han observado rangos de pH de crecimiento similares al de Helios y *E. sibiricum* en varias especies del género pertenecientes al Clado II empleadas para la producción de enzimas a nivel industrial (Kasana & Pandey, 2018).

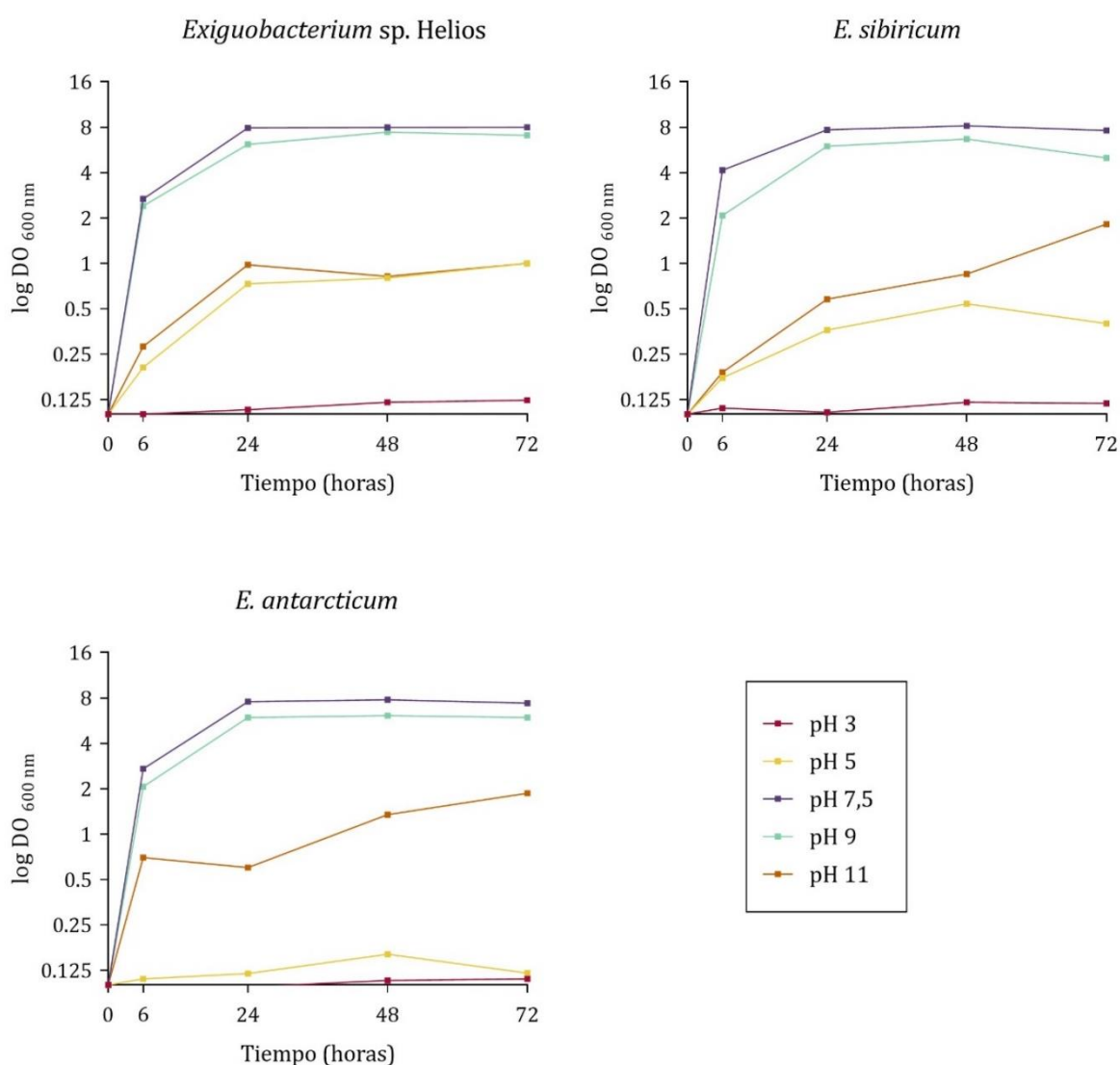


Figura R1.10. Crecimiento a diferentes pH. Curvas de crecimiento en LB a diferentes pHs. La gráfica presenta el promedio de DO_{600nm} correspondiente a dos réplicas biológicas. Se parte de un inóculo inicial de DO_{600nm}=0,1.

3.2. Crecimiento en condiciones de estrés osmótico

Uno de los aspectos más estudiados del género *Exiguobacterium* y un factor muy importante a tener en cuenta para el crecimiento de microorganismos en la industria biotecnológica es la resistencia al estrés osmótico, más concretamente la resistencia a la sal. Para comprobar la resistencia de *Exiguobacterium* sp. Helios a la presencia de sal en el medio de cultivo, se cultivó la cepa Helios en concentraciones crecientes de NaCl en medio LB, partiendo de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que es el contenido de sal del medio LB. La Figura R1.11.A muestra que *Exiguobacterium* sp. Helios puede crecer a concentraciones de hasta $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl como otras cepas del género *Exiguobacterium* pertenecientes al Clado I. Las cepas del Clado I son moderadamente resistentes al estrés salino a diferencia de las cepas del Clado II que pueden soportar concentraciones de hasta $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

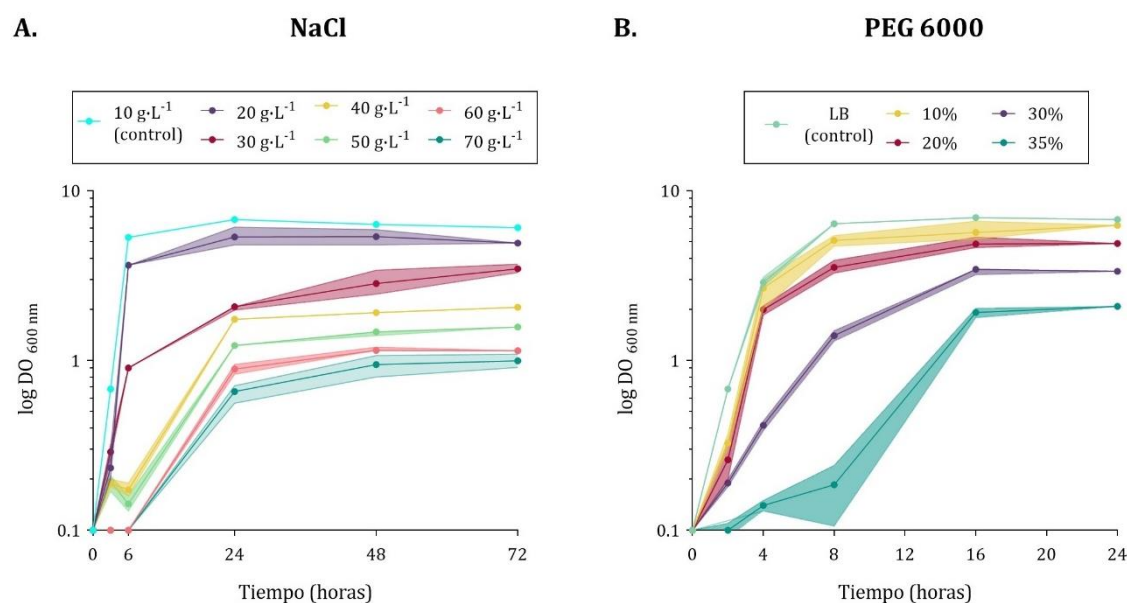


Figura R1.11. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios. **A.** Efecto de la concentración de NaCl en el medio. Como control se utilizó el crecimiento en medio LB que tiene 10 g L^{-1} de NaCl. **B.** Efecto de la concentración de PEG 6000 en el medio. Como control se utilizó el crecimiento en medio LB sin PEG. Las gráficas representan el promedio de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

El mismo procedimiento se siguió para determinar la resistencia de *Exiguobacterium* sp. Helios al estrés osmótico provocado por el polietilenglicol (PEG), compuesto muy utilizado industrialmente que en disolución acuosa simula el estrés matricial. Por ello se cultivó *Exiguobacterium* sp. Helios en medio LB con concentraciones crecientes de PEG 6000. La [Figura R1.11.B](#) muestra que *Exiguobacterium* sp. Helios puede crecer en un medio con 35% de PEG 6000.

Para calcular a qué actividad de agua (a_w) equivale un 35% de PEG 6000 se realiza una aproximación basada en los datos obtenidos por Eliassi et al. (1999), donde se mide la actividad de agua en una gran variedad de soluciones acuosas de PEG empleando un osmómetro de presión de vapor. En dicho trabajo se postula que los datos experimentales obtenidos se ajustan a una ecuación de tercer grado [3], con respecto a la fracción de masa de agua, w_1 . Los coeficientes de dicha ecuación junto con su porcentaje de desviación se muestran en la [Tabla R1.4](#).

$$a_1 = aw_1^3 + bw_1^2 + cw_1 + d \quad [3]$$

Tabla R1.4. Coeficientes de la ecuación 3 para soluciones de PEG 6000 a varias temperaturas. Datos tomados de Eliassi et al. (1999).

T (°C)	a	b	c	d	ARD% ^a
PEG 6000					
35	0,3992	-11,921	11,920	0,6009	0,00
45	-0,4397	11,361	-0,9518	12,554	0,01
55	0,2723	-0,8177	0,8216	0,7239	0,01
65	0,4086	-11,696	11,202	0,6408	0,00

^a Desviación porcentual absoluta (*absolute percentage deviation*, ARD%).

Por lo tanto, si se tienen en cuenta los datos de la tabla obtenidos a 35°C (la más cercana a nuestras condiciones de laboratorio) y se trasladan a la ecuación [3], la actividad de agua correspondiente a una concentración del 35% de PEG6000 en solución acuosa es aproximadamente del 0,982. Este valor queda lejos de la actividad de agua registrada en el permafrost del que se aisló la especie *E. sibiricum*, que descendía hasta 0,90 (Ponder et al., 2008).

3.3. Crecimiento en presencia de metales y metaloides

Las bacterias capaces de resistir condiciones climáticas extremas a menudo presentan otras extremofilias como, por ejemplo, la habilidad para resistir elevadas concentraciones de algunos metales y metaloides tóxicos. En este sentido, se estudió la capacidad de *Exiguobacterium* sp. Helios para crecer en medio mínimo Tris en presencia de varios de estos compuestos. La [Tabla R1.5](#) muestra que Helios tiene una resistencia moderada a algunos metales y metaloides, especialmente selenito y arseniato.

Tabla R1.5. Resistencia a metales y metaloides. Se muestran los datos experimentales de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de *Exiguobacterium* sp. Helios para cada compuesto.

Metales y metaloides	MIC (mM)
NiCl ₂	1,25
ZnCl ₂	2,5
K ₂ TeO ₃	2
K ₂ SeO ₃	40
NaAsO ₂	1,25
Na ₃ AsO ₄	25
CdCl ₂	0,5
AgNO ₃	0,5
Pb(NO ₃) ₂	5
CuCl ₂	5
CrCl ₃	5
CoSO ₄	10

La resistencia a las especies de arsénico se ha estudiado ampliamente en el género *Exiguobacterium*, en el que existen cepas con resistencias muy elevadas, en torno a 10-20 mM para As(III) y 100-200 mM para As(V) (Castro-Severyn et al., 2020). Estas concentraciones son muy superiores a la MIC (Concentración Mínima

Inhibitoria) que presenta Helios, que se encuentra más cerca de los valores de resistencia descritos para *B. subtilis* (Kruger et al., 2013).

La resistencia de *Exiguobacterium* sp. Helios al selenito fue analizada en mayor detalle. Cuando la cepa se cultivaba en LB con concentraciones crecientes de selenito, el cultivo adquiría un color rojizo, sugiriendo una reducción del selenito a su forma elemental selenio (Figura R1.12). *Exiguobacterium* sp. Helios es capaz de crecer en presencia de hasta 40 mM de selenito en el medio, indicando que su resistencia es similar a la descrita para las cepas altamente tolerantes al selenito como *Comamonas testosteroni* S44 (Zheng et al., 2014), *Pseudomonas moraviensis* (Staicu et al., 2015), o *Vibrio natriegens*.

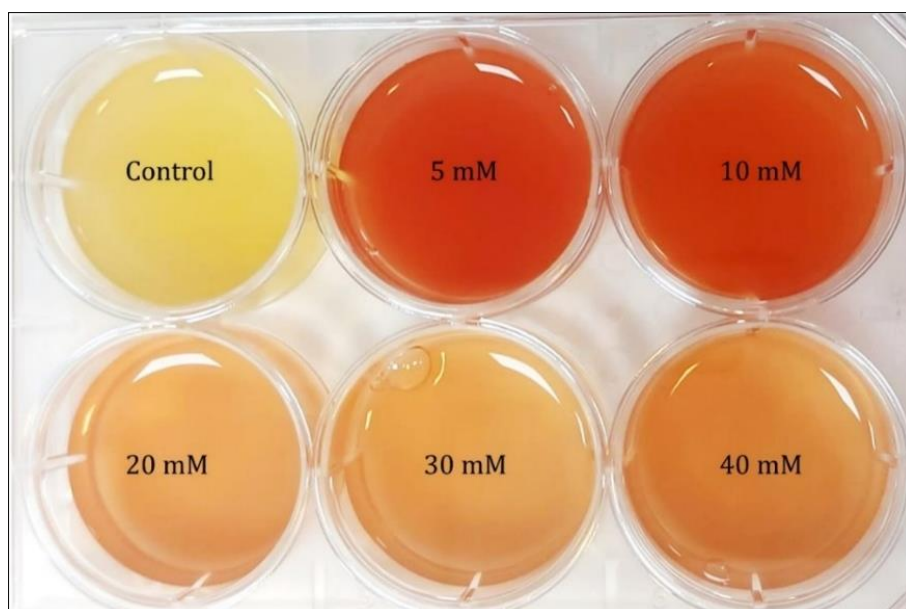


Figura R1.12. Efecto reductor de selenito a Se(0) de *Exiguobacterium* sp. Helios. Se probaron concentraciones crecientes de selenito (0-40 mM) en LB y como control se empleó medio LB sin selenito.

La base molecular de la reducción biológica de selenito a Se(0) no se ha dilucidado por completo, aunque la hipótesis establece que el selenito se internaliza por las células a través de un transportador de sulfato y se reduce a selenio elemental (de color rojo como se observa en la Figura R1.12) en el citoplasma. Por este motivo se localizaron diferentes reductasas de selenito previamente estudiadas en la literatura y se buscaron enzimas homólogas en el

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios. En la [Tabla R1.6](#) se puede observar que la enzima que presenta mayor similitud es una reductasa de tiorredoxina-disulfuro (TrxR), i.e., una selenoproteína dependiente de NADPH que desempeña un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox celular y que en *Bacillus* sp. Y3 es responsable de la reducción de telurito a Te(0) (Yasir et al., 2020).

Tabla R1.6. Reductasas de selenito previamente estudiadas en la literatura que presentan genes homólogos en *Exiguobacterium* sp. Helios.

Enzima	Especie y nº de acceso	% homología con <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios y nº acceso	Función	Referencia
FccA	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 AAN54044.1	26,75% WP_131502763.1	Fumarato reductasa	(Li et al., 2014)
FrdA	<i>Enterobacter cloacae</i> Z0206 WP_013095275.1	33,78% WP_131502763.1	Fumarato reductasa	(Song et al., 2017)
GorA	<i>Pseudomonas stutzeri</i> TS44 EIK52410.1	31,10% WP_188004579.1	Glutation reductasa	(Wang et al., 2019)
TrxR	<i>Bacillus</i> sp. Y3 TYO53939.1	73,72% WP_131502191.1	Reductasa tiorredoxina-disulfuro	(Yasir et al., 2020)
FesR	<i>Alishewanella</i> sp. WH16-1 KRS22921.1	40,00% WP_165871659.1	Ferredoxina	(Zhou et al., 2022)

La presencia de esta enzima en *Exiguobacterium* sp. Helios podría explicar su resistencia a telurito ([Tabla R1.5](#)) y la reducción de telurito que se observa en la [Figura R1.13](#), donde se comprobó la capacidad de reducción de telurito a telurio elemental por las cepas Helios, *E. sibiricum* y *E. antarcticum*, siendo la última especie la que menos concentración de telurito era capaz de resistir y transformar.

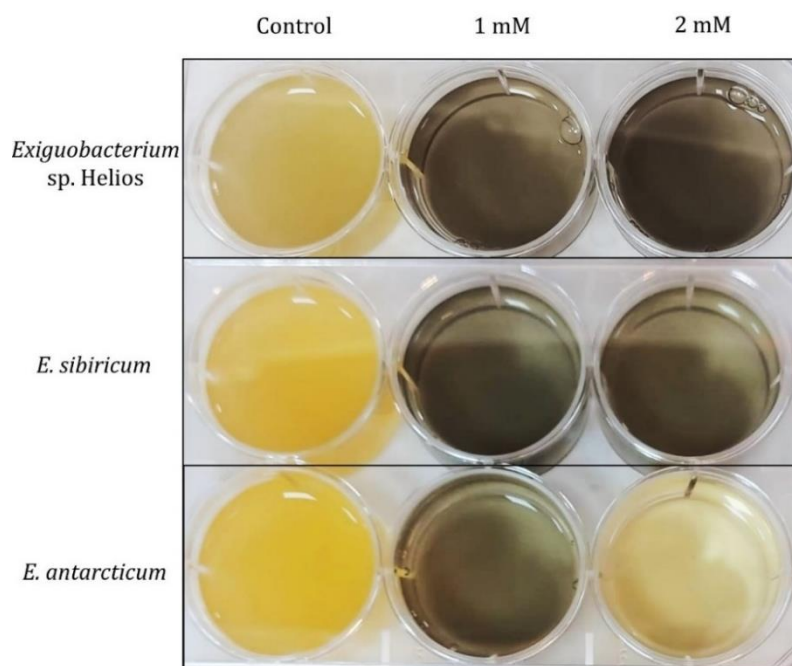


Figura R1.13. Reducción de telurito a Te(0) por varias especies de *Exiguobacterium*. Se estudió la reducción de telurito en *Exiguobacterium* sp. Helios, *E. sibiricum* y *E. antarcticum* en LB, empleando como control medio LB sin telurito, y con 1 mM o 2 mM de K_2TeO_3 .

3.3.1. Producción de SeNPs

Se ha observado además que algunas bacterias vinculan su resistencia a los oxoaniones de selenio con la producción de nanopartículas de selenio (SeNP) intracelular y/o extracelularmente, dependiendo del mecanismo implicado. Para estudiar la capacidad de la cepa Helios para producir nanopartículas a partir de Se elemental (SeNPs) se observó por microscopía electrónica de transmisión (MET) un cultivo de células de Helios cultivadas en LB con 1 mM de selenito a 30°C. De esta manera se pudieron fotografiar SeNPs electrodensas producidas por *Exiguobacterium* sp. Helios (Figura R1.14.A,B). Estas partículas se analizaron por EDX (fluorescencia de rayos X por energía dispersiva) (Figura R1.14.C) para comprobar que aparecía el patrón específico para el selenio. El patrón de difracción electrónica del área seleccionada (SAED) de las nanopartículas mostró un halo difuso, lo que indica que el Se presente en las SeNPs está en su forma amorfa (Figura R1.14.C, inserto). Se midió el tamaño de las nanopartículas, que presentaban una forma esférica, y la media fue de 162 ± 57 nm (Figura R1.14.D).

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

Este análisis de las SeNPs representa una prueba de concepto para el desarrollo de un proceso biotecnológico de producción de nanopartículas de Se bacterianas.

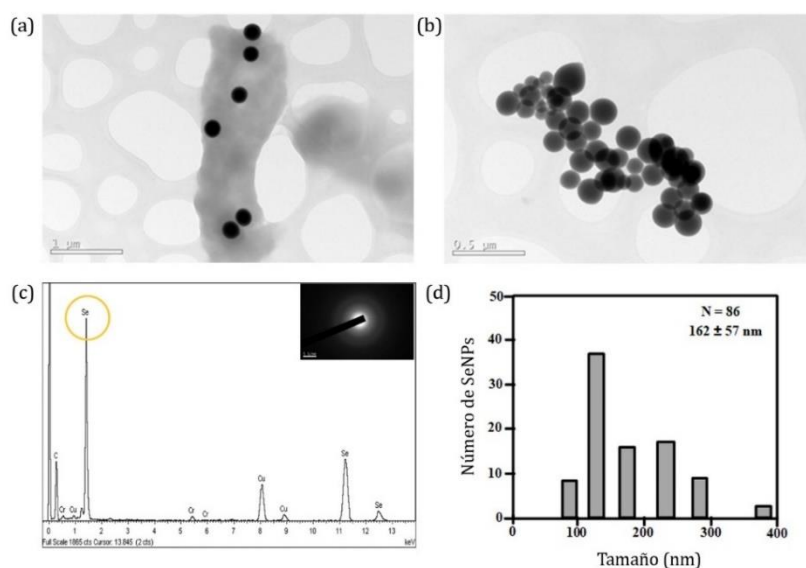


Figura R1.14. Análisis de la producción de SeNPs por *Exiguobacterium sp. Helios*. A y B. Análisis por MET mostrando las nanopartículas producidas por las células bacterianas. **C.** Análisis por EDX de una de las SeNPs del panel A. En el inserto se muestran los anillos difusos del patrón de difracción electrónica del área seleccionada (SAED) para esa SeNP. **D.** Distribución de tamaños de las SeNPs producidas por *Exiguobacterium sp. Helios* obtenida utilizando ImageJ (N = número de nanopartículas analizadas).

3.3.2. Inmovilización de células de *Exiguobacterium sp. Helios*

Aprovechando su capacidad de reducir selenito, se planteó una prueba de concepto para analizar si las células de *Exiguobacterium sp. Helios* siguen metabólicamente activas tras la desecación. Para ello, se inmovilizaron células de *Exiguobacterium sp. Helios* en filtros de celulosa, siguiendo la misma metodología que en los ensayos de desecación, pero concentrando la densidad celular de la muestra (20 y 40 de DO600nm). Se dejaron en desecación durante 7 días y tras ese periodo, se evaluó si las células podían recuperarse metabólicamente sobre el filtro, incubándolas con 50 μL de LB con selenito (Figura R1.15.A). A las 24 h se pudo observar cómo los filtros habían adquirido el color rojo característico de la reducción de selenito a selenio.

Por otro lado, se realizó una prueba de inmovilización de las células de Helios en esferas de alginato. En este caso las células se mantuvieron hidratadas. Se evaluó la actividad de las células inmovilizadas incubándolas con 50 μ L de LB con selenito (Figura R1.15.B). En este caso también se observó el cambio de color en las primeras 24 h en el interior de las esferas.

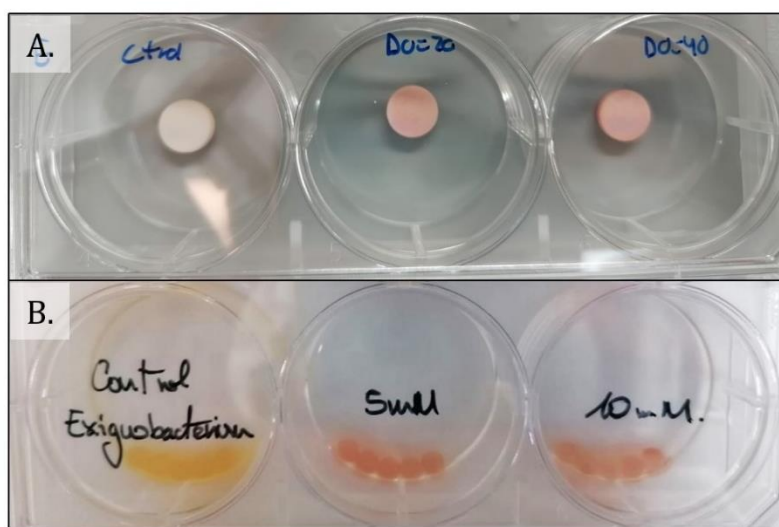


Figura R1.15. Inmovilización de células de *Exiguobacterium* sp. Helios. (A) Inmovilización en filtros de celulosa. **(B)** Inmovilización en esferas de alginato.

3.4. Resistencia a radiación UV

Otra de las características que cabe esperar de una bacteria aislada de un panel solar es su resistencia a altas dosis de radiación. Para evaluar la resistencia a la radiación de *Exiguobacterium* sp. Helios se empleó radiación UV. La dosis de radiación UV que recibía la placa solar en el momento de obtención de la muestra era de 461,3 $W \cdot m^{-2}$, y la dosis media total del día era de 19,6 $kJ \cdot m^{-2}$ (Dorado-Morales et al., 2016). La radiación UV se puede dividir en radiación UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (100-280 nm). Para los ensayos se utilizó una lámpara que emitía radiación UV a una longitud de onda de 254 nm (UV-C). Se empleó como control positivo *D. radiodurans*, el modelo bacteriano de resistencia a la radiación, de manera que las condiciones utilizadas no afectaron su viabilidad (Figura R1.16.A), mientras que el control negativo con *E. coli* DH10B no consiguió

VI. RESULTADOS. Capitulo 1

resistir a la menor de las dosis. Las cepas del género *Exiguobacterium* consiguieron resistir a la mayor de las dosis aplicadas, de 1000 J·m⁻², pero con un descenso drástico de su viabilidad, presentando *E. sibiricum* y *Exiguobacterium* sp. Helios una supervivencia muy similar (Figura R1.16.B).

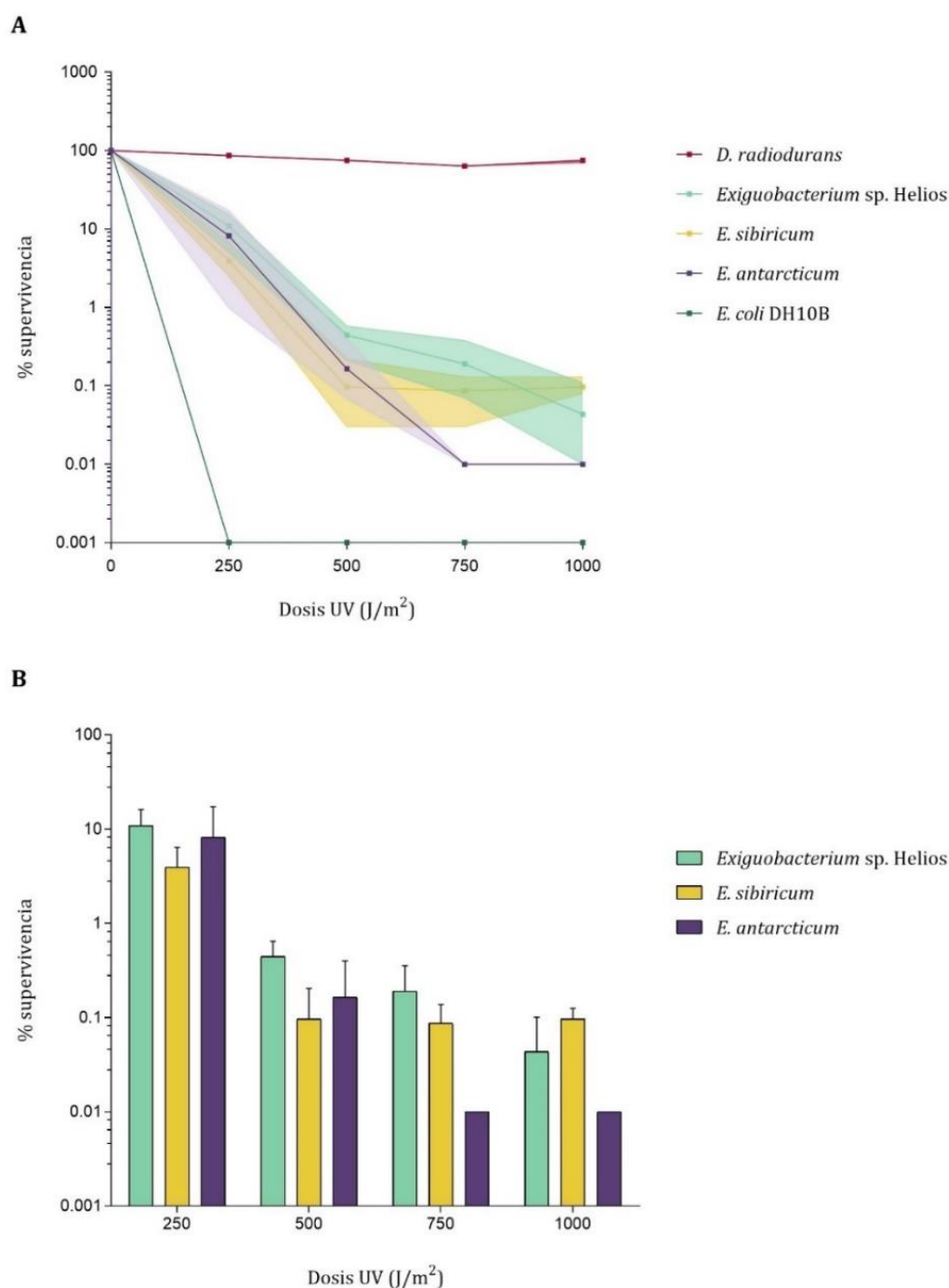


Figura R1.16. Resistencia a UV. A. Supervivencia a diferentes dosis de radiación UV de las cepas *Exiguobacterium* sp. Helios, *E. sibiricum*, y *E. antarcticum*, en comparación con los controles *E. coli* DH10B (control negativo) y *D. radiodurans* (control positivo). **B.** Comparación de supervivencia de las cepas del género *Exiguobacterium*. Las gráficas presentan el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

3.5. Resistencia al estrés hidrodinámico en biorreactor

Para determinar si la envoltura celular más gruesa de Helios podría ofrecer alguna ventaja de resistencia al estrés hidrodinámico se realizó un ensayo de resistencia a dicho estrés en biorreactor, comparando las células de *Exiguobacterium* sp. Helios con las células de *E. coli* W. Ambas cepas se sometieron a una agitación de 300 rpm (reactores A y C) y de 1200 rpm (reactores B y D). En el caso de Helios, se empleó la cepa transformada *Exiguobacterium* sp. Helios (pSEVA3b67Rb) (Tabla R1.7).

Tabla R1.7. Condiciones de fermentación para el ensayo de estrés hidrodinámico.

Condiciones	Reactor A	Reactor B	Reactor C	Reactor D
Cepa	<i>E. coli</i> W	<i>E. coli</i> W	<i>E. sp.</i> Helios (pSEVA3b7Rb)	<i>E. sp.</i> Helios (pSEVA3b7Rb)
Agitación (rpm)	300	1200	300	1200

Para la determinación del estrés hidrodinámico, se evaluaron en varios tiempos la viabilidad celular, la longitud y morfología celular. En el caso de *E. coli* W, la viabilidad celular del reactor B descendió drásticamente respecto a la del reactor A (Figura R1.17.A), y la longitud de las células aumentó desde el inicio del experimento, aunque a las 24 h estaba ligeramente por debajo del control del reactor A (Figura R1.17.B). En cambio, *Exiguobacterium* sp. Helios (pSEVA3b7Rb) no perdió viabilidad al aumentar la agitación en el reactor D, incluso aumentó el número de unidades formadoras de colonia (UFC·mL⁻¹) a las 24 h respecto al reactor C (Figura R1.17.A). En cuanto a la morfología, no se observan prácticamente diferencias entre las células de Helios del reactor C y las del reactor D (Figura R1.17.B).

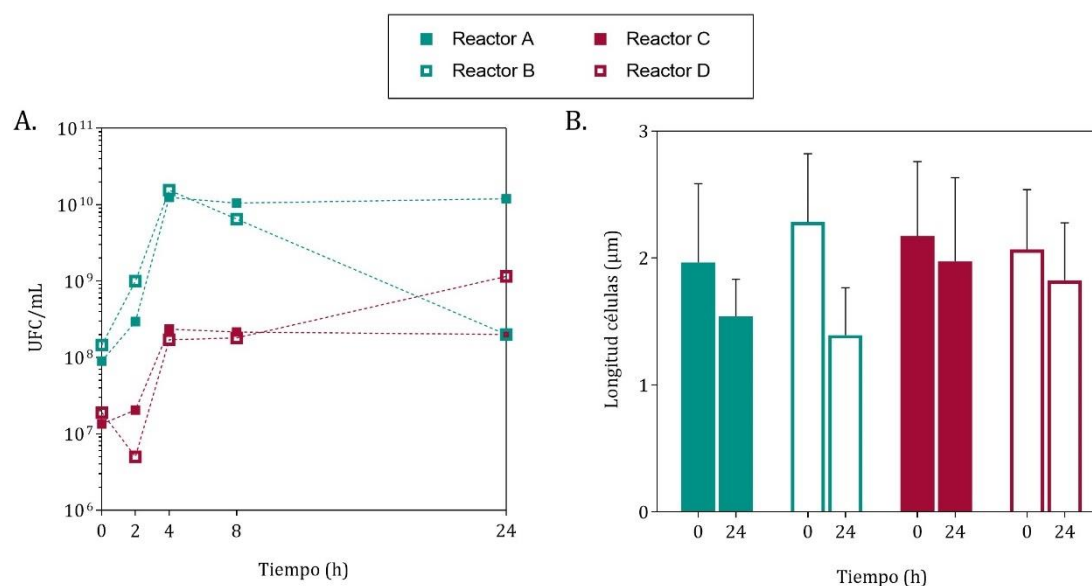


Figura R1.17. Efecto del estrés hidrodinámico en la viabilidad (A) y la longitud (B) de las células. La viabilidad se expresa en unidades formadoras de colonia por mililitro ($\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$). La longitud fue cuantificada con *ImageJ*. La gráfica (A) presenta el promedio de tres réplicas técnicas. La gráfica (B) representa el promedio y desviación estándar de $n=60$ células por condición.

Quando se analizó la morfología de las células al inicio del experimento, a las 8 h y a las 24 h (Figura R1.18) se observó que *E. coli* W sufría las consecuencias de la elevada agitación, rompiéndose y finalmente agregando como se muestra en la imagen en los círculos amarillos (Reactor B, 24 h), mientras que las células del reactor A permanecían enteras y sin agregar. Por otra parte, Helios mantuvo su morfología típica de fase estacionaria sin alteraciones visibles y sin formar agregados en ambas condiciones.

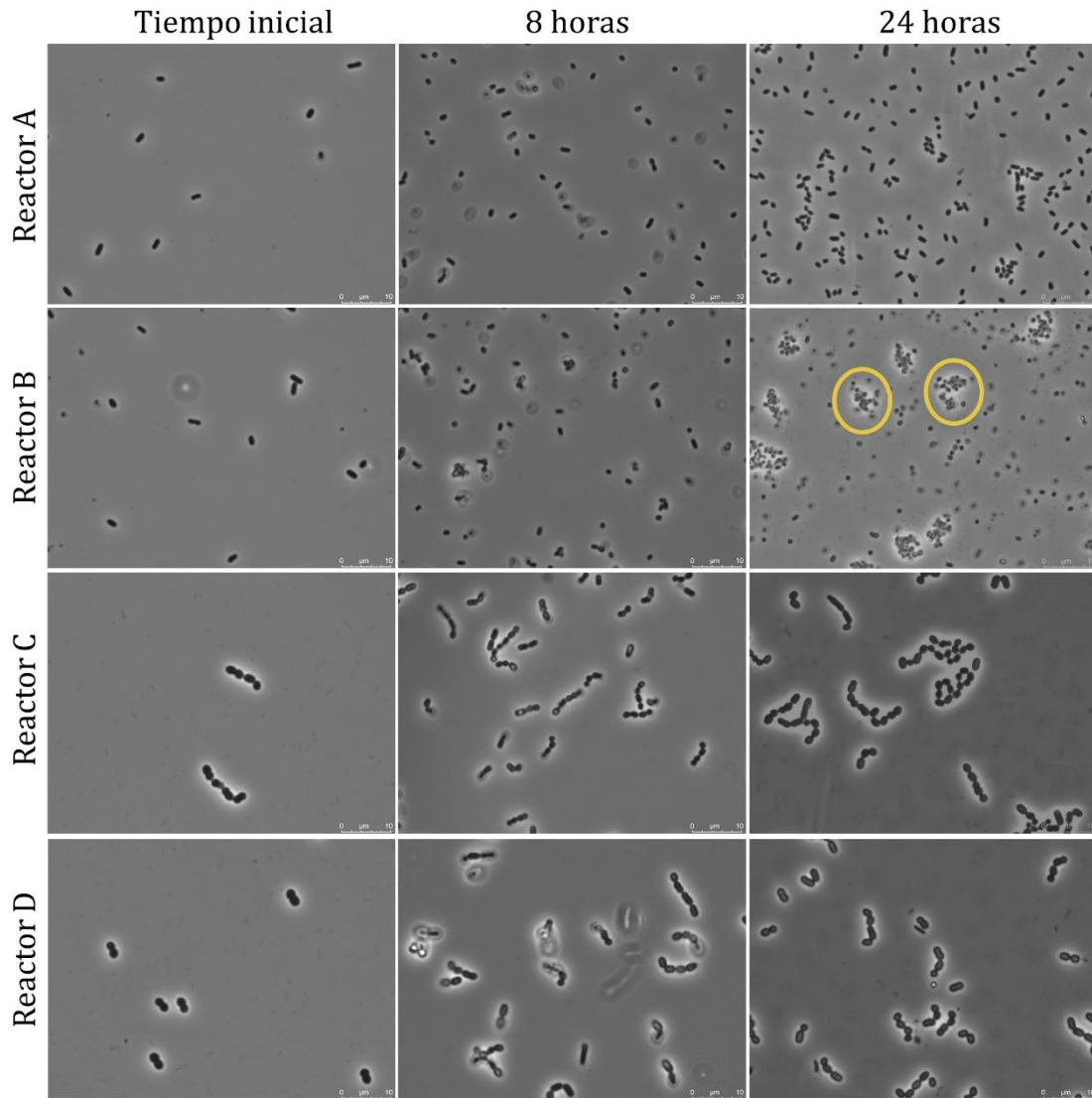


Figura R1.18. Análisis morfológico por microscopía óptica de los efectos del estrés hidrodinámico. Se realizaron fotografías de muestras de los reactores A, B, C y D a las 0 h, 8 h y 24 h.

4. Desarrollo de protocolos de transformación

4.1. Sensibilidad a antibióticos

Con el objetivo de investigar la susceptibilidad a distintos antibióticos para llevar a cabo modificaciones genéticas en *Exiguobacterium* sp. Helios, en primer lugar, se realizó un ensayo de sensibilidad a los antibióticos más comúnmente empleados en el laboratorio.

Para ello se realizó un antibiograma en medio líquido LB observando durante 48 h el crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios en presencia de concentraciones crecientes de ampicilina, cloranfenicol, espectinomicina, gentamicina y kanamicina. Los datos obtenidos se resumen en la [Tabla R1.7](#).

Los resultados del antibiograma mostraron que *Exiguobacterium* sp. Helios no presenta una gran resistencia a los antibióticos probados. Se observó un efecto bactericida especialmente potente en presencia de cloranfenicol, gentamicina y kanamicina, que resulta de utilidad para la selección de plásmidos para su transformación.

Tabla R1.7. Evaluación de la sensibilidad a antibióticos en *Exiguobacterium* sp. Helios. Se muestran los datos de concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento para cada antibiótico probado.

Antibióticos	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Ampicilina	50
Cloranfenicol	5
Espectinomicina	75
Gentamicina	10
Kanamicina	5

4.2. Transformación génica mediante electroporación

4.2.1. Selección de plásmidos

Con el objetivo de establecer un protocolo de transformación génica eficiente, primero se seleccionaron los vectores que se iban a probar con *Exiguobacterium* sp. Helios. Teniendo en cuenta que el género *Exiguobacterium* pertenece a los *Firmicutes*, se eligieron plásmidos que ya hubiesen sido empleados para la transformación de bacterias de este filo.

La colección de plásmidos SEVA es particularmente interesante debido a la estructura modular e intercambiable que presentan, y pese a que está especialmente orientada a su uso en *E. coli* y *Pseudomonas putida*, cada vez se está ampliando más su utilización a otros tipos de microorganismos, como cianobacterias, actinomicetos y firmicutes (García-Gutiérrez et al., 2020; Martínez-García et al., 2023). Se eligieron vectores con diferentes orígenes de replicación, resistencias a antibiótico y cargo. Más concretamente, se probó primero el vector pSEVA251, que presenta el gen de resistencia a la kanamicina, el *ori* RSF1010, funcional en un amplio rango de huéspedes, y un sitio de clonaje múltiple (MCS) (Figura R1.19.A).

Además, se utilizó el vector pSEVA637, que presenta el gen de resistencia a gentamicina, y aunque su *ori* pBBR1 no tiene un rango de huéspedes tan amplio, presenta el gen de expresión de la proteína verde fluorescente (*gfp*) sin promotor, que puede ser muy útil para la selección de mutantes y el estudio de la cepa (Figura R1.19.B).

Por último, se seleccionó un plásmido de la colección SEVA-sib (*sibling*), el pSEVA3b67, que no sigue los mismos criterios de estandarización que el resto de los plásmidos SEVA. Este presenta el gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*), un *ori* pUC y un *ori* pTHT15 para su uso en *E. coli* y *B. subtilis* como vector satélite y el gen de expresión de la proteína roja fluorescente (*mrfp*) bajo el control del promotor *P_{veg}*. Este es uno de los promotores constitutivos más fuertes de *B. subtilis* (Willenbacher et al., 2016) (Figura R1.19.C).

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

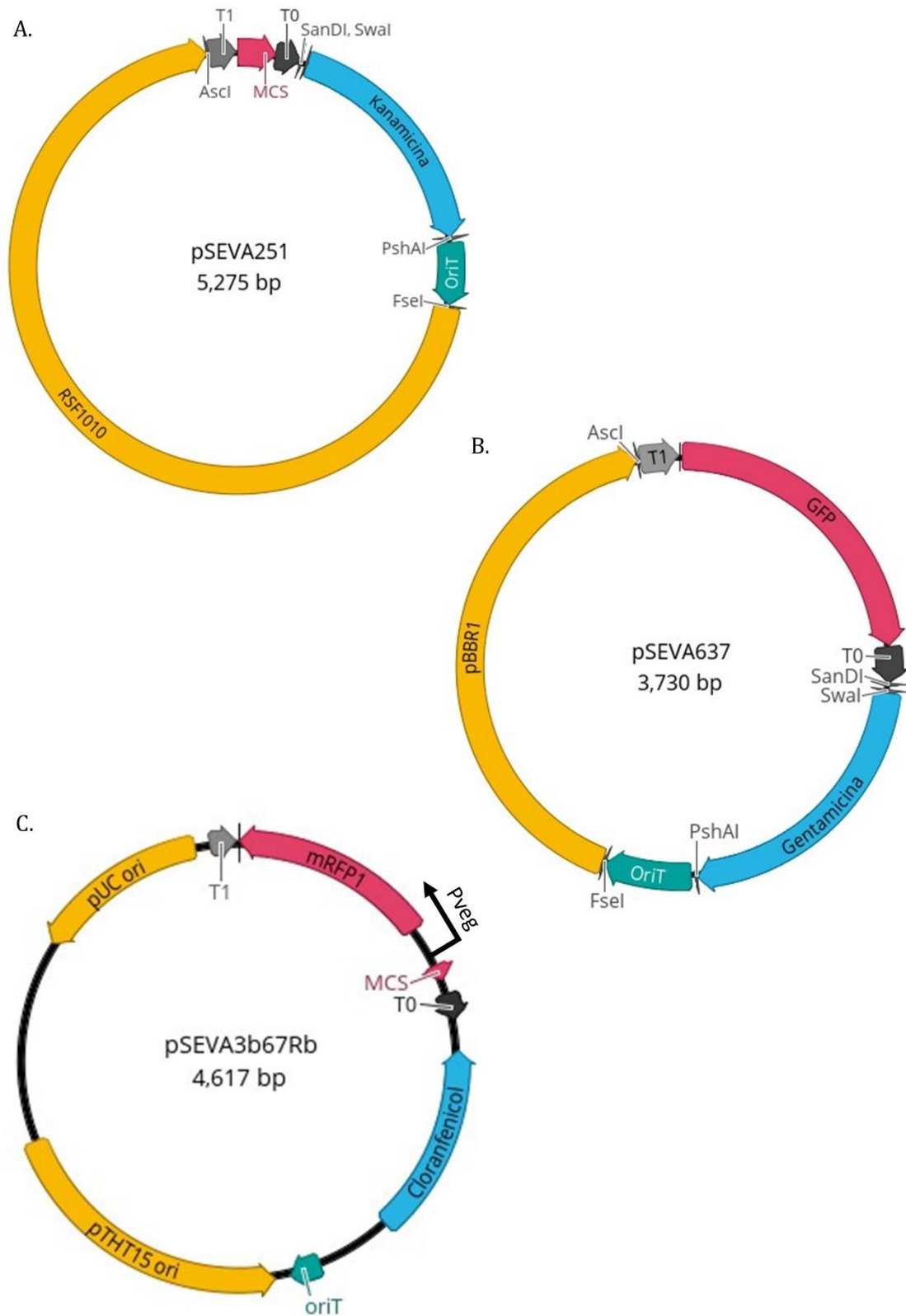


Figura R1.19. Plásmidos SEVA seleccionados para la electroporación de *Exiguobacterium* sp. Helios. Se representan esquemáticamente los plásmidos pSEVA251 (A), pSEVA637 (B) y pSEVA3b67Rb (C). En naranja se muestra el origen de replicación, en azul el gen de resistencia a antibiótico y en rosa el cargo. T0 y T1: terminadores independientes de fago lambda. P_{veg}: promotor procedente de *B. subtilis*.

Además de la colección SEVA, se seleccionó también el vector de expresión pRCR12 (Mohedano et al., 2015), empleado repetidamente para la modificación genética de firmicutes, como *Lactococcus lactis* y otras bacterias acidolácticas (LAB), que presenta el gen de resistencia a cloranfenicol, el replicón pSH71 y el gen *mrfp* que codifica la proteína mCherry bajo el control del promotor P_x de *Streptococcus pneumoniae* que permite una rápida detección del plásmido (Figura R1.20). A la hora de manipular este tipo de plásmidos es importante tener en cuenta que son termosensibles, de forma que a temperaturas mayores de 30°C pueden sufrir mutaciones y pérdida de pequeños fragmentos de su secuencia.

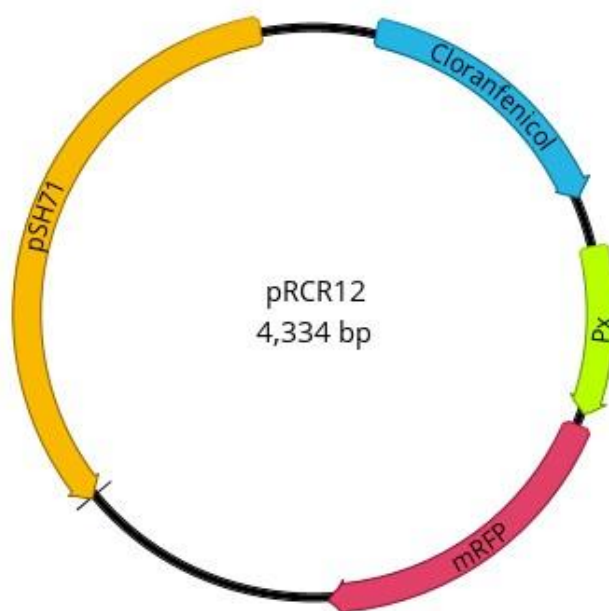


Figura R1.20. Plásmido pRCR12 empleado en firmicutes seleccionado para la electroporación de *Exiguobacterium sp. Helios*. Se representa esquemáticamente el plásmido pRCR12. En naranja se muestra el origen de replicación, en azul el gen de resistencia a antibiótico, en verde el promotor y en rosa el cargo.

4.2.2. Establecimiento de las condiciones de electroporación

Una vez seleccionados los plásmidos, se estudió la fase de crecimiento y los tratamientos idóneos para la preparación de las células electrocompetentes. Para ello, se seleccionaron en la bibliografía protocolos de transformación para bacterias similares a Helios, como *B. subtilis* (Brigidi et al., 1990; Zhang et al.,

VI. RESULTADOS. Capitulo 1

2015), otras Gram positivas como *Rhodococcus* (Guevara et al., 2019) y algunas bacterias de uso común en el laboratorio como *E. coli* (Sambrook & Russell, 2001). Los parámetros estudiados y las condiciones con mejores resultados para cada caso se resumen en la [Tabla R1.8](#).

Tabla R1.8. Parámetros optimizados en la electroporación de *Exiguobacterium* sp. Helios.

Parámetro	Variantes	Mejor condición
Fase de crecimiento	Exponencial	Estacionaria
	Estacionaria	
Lavado del cultivo	Sacarosa 300 mM	Agua destilada estéril
	Glicerol 10%	
	Agua destilada estéril	
Concentración de ADN	10 ng, 0,5 µg, 1 µg, 2 µg	1 µg
Intensidad de electroporación	400 Ω, 25 µF, 2500 V	200 Ω, 25 µF, 2500V
	200 Ω, 25 µF, 2500 V	
	200 Ω, 25 µF, 2000 V	
Uso de estabilizadores osmóticos y sales	Tampón PEB	Glicerol 10%
	Sacarosa 300 mM	
	Glicerol 10%	
	Tampón MSG	
Medio de recuperación	LB	LB
	LBSP	
	SOC	
Tiempo de recuperación	1 h, 2 h, 6 h	2h

Brigidi et al. (1990) describieron las condiciones que ofrecían una mayor eficacia para la transformación de *B. subtilis* PB1424 (cepa derivada de la cepa 168) por electroporación. Para ello, empleaban el tampón PEB (sacarosa 272 mM, MgCl₂ 1 mM, fosfato potásico 7 mM (pH 7,4)) para lavar los cultivos obtenidos a

una $DO_{600} = 0,6$. En este trabajo, determinan que la eficiencia de transformación es 10 veces mejor utilizando el tampón PEB que otro similar que contiene HEPES en lugar de fosfato potásico. También comprueban que las condiciones de electroporación con las que obtienen mayor eficiencia son 200Ω , $25 \mu\text{F}$ y 6250 V , empleando $0,5 \mu\text{g}$ de ADN. Por limitaciones técnicas no se pudo probar el voltaje que proponía el artículo, por lo que se utilizó el máximo voltaje que permite el electroporador utilizado (2500 V).

Siguiendo estas pautas se prepararon células electrocompetentes de *Exiguobacterium* sp. Helios y se electroporaron con cada uno de los plásmidos seleccionados en el apartado anterior. Como resultado de esta prueba no se obtuvo ningún transformante para ninguno de los plásmidos probados. Los controles de electroporación fueron positivos, con una supervivencia de $\sim 10^3 \text{ UFC} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de ADN, por lo que el tampón PEB no es perjudicial para las células, pero tampoco mejora el proceso de electroporación.

En el caso del protocolo de electroporación para *B. subtilis* ZK8, Zhang et al. (2015) proponen utilizar el medio de cultivo LBSP (medio LB suplementado con sorbitol $0,5 \text{ M}$, $\text{K}_2\text{H}_2\text{O}_4$ $0,05 \text{ M}$, KH_2O_4 $0,05 \text{ M}$). Además, proponen recoger las células en la fase exponencial de la curva de crecimiento, en torno a una $DO_{600\text{nm}} = 0,7-1,0$ (habitualmente $DO_{600\text{nm}} = 0,85$) y someterlas a un tratamiento debilitador de la pared celular de 1 h con una mezcla de glicina al $0,75\%$, treonina al 1% y Tween 80 al $0,07\%$, y utilizar el tampón de electroporación MSG (sorbitol $0,5 \text{ M}$, manitol $0,5 \text{ M}$ y glicerol al 10%). Para el pulso eléctrico comprobaron que las condiciones óptimas fueron $20 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, (200Ω , $25 \mu\text{F}$, 2000 V) y para la recuperación emplearon el medio LBMS (medio LB suplementado con manitol $0,5 \text{ M}$ y sorbitol $0,5 \text{ M}$).

Primero se comprobó que *Exiguobacterium* sp. Helios era capaz de crecer en los medios de cultivo LBSP y de recuperación LBMS, y también se comparó el crecimiento con controles crecidos en LB. Por lo tanto, se hizo un seguimiento del crecimiento de Helios en cultivos líquidos con medio LB, LBSP y LBMS, y se observó que el cultivo alcanzaba densidades ópticas algo más bajas en medio LBSP, y que en medio LBMS no era capaz de crecer (Figura R1.21). Por este motivo

VI. RESULTADOS. Capitulo 1

se descartó el medio LBMS como medio de recuperación, pero se probó el medio LBSP como medio de crecimiento para células electrocompetentes. Sin embargo, ni el medio de cultivo LBSP, ni el uso del tratamiento debilitador, ni el tampón de electroporación MSG ofrecieron resultados positivos, ya que la viabilidad de las células descendió hasta casi no tener células viables antes de la electroporación.

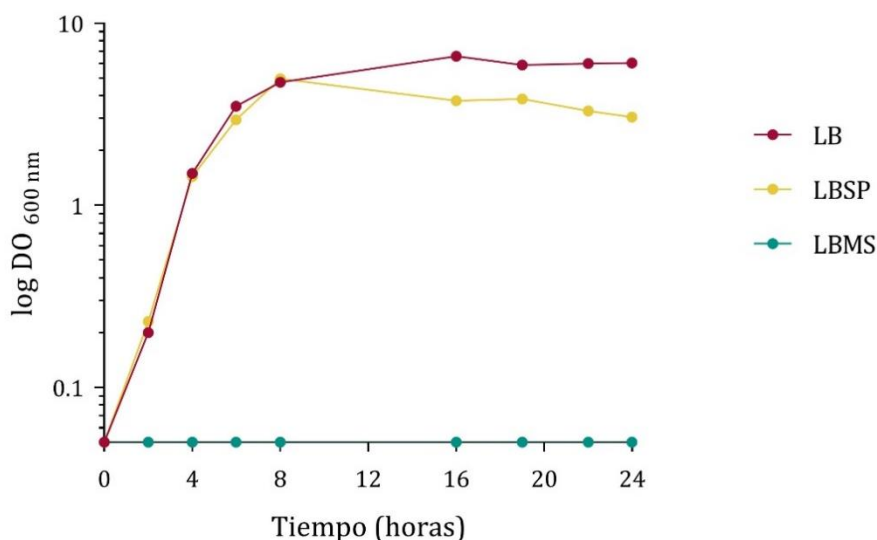


Figura R1.21. Crecimiento de *Exiguobacterium sp Helios* en los medios de crecimiento y recuperación propuestos por (Zhang et al., 2015).

Dado que el protocolo optimizado para *B. subtilis* no dio buen resultado, se decidió probar con los protocolos de electroporación empleados para *P. putida* o *E. coli* (Sambrook & Russell, 2001). Para ello, se lavó varias veces un cultivo de LB de 20 mL en fase exponencial ($DO_{600nm}=0,6$) o en fase estacionaria ($DO_{600nm}=6$) de *Exiguobacterium sp. Helios* con una solución fría de sacarosa 300 mM, una de glicerol al 10% o agua destilada estéril. Para la transformación se utilizaron 0,5, 1 o 2 μ g de ADN y se fijaron los parámetros de electroporación que suelen emplearse para *E. coli* (200 Ω , 25 μ F, 2500 V). Como medio de recuperación se emplearon medio LB o medio SOC, y se recuperaron las células al transcurrir 1 h, 2 h, o 6 h.

En esta ocasión se obtuvieron colonias tras la electroporación tanto en el caso del glicerol al 10% como en el caso del agua destilada estéril, para los plásmidos pRCR12 (Figura R1.22) y pSEVA3b67Rb, al recuperarlas en medio LB (ninguna colonia apareció en las transformaciones recuperadas en medio SOC). Se

realizaron varios intentos con estas condiciones y el número de colonias obtenidas oscilaba entre 2 y 30 UFC· μg^{-1} de ADN. Tras varias pruebas se ajustó también la concentración óptima de cloranfenicol a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para ambos plásmidos, el pRCR12 y el pSEVA3b67Rb, se obtuvieron colonias de *Exiguobacterium* sp. Helios recombinantes que presentaban un fenotipo rojo o rosado, indicando que el gen *mrfp* se estaba expresando (Figura R1.22). Además, se comprobó que las células de *Exiguobacterium* sp. Helios transformadas con estos plásmidos podían observarse mediante microscopía de fluorescencia, como se muestra en la Figura R1.23 al visualizar los recombinantes del plásmido pSEVA3b67Rb.

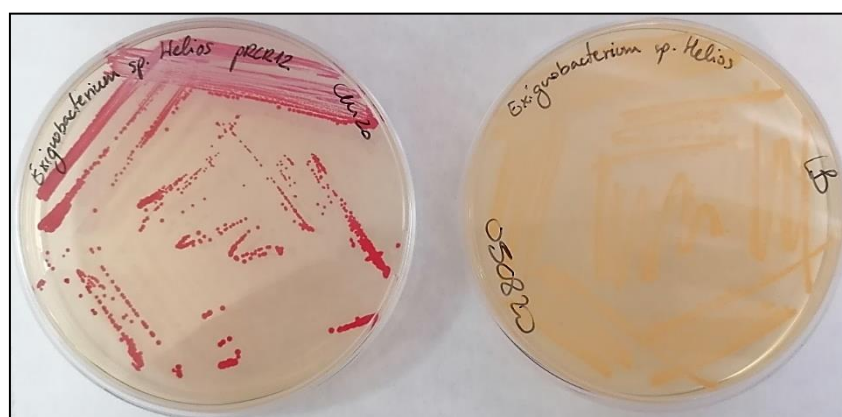


Figura R1.22. Transformación de *Exiguobacterium* sp. Helios con pRCR12. Cultivo en placa de LB+Cm20 de *Exiguobacterium* sp. Helios transformado con el plásmido pRCR12 expresando la proteína mCherry comparado con un cultivo de Helios sin plásmido (cepa silvestre) en placa de LB.

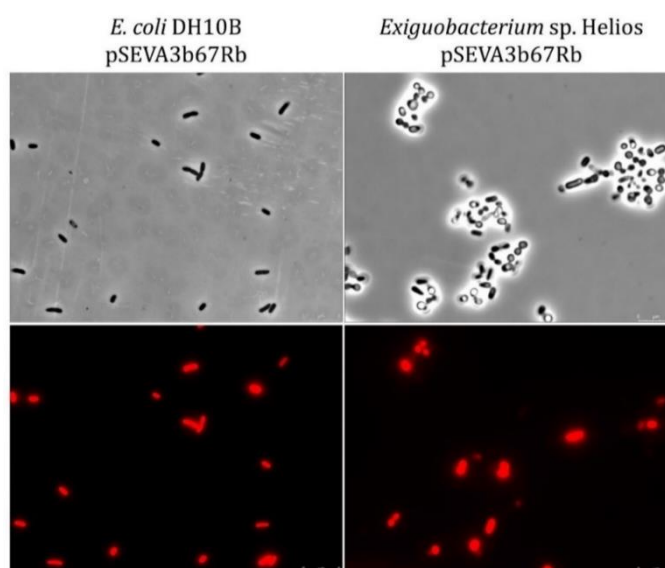


Figura R1.23. Transformación de *Exiguobacterium* sp. Helios con el vector pSEVA3b67Rb. Se observa al microscopio óptico por contraste de fases (arriba) y por

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

fluorescencia (abajo), cultivos de *E. coli* DH10B y *Exiguobacterium* sp. Helios transformados con el plásmido pSEVA3b7Rb expresando la proteína mRFP1.

4.2.3. Desarrollo de un protocolo de modificación cromosómica

Tras establecer las mejores condiciones de electroporación para *Exiguobacterium* sp. Helios con vectores de expresión, se planteó como siguiente objetivo conseguir un protocolo de inserción o delección de genes. Para ello, se siguieron dos estrategias: i) la construcción de plásmidos modulares SEVA *siblings* siguiendo el modelo planteado para *Bacillus subtilis* (Radeck et al., 2017) y ii) la síntesis de un vector basado en el plásmido pK18mob que permitiese realizar primero una prueba de concepto de integración génica en el cromosoma y que a su vez sirviese para insertar genes de interés en nuestra cepa.

4.2.3.1. SEVA *siblings*

Los “*Bacillus SEVA siblings*” son un conjunto de herramientas de clonaje desarrollados para *B. subtilis* basados en la tecnología Golden Gate (Radeck et al., 2017) que ofrecen una librería de plásmidos. Utilizando esta tecnología, podemos construir un vector integrativo para la modificación genética de *Exiguobacterium* sp. Helios. Siguiendo el ejemplo descrito para *B. subtilis*, se diseñó un vector para la integración en el genoma en el gen de la α -amilasa de Helios (*HNY42_RS05345*, *amyS*), que no afecta al metabolismo primario y permite un sistema de selección basado en la pérdida de capacidad de degradación del almidón al interrumpir el gen por inserción.

El primer paso fue comprobar que el gen era funcional y que servía para la selección de los candidatos de inserción, por lo que se prepararon placas de LB suplementadas con un 1% de almidón, se inocularon con cultivo de *Exiguobacterium* sp. Helios con una concentración de 100-10² UFC·mL⁻¹ y se revelaron al día siguiente con Lugol. Al revelar las placas aparecía un halo alrededor de cada colonia que indicaba la capacidad de la cepa Helios para degradar el almidón y, por tanto, indicaba que el gen *amyS* era funcional (Figura R1.24).

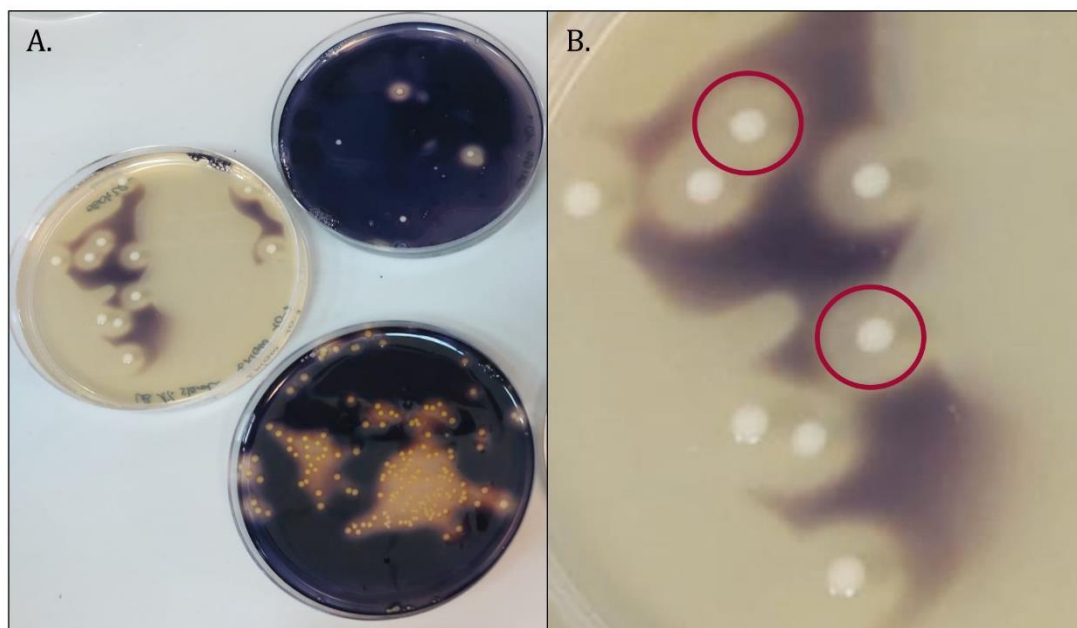


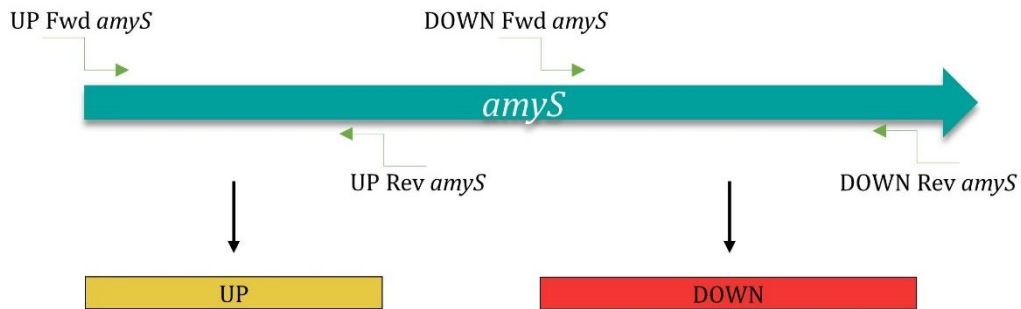
Figura R1.24. Ensayo de degradación de almidón. **A.** Placas de LB + almidón 1% con diferentes diluciones de cultivo de *Exiguobacterium* sp. Helios, reveladas con Lugol para revelar los halos donde el almidón ha sido degradado. **B.** Detalle del mismo ensayo en el que se observan claramente los halos alrededor de cada colonia.

Después de comprobar que el gen *amyS* sirve como sitio de inserción, se diseñaron las zonas de identidad que se incluirían en el vector final. Estas zonas son fragmentos de secuencia aguas arriba (*up*) y abajo (*down*) del gen *amyS*, que se amplificaron por PCR utilizando unos oligonucleótidos especialmente diseñados para su posterior ligación por Golden Gate con la enzima *BsaI* (Figura R1.25.A). Los productos de PCR fueron clonados como paso intermedio en un vector pTOPO para favorecer la digestión de los fragmentos.

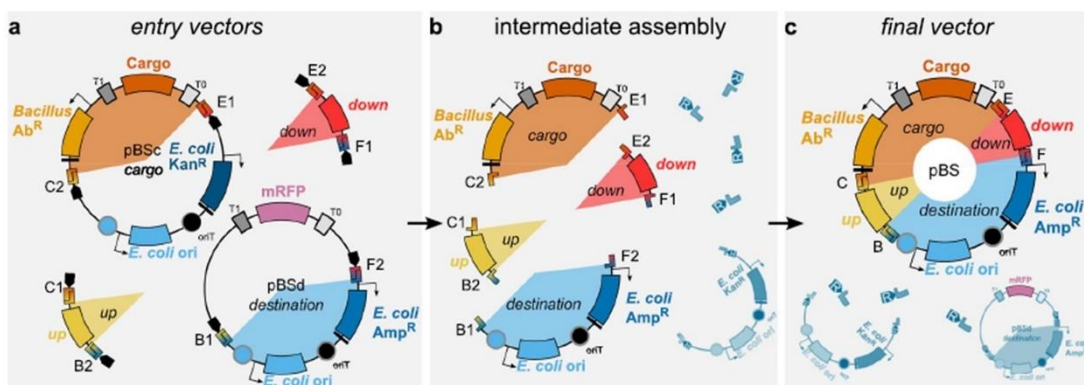
Por último, se seleccionaron los plásmidos de entrada que iban a servir de base para el vector final. Para ello, se necesitaba un vector “carga”, que incluía el módulo de integración (resistencia a antibiótico para la cepa Helios), y un vector “de destino”, que incluía la maquinaria de replicación y resistencia de antibiótico para *E. coli*; en este caso, se eligieron los vectores pBSc243C (*lacZ* α^* -pUC18 MCS, *catR*) y pBSd141R (*mRFP1*, *ampR*, *ori* pRO1600/ColE1) (Figura R1.25.B).

VI. RESULTADOS. Capítulo 1

A.



B.



C.

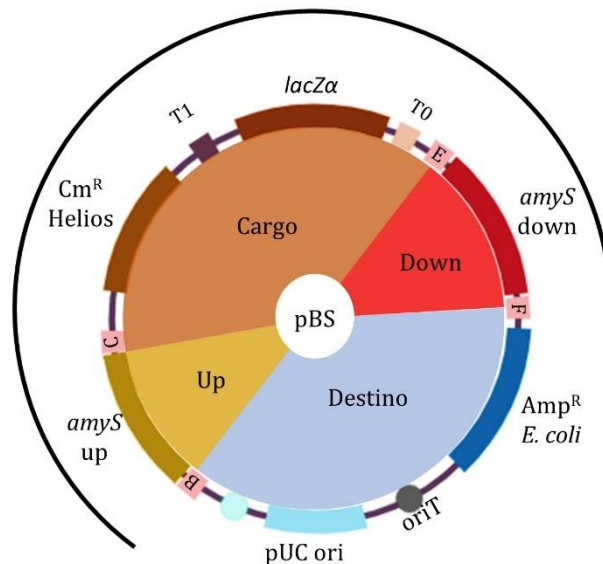


Figura R1.25. Construcción del vector pBS para la integración en el gen *amyS* de *Exiguobacterium* sp. Helios. A. Amplificación de los fragmentos de homología para la inserción en el gen *amyS* de *Exiguobacterium* sp. Helios. **B.** Esquema general extraído de Radeck et al., 2017, que muestra el ensamblaje por Golden Gate. **C.** Vector final pBS143amyS diseñado para *Exiguobacterium* sp. Helios. Se indica con una línea negra el módulo de integración del vector.

Como resultado de la reacción se esperaba obtener un vector final, denominado pBS143amyS, que contenía la maquinaria de replicación y resistencia a antibiótico para *E. coli*, zonas de homología para el gen *amyS*, resistencia a antibiótico para Helios y un cargo, que en este caso es el gen *lacZ α* (Figura R1.25.C). Tras la transformación y selección en placas de LB con ampicilina, se obtuvieron colonias de *E. coli* DH5 α azules (83%), rojas (15%) y blancas (2%) (Figura R1.26.A). Las colonias blancas y rojas se descartaron por ser religados de los vectores de entrada, y se seleccionaron las colonias azules que debían contener el vector final correcto. Se comprobó por PCR que el módulo de integración estuviese completo utilizando los oligonucleótidos que sugieren en la publicación (TM3782 y TM3783) (Figura R1.26.B) y se confirmó por secuenciación.

Una vez conseguida la construcción deseada, se realizaron varios intentos de transformación en *Exiguobacterium* sp. Helios, siguiendo el protocolo de electroporación establecido en el apartado de Resultados 4.2.2. Para ello se siguió la recomendación del artículo de Radeck et al. (2017) y se linealizó el plásmido por digestión con la enzima *ApaI* como paso previo a la electroporación. Se probó la transformación con la forma linealizada y la forma circular del vector pBS143amyS, pero ninguna dio resultados positivos. Esto puede deberse a la baja eficiencia del protocolo de electroporación o a que no se esté produciendo la recombinación en el cromosoma.

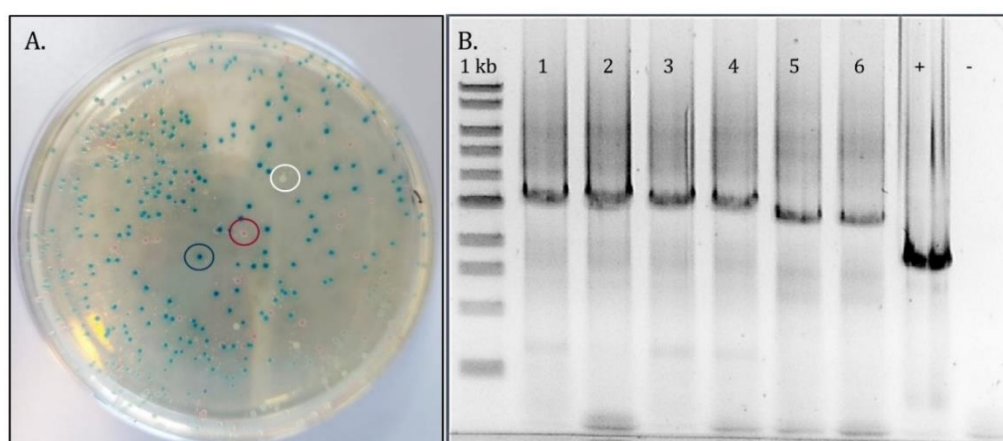


Figura R1.26. Selección de candidatos positivos para el vector pBS143amyS. A. Fotografía de las colonias obtenidas tras la transformación en *E. coli* DH5 α . **B.** Gel de agarosa de la PCR de comprobación de 6 de las colonias candidatas, con un control positivo (pBSd141R) y un control negativo (sin plásmido).

4.2.3.2. Vector pK18mob

Con el objetivo de realizar otra prueba de concepto de integración génica en el cromosoma, se diseñó un vector basado en el plásmido pK18mob con zonas de homología para la integración en el mismo gen *amyS* de *Exiguobacterium sp. Helios* empleado anteriormente. Estas zonas de homología flanqueaban el gen *mrfp* y el sitio de clonaje múltiple del vector pSEVA3b7Rb (Figura R1.27), con el que ya se habían conseguido resultados positivos, de forma que se pudiese seguir fácilmente su integración a la vez que sirviese para insertar genes de interés en nuestra cepa.

Para esta nueva construcción se optó por la síntesis del plásmido por parte de la empresa GenScript, tanto para evitar errores en la ejecución como para agilizar el clonaje. La transformación en Helios se llevó a cabo por electroporación, pero tras varios intentos no se consiguió ningún resultado positivo.

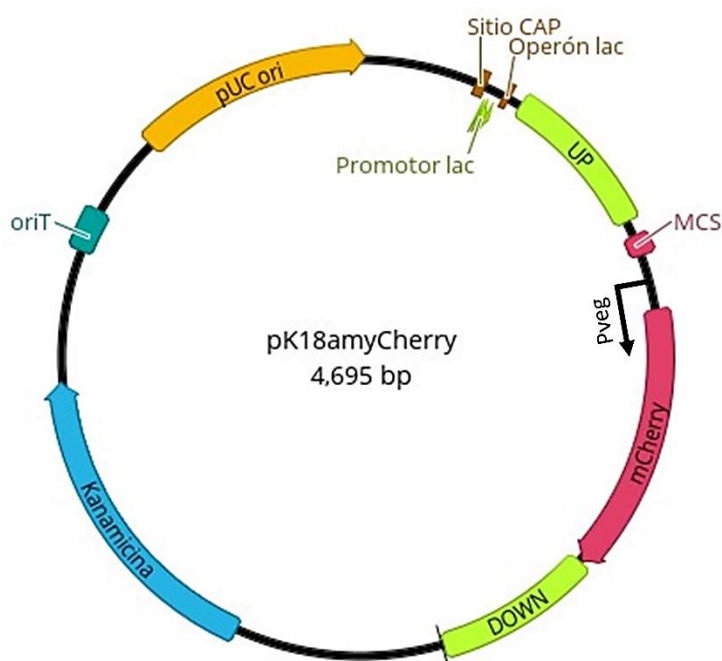


Figura R1.27. Construcción del vector pK18amyCherry para la integración en el gen *amyS* de *Exiguobacterium sp. Helios*. Se indican en verde las zonas de homología aguas arriba (*up*) y abajo (*down*) del gen *amyS*, en rosa el cargo (MCS y mCherry), en azul el gen de resistencia a antibiótico (kanamicina) y en naranja el origen de replicación (pUC). P_{veg} : promotor procedente de *B. subtilis*.

4.3. Transformación génica mediante conjugación

Una vez visto que los resultados obtenidos para la transformación por electroporación eran buenos pero mejorables (ver sección 4.2.2), se trató de abordar la transformación por conjugación biparental (sin que sea necesaria cepa auxiliar). Para ello se emplearon dos cepas donadoras de *E. coli* S17 λ pir (que tiene funciones de transferencia conyugal integradas cromosómicamente) y MDF λ pir (que es igual que la S17, pero presenta una auxotrofia para el ácido diaminopimélico, DAP, que facilita la selección).

Estas cepas contenían el vector de expresión pSEVA3b67Rb, ya que se conocía que funcionaba en *Exiguobacterium* sp. Helios y que expresaba la proteína RFP, lo cual sería de gran ayuda para su selección tras la conjugación. La cepa receptora siempre fue Helios, aunque se utilizó como variante una cepa de *Exiguobacterium* sp. Helios resistente a la rifampicina, para facilitar la selección.

Se emplearon cultivos de las cepas donadoras y receptoras en fase exponencial y estacionaria, se lavaron y concentraron con PBS y se incubaron en filtros de nitrocelulosa de 0,22 μ m colocados en placas de LB en una proporción 1:1 o/n a 30°C. Se resuspendieron estos filtros en 1 mL de PBS y se plaquearon en diferentes proporciones en placas de LB con el antibiótico o antibióticos de selección (cloranfenicol y/o rifampicina), y en su caso sin la suplementación de DAP.

Otra variante de este protocolo consistió en cultivar las cepas en medio mínimo con sacarosa, antibióticos y suplementos, y emplear medio mínimo también para la selección final.

Ninguna de las variantes de los protocolos de conjugación, que se recogen en la Tabla R1.9, dio resultado positivo.

Tabla R1.9. Parámetros testeados en la conjugación de *Exiguobacterium* sp. Helios.

Parámetro	Variantes
Fase de crecimiento	Exponencial Estacionaria
Lavado del cultivo	PBS
Medio de cultivo	LB M63+sacarosa
Cepa receptora	<i>Exiguobacterium</i> sp. Helios <i>Exiguobacterium</i> sp. Helios Rif ^R
Cepa donadora	<i>E. coli</i> S17λpir <i>E. coli</i> MDFλpir
Vector	pSEVA3b67Rb
Medio de recuperación	LB+Cm LB+Cm+Rif LB+Cm+Rif+DAP M63+sacarosa+Cm

4.4. Transformación génica mediante competencia natural

4.4.1. Identificación de genes de competencia natural

Empleando como referencia los genes de *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (*B. subtilis* 168), se detectó en *Exiguobacterium* sp. Helios la existencia de genes con alta identidad que podrían conformar una maquinaria de recepción de ADN completa, lo que sugiere que esta cepa podría tener la capacidad de adquirir ADN exógeno del medio. Estos genes de competencia no se encuentran formando un clúster, sino que están dispersos a lo largo del cromosoma (Tabla R1.10).

La región *HNY42_RS05970-HNY42_RS05985* codifica proteínas homólogas a ComGC conocidas por formar pseudopilinas responsables de la unión a ADN exógeno de cadena doble y algunas proteínas adicionales necesarias para internalización de ADN en Firmicutes, como ComGA y ComGB. *HNY42_RS05435* y

HNY42_RS05440 codifican proteínas homólogas a ComEA y ComEC. En microorganismos Gram positivos, ComEA entrega el ADN de cadena doble a una proteína que genera ADN de cadena simple, presuntamente una helicasa/nucleasa AddAB, antes de su internalización a través de un poro transmembrana formado por ComEC.

Tabla R1.10. Genes de *Exiguobacterium* sp. Helios hipotéticamente involucrados en competencia. Se muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos (% aa).

Gen	Locus (HNY42_)	Función definida en <i>B. subtilis</i> 168	% aa	Nº acceso
<i>clcC/mecB</i>	<i>RS01815</i>	Regulador negativo de competencia genética <i>clcC/mecB</i>	80,62	P37571.1
<i>comEC</i>	<i>RS05440</i>	Proteína de competencia relacionada con internalización de ADN ComEC/Rec2	28,05	P39695.2
<i>comK</i>	<i>RS05215</i> <i>RS13920</i>	Factor de transcripción de competencia	24,84 27,70	P40396.1
<i>addABb</i>	<i>RS05235</i>	Helicasa/nucleasa ATP-dependiente AddAB, subunidad B	36,23	P23477.2
<i>addABa</i>	<i>RS05240</i>	Helicasa/nucleasa ATP-dependiente AddAB, subunidad A	40,87	P23478.2
<i>comEA</i>	<i>RS05435</i>	Proteína de competencia tardía ComEA, receptor de ADN	37,44	P39694.1
<i>comGA</i>	<i>RS05970</i>	Proteína de competencia tardía ComGA, acceso del ADN a ComEA	30,68	P25953.2
<i>comGB</i>	<i>RS05975</i>	Proteína de competencia tardía ComGB, acceso del ADN a ComEA	ND	
<i>comGC</i>	<i>RS05980</i>	Proteína de competencia tardía ComGC, acceso del ADN a ComEA	ND	
<i>mecA1</i>	<i>RS12035</i>	Adaptador proteína MecA 1	42,67	P37958.1
<i>mecA2</i>	<i>RS10860</i>	Adaptador proteína MecA 2	29,29	P50734.1
<i>coiA</i>	<i>RS12020</i>	Proteína de competencia CoiA	ND	
<i>yhgH</i>	<i>RS14090</i>	Proteína de competencia F. Proteína YhgH requerida para la utilización del ADN como fuente de carbono y energía	32,61	P39147.1
<i>comF</i>	<i>RS14095</i>	Proteína A del operón ComF, transportador de ADN ATPasa.	41,42	P39145.1
<i>cinA</i>	<i>RS06685</i>	Proteína de competencia A inducible por daño	46,68	P46323.3

Los genes *HNY42_RS05235* y *HNY42_RS05240* codifican las proteínas homólogas putativas AddAB. La internalización del ADN de cadena simple se conduce presumiblemente por la translocasa ATP-dependiente ComFA (codificada por *HNY42_RS14095*). La proteína homóloga RecA que polimeriza en ADN de cadena simple y promueve una búsqueda de homología a lo largo del cromosoma está codificada por el gen *HNY42_RS06690*. Además, hay dos genes, *HNY42_RS05215* y *HNY42_RS13920*, codificantes del regulador ComK responsable de activar la expresión de los genes involucrados en la competencia natural en *B. subtilis*. Por último, el gen *HNY42_RS15810* del plásmido pMCEX codifica una proteína ComEC que podría estar involucrada en competencia natural tardía.

4.4.2. Establecimiento de las condiciones de competencia natural

Teniendo en cuenta la presencia de los genes de competencia en *Exiguobacterium* sp. Helios, se probaron las condiciones utilizadas en un protocolo diseñado para *B. subtilis* DB104 (Vojcic et al., 2012). En este trabajo se inocula una colonia en el medio SM1 (Tabla M5) durante 14/16 h a 37°C para posteriormente diluir el cultivo en 10 mL de SM1 a una $DO_{600nm} = 0,5$, y crecerlo durante 3 h a 37°C. Después añaden dos volúmenes de SM2 (Tabla M5) y se deja crecer durante otras 2 h. Estos medios mínimos con poca fuente de carbono y suplementados con $CaCl_2$ inducen la competencia natural por estrés. Se probaron estas condiciones para la cepa Helios incubando las células con 1 μg de ADN, pero no se obtuvo ninguna colonia positiva.

También se probó un protocolo diseñado para otra bacteria con competencia natural, *Thermus thermophilus* (Blesa & Berenguer, 2016). En este caso parten de un cultivo de $DO_{600nm} = 0,3-0,4$, y lo incuban con el ADN durante 4 h, sin necesidad de medios mínimos que provoquen estrés en las células. Pese a la sencillez del protocolo éste tampoco dio ningún resultado positivo.

CAPÍTULO 2

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE CONFIEREN
XEROTOLERANCIA A LA BACTERIA
EXIGUOBACTERIUM SP. HELIOS MEDIANTE
ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y TRANSCRIPTÓMICOS**

1. Resistencia a desecación o xerotolerancia

Con el objetivo de dilucidar si la xerotolerancia era una característica exclusiva de la cepa Helios o si por el contrario se extendía a todo el género, se realizó un ensayo de resistencia a la desecación comparando varias especies de *Exiguobacterium*, incluyendo representantes de los dos clados. Además, se pretendía descubrir si la fase de crecimiento en la que se encontraban las células antes de la desecación era determinante para su supervivencia a la deshidratación, por lo que se emplearon células obtenidas de cultivos en fase exponencial temprana y estacionaria, y se compararon los resultados.

En este estudio se pudo observar claramente que existe una gran diferencia en la resistencia de todas las especies analizadas entre la fase exponencial (Figura R2.1.A), donde en ningún caso supera el 10%, y la fase estacionaria (Figura R2.1.B), en la que algunas alcanzan casi el 70% de supervivencia, lo que sugiere que deben existir diferencias genéticas y fisiológicas que provocan el aumento de xerotolerancia al alcanzar la fase estacionaria.

También se pudo observar, especialmente en la fase estacionaria, una gran diferencia entre la supervivencia de las especies pertenecientes al Clado I, *Exiguobacterium* sp. Helios, *E. sibiricum* y *E. antarcticum*, y el resto de las especies pertenecientes al Clado II. En estas condiciones, Helios presenta una xerotolerancia mayor que la que se observa en *E. sibiricum*, que a su vez es mayor que la de *E. antarcticum* (Figura R2.1.B).

Dado que previamente se ha descrito una elevada resistencia a condiciones de baja actividad de agua de *E. sibiricum* a baja temperatura (Ponder et al., 2008), se propuso estudiar la xerotolerancia del género *Exiguobacterium* a 4°C. Para ello, primero se realizaron curvas de crecimiento para todas las especies testadas y se establecieron los puntos que serían considerados fase exponencial y fase estacionaria. En la Figura R2.2 se pueden ver las curvas de crecimiento a 30°C (A) y a 4°C (B) de todas las cepas de estudio. Las cepas del Clado II crecen a baja temperatura, pero no alcanzan densidades ópticas muy altas, mientras que las cepas del Clado I llegan a una DO_{600nm} muy parecida a la que consiguen a 30°C.

VI. RESULTADOS. Capitulo 2

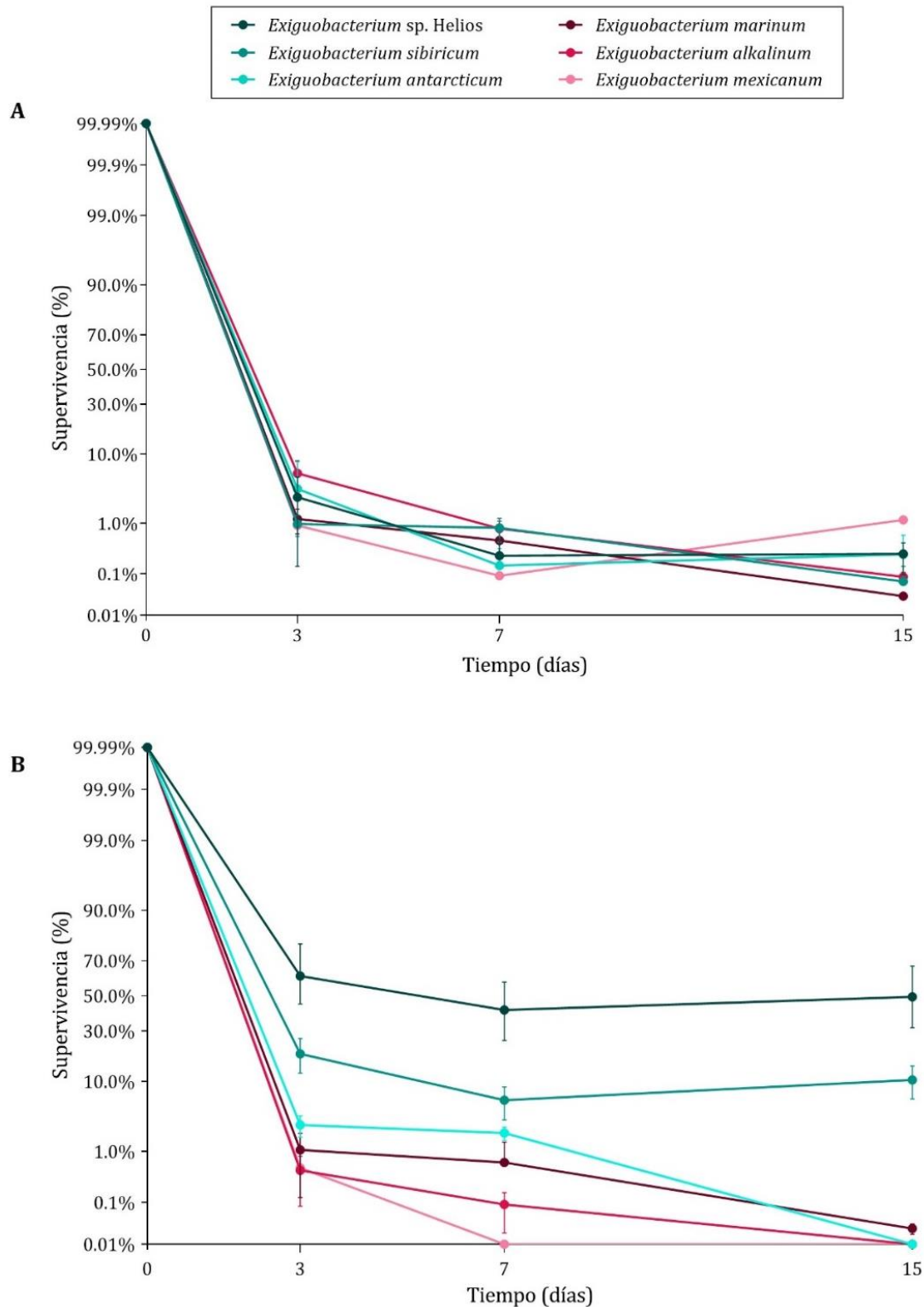


Figura R2.1. Resistencia a la desecación. Porcentaje de supervivencia al ensayo de xerotolerancia realizado con células crecidas a 30°C en LB y recogidas en fase exponencial (A) o fase estacionaria (B). Las cepas estudiadas fueron *Exiguobacterium sp. Helios*, *E. sibiricum* y *E. antarcticum* (Clado I, azul) y *E. marinum*, *E. alkaliphilum* y *E. mexicanum* (Clado II, morado). Las gráficas presentan el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

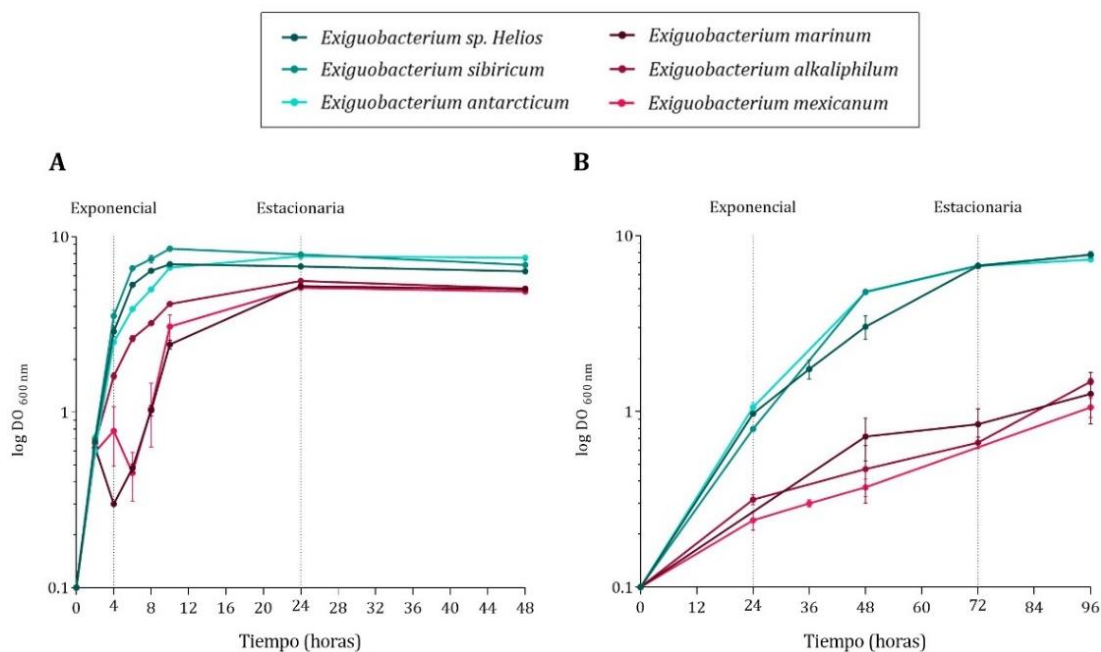


Figura R2.2. Curvas de crecimiento de varias cepas del género *Exiguobacterium*. Los cultivos se realizaron en LB a 30°C (A) y a 4°C (B). Las cepas estudiadas fueron *Exiguobacterium sp. Helios*, *E. sibiricum* y *E. antarcticum* (Clado I, azul) y *E. marinum*, *E. alkaliphilum* y *E. mexicanum* (Clado II, morado). Las gráficas presentan el promedio de la $DO_{600\text{nm}}$ correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

Tras el ensayo de xerotolerancia para los cultivos a baja temperatura lo primero que se observó es que las cepas del Clado II no mejoran su tolerancia, sino que, en algunos casos como el de *E. alkaliphilum* o *E. marinum*, empeora (Figura R2.3). Sin embargo, sí que se observa que las cepas del Clado I tienen una supervivencia mucho más elevada, destacando *E. sibiricum* y *Helios*, que han pasado de una supervivencia de menos del 10% cuando se cultivan a 30°C a un 50-90% a 4°C cuando se desecan en la fase exponencial (A) e incluso a llegar al 100% de supervivencia a los 7 días de desecación cuando se desecan en la fase estacionaria (B).

VI. RESULTADOS. Capitulo 2

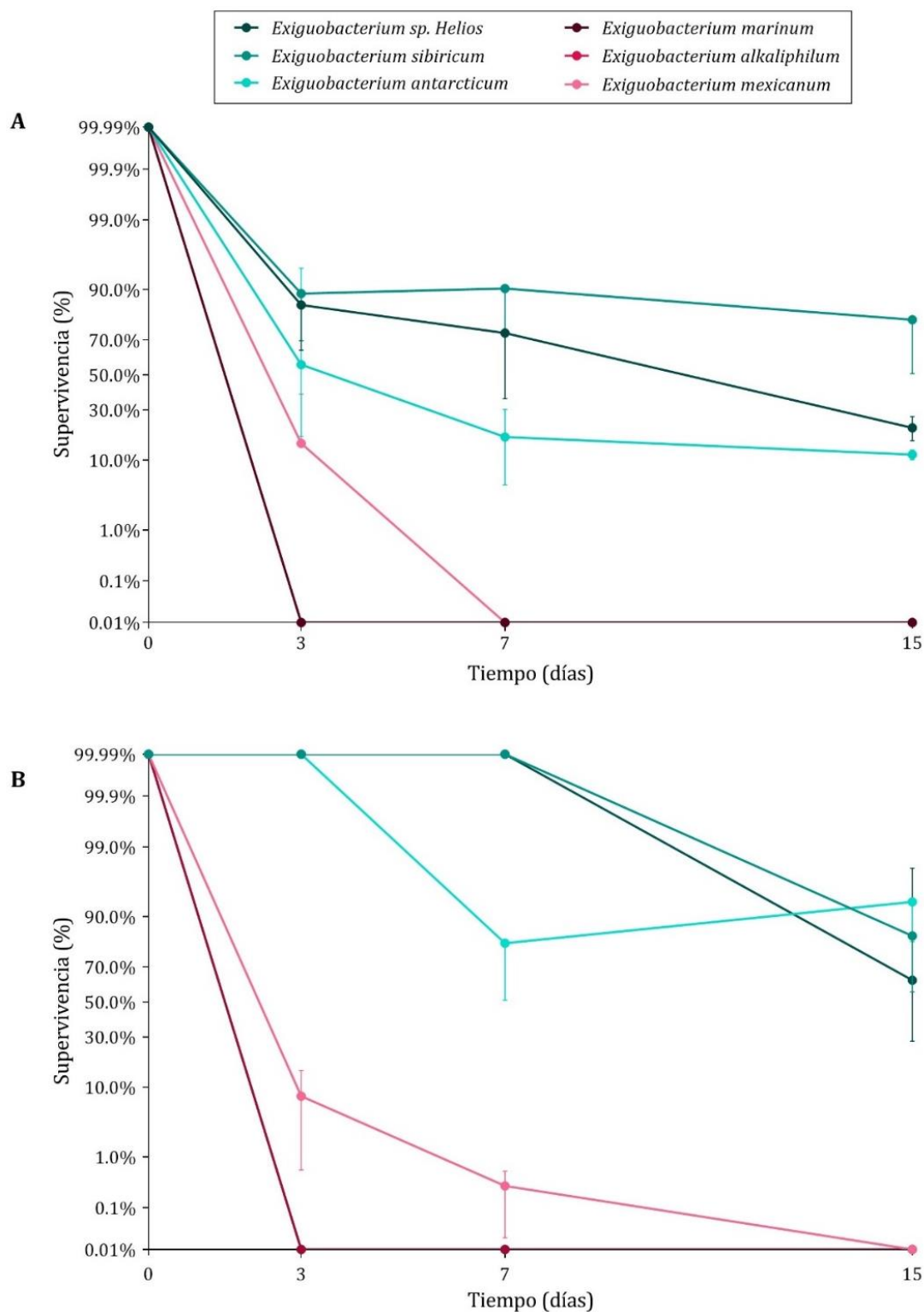


Figura R2.3. Resistencia a la desecación a baja temperatura. Porcentaje de supervivencia al ensayo de xerotolerancia realizado con células crecidas a 4°C en LB y recogidas en fase exponencial (A) o fase estacionaria (B). Las cepas estudiadas fueron *Exiguobacterium sp. Helios*, *E. sibiricum* y *E. antarcticum* (Clado I, azul) y *E. marinum*, *E. alkaliphilum* y *E. mexicanum* (Clado II, morado). Las gráficas presentan el promedio de tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

2. Estudio de la morfología de *Exiguobacterium* sp. Helios

Con el objetivo de determinar por qué algunas cepas de *Exiguobacterium*, especialmente Helios, presentan una mayor xerotolerancia en su fase estacionaria, se realizó un estudio de su morfología mediante diferentes técnicas de microscopía.

Cuando se analiza por microscopía de contraste de fases la cepa *Exiguobacterium* sp. Helios mostró diferentes fenotipos dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encontrase. Al cultivar las células a 30°C, se observó que en fase exponencial las células presentaban una morfología bacilar, mientras que en la fase estacionaria la mayoría de las células se habían transformado en cocos. Este mismo fenómeno se podía observar al cultivar las células a 4°C, con la diferencia de que las células cultivadas a baja temperatura ya presentan una forma más cercana a la cocoide (Figura R2.4).

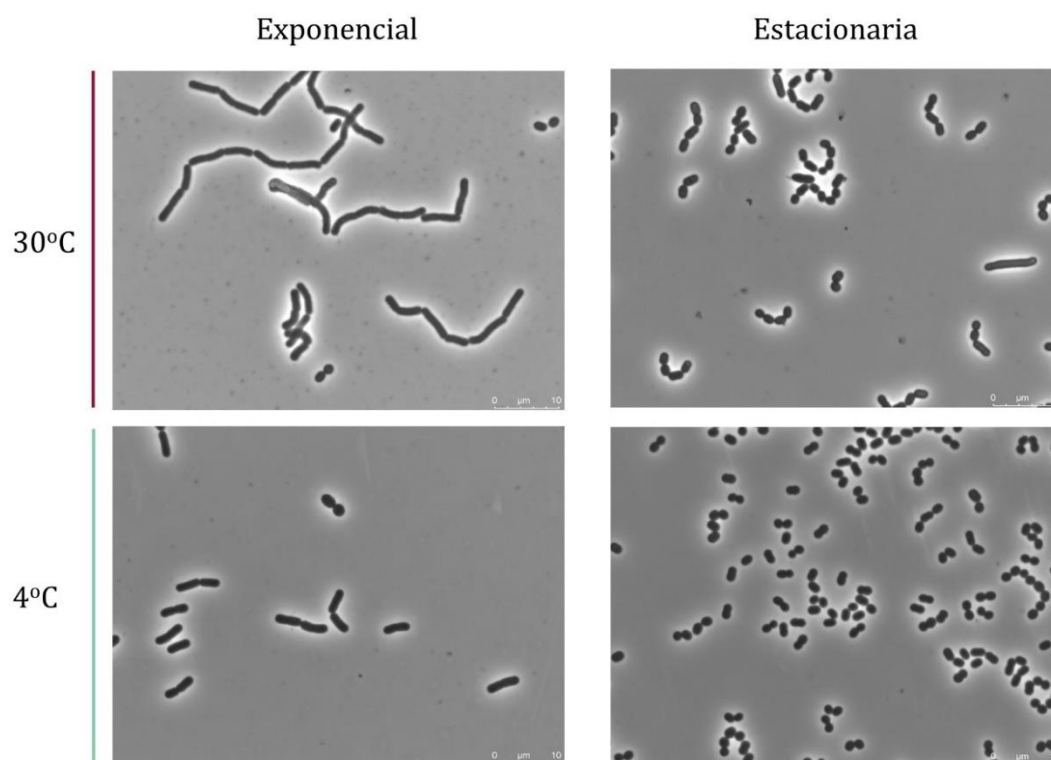


Figura R2.4. Diferencias morfológicas al modificar las condiciones de crecimiento en *Exiguobacterium* sp. Helios. Las células se cultivaron en LB a 4°C o a 30°C, hasta fase exponencial o fase estacionaria, y fueron fotografiadas mediante microscopía de contraste de fases (100x).

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

Además, se pudo determinar que existía una diferencia en la longitud de las células entre la fase exponencial (con una media de 3,59 o 2,97 μm , a 30°C o a 4°C respectivamente) y la fase estacionaria (con una media de 1,74 o 1,78 μm , a 30°C o a 4°C respectivamente), aunque la forma final que adquirirían las células en fase estacionaria era muy similar, independientemente de la temperatura a la que se creciese el cultivo (Figura R2.5).

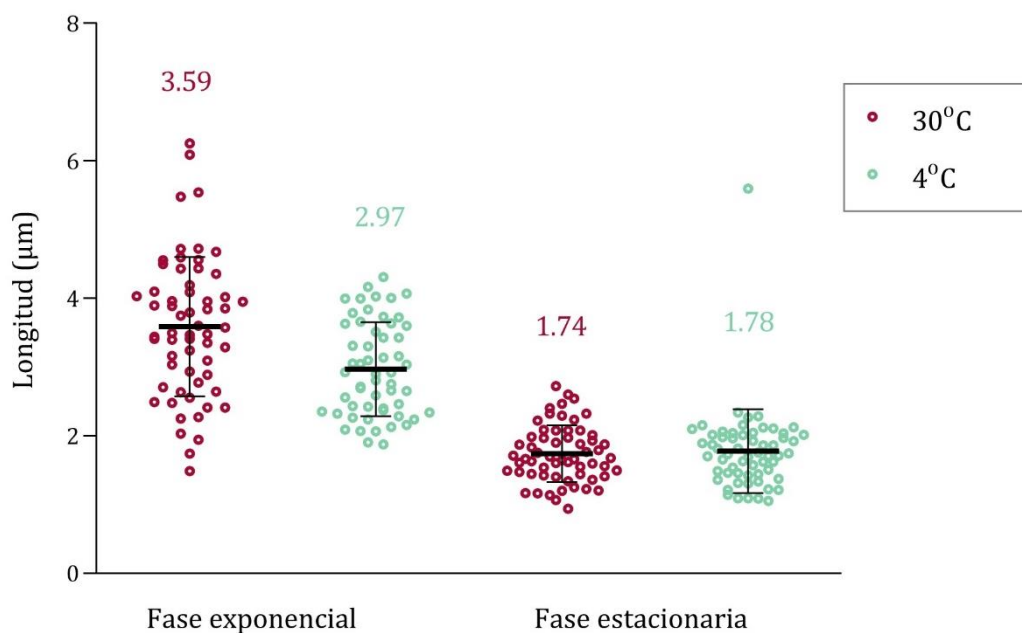


Figura R2.5. Longitud de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios en diferentes condiciones de crecimiento. La longitud fue cuantificada con *ImageJ*. Se representa en un gráfico de dispersión la media y la desviación estándar de N=60 células para cada condición.

Se observaron también por microscopía de contraste de fases otras especies de *Exiguobacterium* para determinar si este fenómeno se extendía a lo largo de todo el género y para ver si podía existir una relación entre estos cambios en la morfología y su xerotolerancia. En el caso de *E. sibiricum* y *E. antarcticum* se observaron unos cambios morfológicos similares a los registrados en Helios, tanto a 30°C como a baja temperatura, que pueden explicar su alta xerotolerancia, especialmente en la fase estacionaria donde sus células se han transformado en su mayoría en cocos (Figura R2.6). En el caso de las cepas pertenecientes al Clado II,

también se ve un cambio morfológico similar en los cultivos crecidos a 30°C, no tanto en los cultivos a 4°C, en los que tienen dificultades para alcanzar densidades ópticas altas y no presentan xerotolerancia. Todo esto sugiere que la presencia de esta morfología cocoide, podría representar una forma de resistencia, que es clave para explicar la xerotolerancia y puede que también sirva para explicar otras propiedades extremófilas de este tipo de bacterias.

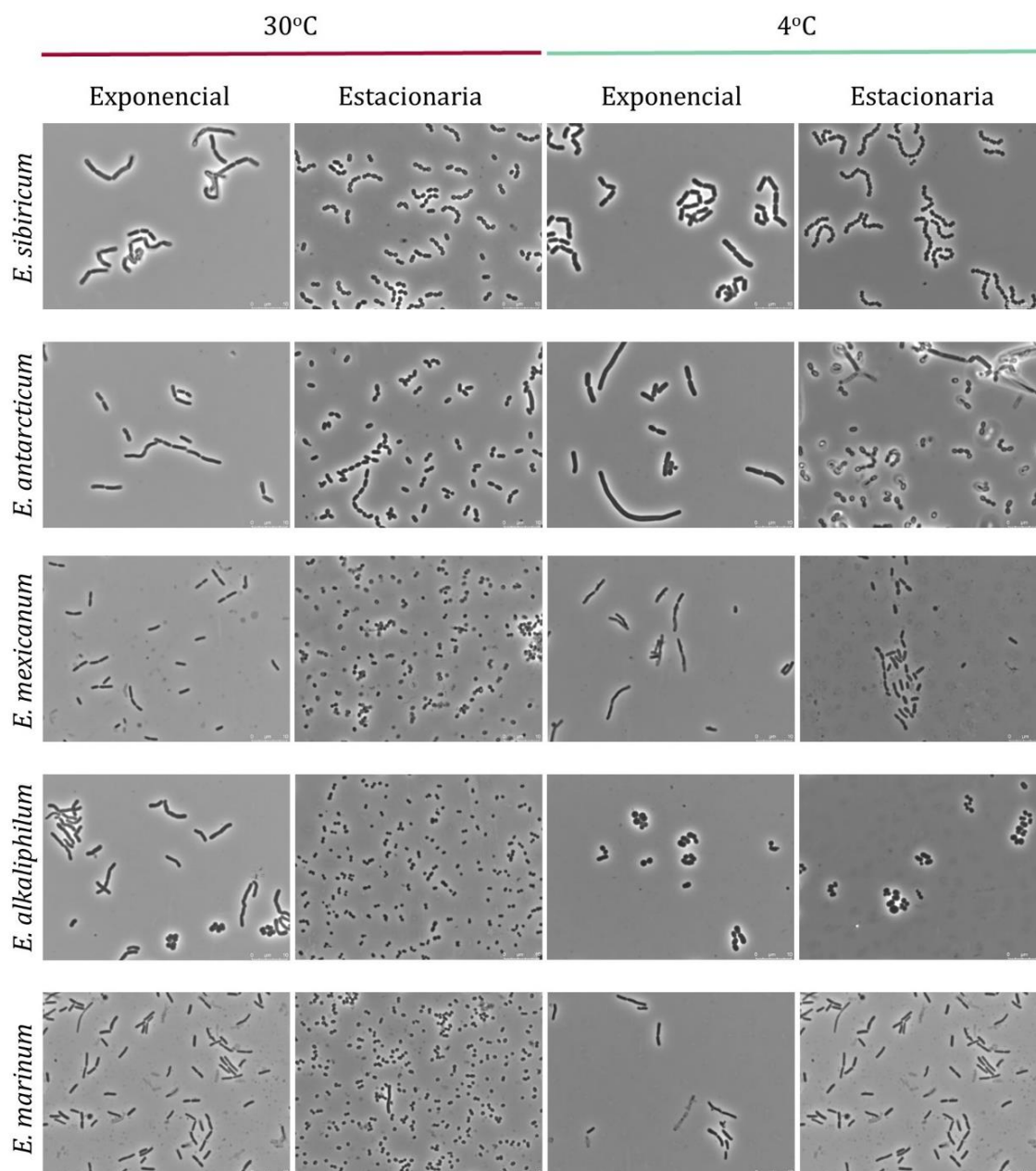


Figura R2.6. Diferencias morfológicas al modificar las condiciones de cultivo en varias especies del género *Exiguobacterium*. Las células se cultivaron en LB a 4°C o a 30°C, hasta fase exponencial o fase estacionaria, y fueron fotografiadas mediante microscopía de contraste de fases (100x).

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

Para caracterizar más en detalle estas formas de resistencia observamos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestras de *Exiguobacterium* sp. Helios en diferentes puntos de su curva de crecimiento a 30°C (Figura R2.7) y a 4°C (Figura R2.8), antes y después de la desecación. Las imágenes mostraron un gran número de células cocoides en la fase estacionaria, como veníamos observando, cuya envuelta celular era extraordinariamente más gruesa que la de las células bacilares. Este fenotipo ya se había observado previamente en *E. sibiricum* 255-15 al cultivar las células a 4°C y elevada salinidad (Ponder et al., 2008).

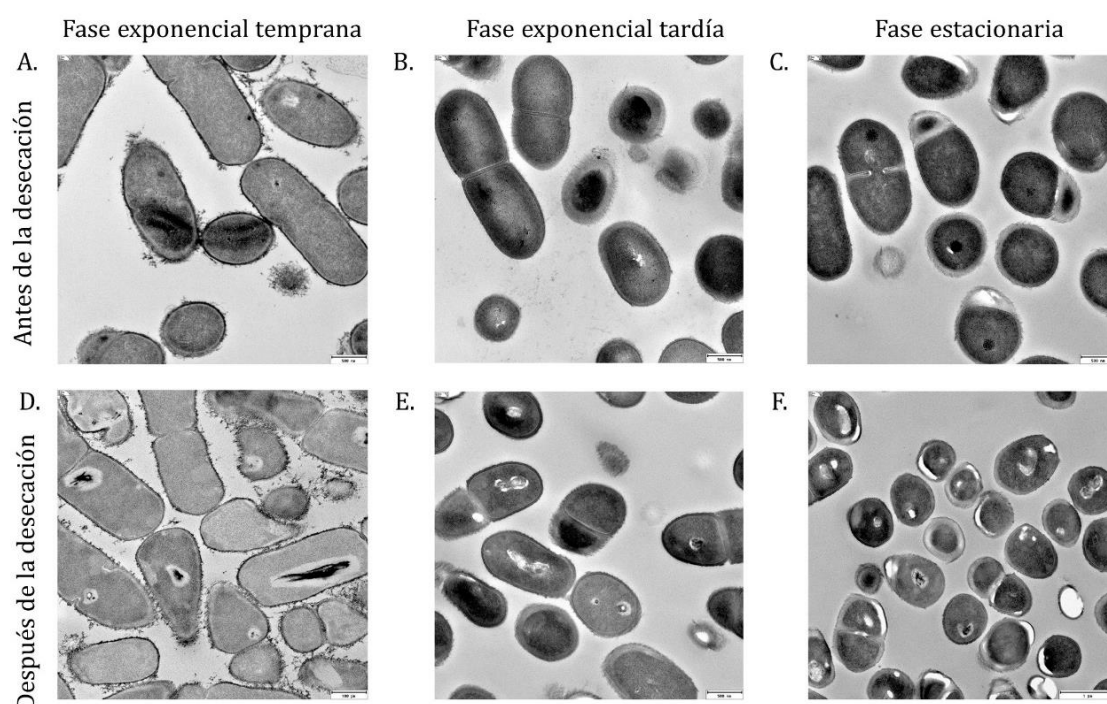


Figura R2.7. Células de *Exiguobacterium* sp. Helios cultivadas a 30°C observadas por TEM. Se observan células de cultivos en fase exponencial temprana antes (a) y después (d) de la desecación, en fase exponencial tardía antes (b) y después (e) de la desecación, y en fase estacionaria antes (c) y después (f) de la desecación (10000X).

La adquisición de este fenotipo podría ser necesario para la mejora de la xerotolerancia en las fases más tardías del crecimiento, ya que se observa que prácticamente todas las células que han sobrevivido a la desecación en fase estacionaria presentan este engrosamiento en la pared.

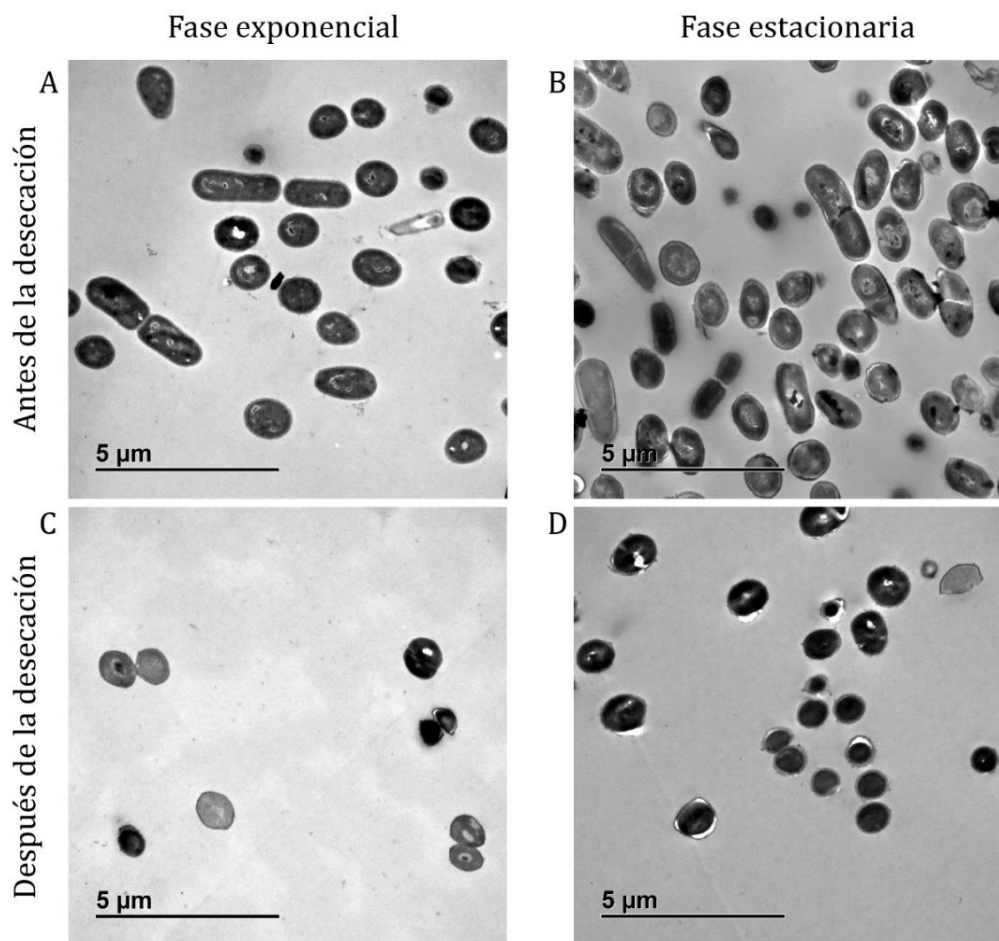


Figura R2.8. Células de *Exiguobacterium* sp. *Helios* cultivadas a 4°C observadas por TEM. Se observan células de cultivos en fase exponencial temprana antes (a) y después (c) de la desecación, y en fase estacionaria antes (b) y después (d) de la desecación (800X).

En el caso de las muestras a baja temperatura, se confirma que las células adquieren este fenotipo mucho antes en la curva de crecimiento, y se pueden observar estas células de pared engrosada desde la fase exponencial, lo que podría explicar la elevada xerotolerancia que presentan estas células (supervivencia en torno al 90-100%).

3. Estudio de las propiedades mecánicas de *Exiguobacterium sp. Helios*

3.1. Inmovilización de la muestra

Con el objetivo de estudiar las propiedades mecánicas de las células de *Exiguobacterium sp. Helios* se propuso analizarlas mediante AFM. El primer paso fue buscar un soporte adecuado en el que inmovilizarlas. Para ello, se probaron diferentes soportes como portaobjetos de vidrio o láminas de poliestireno, con o sin una capa de polilisina. También se realizaron pruebas con láminas de silicio, material muy similar al utilizado para la construcción de las células fotovoltaicas de las placas solares, donde se observó una gran adhesión de la muestra directamente a la superficie, sin necesidad de utilizar ningún compuesto adherente como la polilisina. Este soporte presentaba una gran ventaja, ya que su superficie era idónea como medida control en AFM, por lo que finalmente se optó por el silicio dopado P-Boro como sustrato.

Todas las muestras fueron lavadas con PBS, concentradas y depositadas en la superficie de silicio, donde se dejaron secar al menos 30 min, ya que con tiempos menores se observaba una gran pérdida de la biomasa, y posteriormente se lavaron con agua MilliQ y se secaron con nitrógeno. Como resultado de esta forma de secado se puede observar una región central con cúmulos enormes de bacterias y una región exterior con una distribución uniforme de bacterias, pero se evita la aparición de cristales sobre la superficie que no permitirían el análisis.

3.2. Medida de la rigidez de *Exiguobacterium sp. Helios*

Para medir la constante de fuerza o rigidez de las bacterias se realizaron mediciones mediante curvas de fuerza-distancia (F vs. D), siempre tomando como referencia la superficie del soporte de silicio, el cual se comporta como un material puramente rígido. La [Figura R2.9](#) muestra algunos ejemplos de estas medidas. Junto a un ejemplo de una imagen topográfica de AFM de bacterias *Exiguobacterium Helios* en fase exponencial ([Figura R2.9.A](#)) y otro en fase estacionaria ([Figura R2.9.D](#)), se exponen imágenes de sus respectivas derivadas

(Figura R2.9.B y E). Este tipo de imágenes son especialmente útiles, ya que permiten apreciar con mayor exactitud los detalles y características de la superficie.

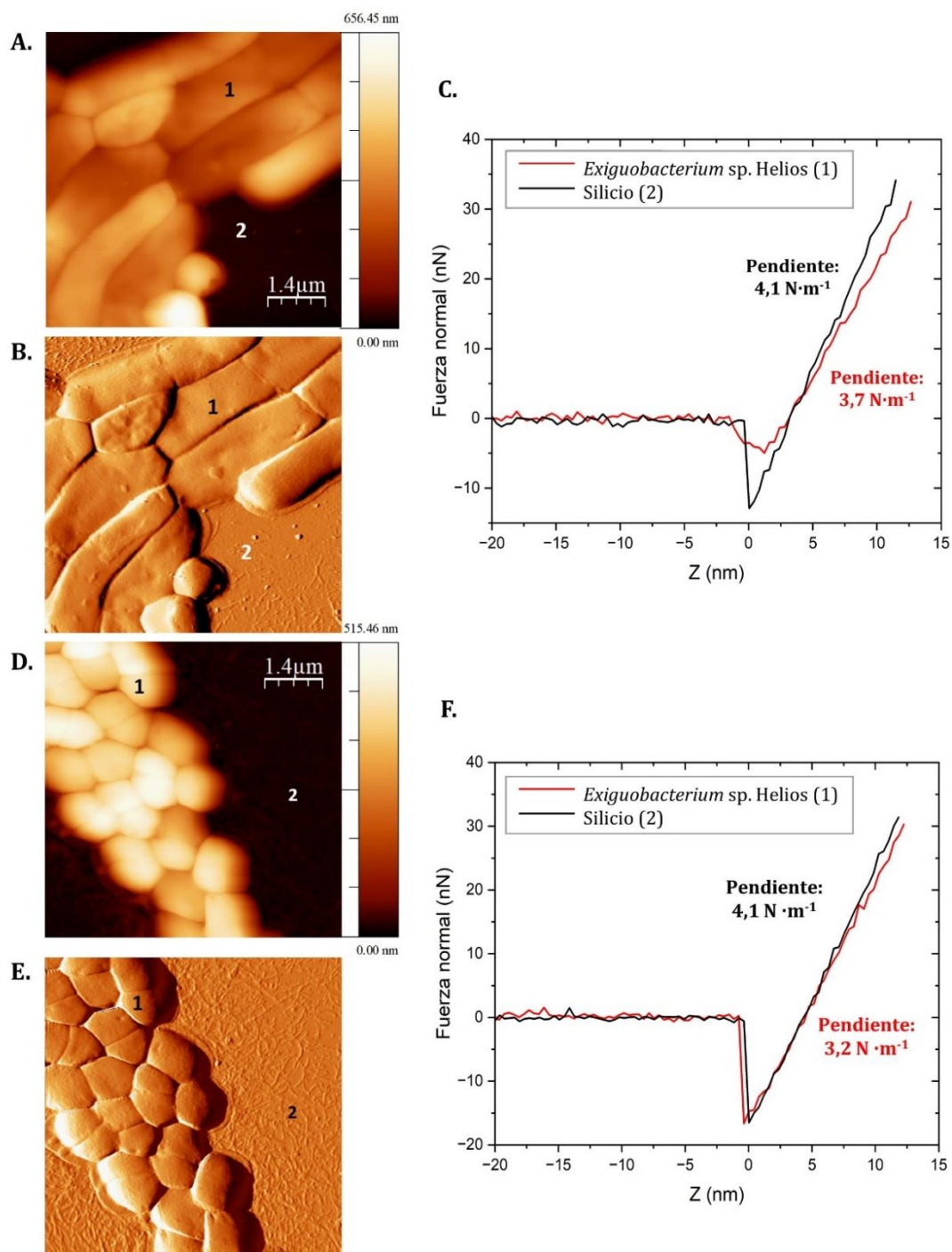


Figura R2.9. Método de medición de la rigidez de células bacterianas. Ejemplo de análisis mediante AFM de bacterias *Exiguobacterium* sp. Helios en fase exponencial (A-C) y estacionaria (D-F). Imágenes topográficas de AFM tomadas mediante el método de jumping (A y D) y sus respectivas derivadas topográficas (B y E). Las curvas de F vs. D C

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

y F fueron realizadas sobre *Exiguobacterium* sp. Helios (1) y sobre la superficie de silicio (2) de las imágenes en fase exponencial (A) y estacionaria (D), respectivamente.

Los resultados muestran que sobre las bacterias la curva es también una línea recta (Figura R2.9.C y F) lo cual indica que la superficie bacteriana tiene un comportamiento mecánico dentro del régimen elástico y, como era esperable, la pendiente de esta recta sobre la bacteria es menor que sobre el silicio. Como ya se ha mencionado previamente, un menor valor de la pendiente implica una menor rigidez. La diferencia entre el valor de la pendiente de la curva sobre la superficie completamente rígida (silicio) y sobre la bacteria permite calcular la constante de fuerza de la bacteria (rigidez) en $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$.

La diferente morfología que se aprecia en las imágenes coincide con la morfología esperable según su fase de crecimiento. En la fase exponencial (Figura R2.9.A) se puede observar una forma bacilar de las células mientras que en la fase estacionaria (Figura R2.9.D) las células presentan una forma cocoide. La gráfica de la Figura R2.9.C muestra ejemplos de curvas realizadas sobre las zonas indicadas en la Figura R2.9.A (bacteria en fase exponencial (1) y silicio (2)). Como se puede observar, el valor de la pendiente sobre la bacteria es menor que sobre el silicio ($3,2 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ frente a $4,1 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$). Cuando se compara este resultado con su homólogo, pero en fase estacionaria (Figura R2.9.F y D), se puede observar que la pendiente sobre la bacteria estacionaria es mayor ($3,7 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ frente a $4,1 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$). Este hecho indica que la rigidez de la bacteria en la fase estacionaria es mayor que en la fase exponencial.

Empleando esta metodología, se realizaron mediciones de células de *Exiguobacterium* sp. Helios empleando un cantiléver con una constante de fuerza nominal de $2,8 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ y un radio de la punta menor a 7 nm . Las mediciones se realizaron en 4 experimentos independientes en los que se mantuvo un tiempo de cultivo de 3 h para la fase exponencial y de 24 h para la fase estacionaria. El tiempo de inmovilización de la muestra sobre el silicio previo a su secado fue de 1 h. El objetivo fundamental de estos experimentos era determinar las diferencias en morfología superficial y rigidez de las bacterias en cada una de las fases. Los resultados de los 4 experimentos realizados sobre 4 muestras distintas (2 en fase exponencial y 2 en fase estacionaria), sobre 20 bacterias en total y 8 medidas sobre

cada bacteria, se muestran en la [Figura R2.10](#). Las células de *Exiguobacterium* sp. Helios que se encuentran en fase exponencial tienen un valor de la rigidez promedio de $11,9 \pm 1,8 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ frente a un valor promedio de $25,1 \pm 3,4 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ de la fase estacionaria.

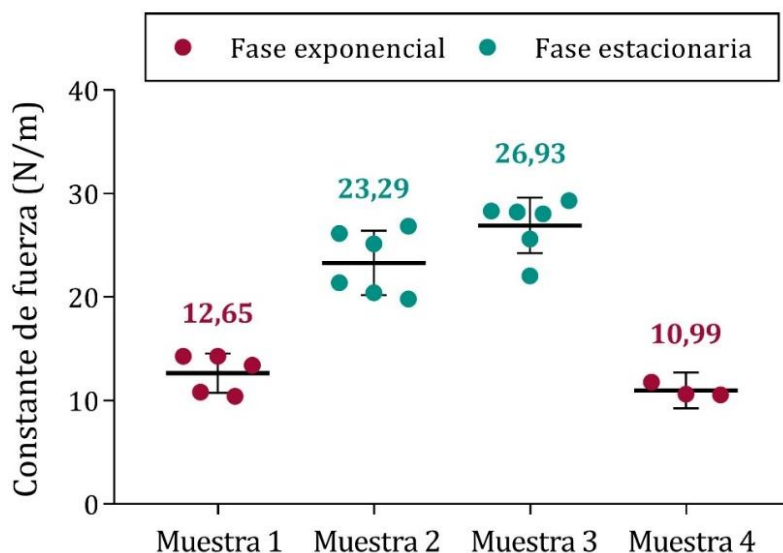


Figura R2.10. Medida de la rigidez de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios. Datos de constante de fuerza de células de Helios procedentes de 4 muestras distintas, 2 en fase exponencial y 2 en fase estacionaria. Cada punto representa la media de al menos 8 réplicas sobre la misma célula.

Por otra parte, se han analizado las alturas de las bacterias en cada fase. En la gráfica de la [Figura R2.11](#) está representada la rigidez de cada bacteria medida (puntos rojos en fase exponencial y puntos azules en fase estacionaria) frente a su altura topográfica. Se puede observar que no existe una diferencia significativa entre las alturas de las células en fase exponencial y en fase estacionaria. El hecho de que no se observe una pérdida significativa de volumen al pasar de la fase exponencial a la estacionaria apuntaría a que la mayor rigidez encontrada en la fase estacionaria provendría de un cambio en la estructura de la pared celular, tal y como, por ejemplo, un engrosamiento de ésta.

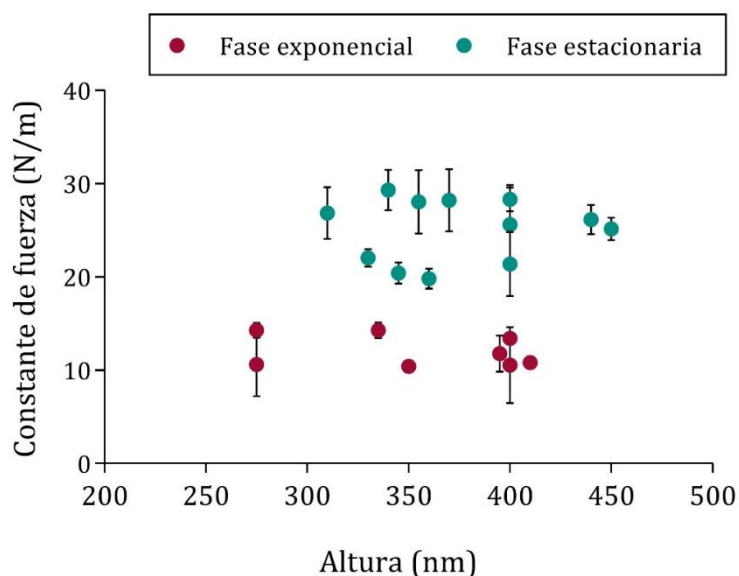


Figura R2.11. Medida de la rigidez en función de la altura de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios. Datos de constante de fuerza de células de Helios procedentes de 4 muestras distintas, 2 en fase exponencial y 2 en fase estacionaria. Cada punto representa la media de al menos 8 réplicas sobre la misma célula.

3.3. Comparación de la rigidez entre especies

Tras realizar mediciones de la rigidez de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios se decidió comparar la rigidez de las células de Helios en fase estacionaria con otras especies, también en fase estacionaria. Se utilizó un cantiléver de $3,4 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ y un radio de punta menor a 7 nm . En la [Figura R2.12.B-E](#) se muestra la topografía de las diferentes especies junto con una comparativa de la constante de fuerza entre ellas ([Figura R2.12.A](#)). Al comparar los datos de estas mediciones se pudo comprobar que la constante de fuerza de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios, de $21,9 \pm 2,1 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ en estas condiciones, era superior a la presentada por las células de *E. mexicanum* ($16,1 \pm 2,5 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$), y mucho más elevada que la de las células de *B. subtilis* ($11,6 \pm 1,4 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, células vegetativas, no esporas). Sin embargo, es ligeramente menor a *E. sibiricum* ($22,6 \pm 3,8 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$).

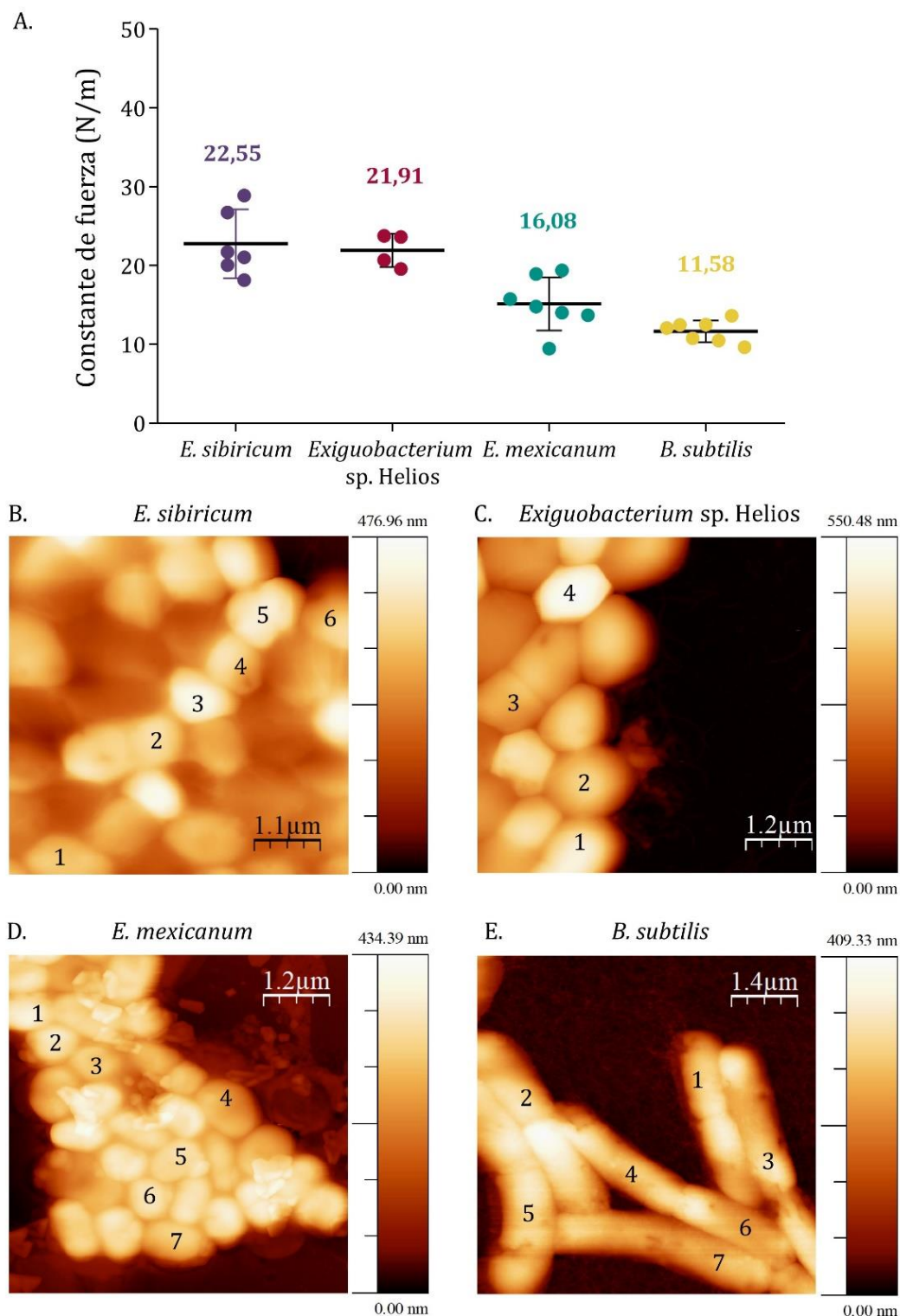


Figura R2.12. Comparación de la dureza de células de diferentes especies. A. Datos de dureza de las cuatro especies comparadas. Cada punto representa la media de al menos 8 réplicas en cada bacteria. Imágenes de la topografía de las células sobre las que se realizaron las mediciones, numerándolas en cada caso, pertenecientes a *E. sibiricum* (B), *Exiguobacterium sp. Helios* (C), *E. mexicanum* (D) y *B. subtilis* (E).

3.4. Recuperación de células desecadas

Una vez estudiada la rigidez de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios en condiciones fisiológicas normales, se analizó cómo variaba la rigidez de las células tras la desecación. Para ello se prepararon varias muestras que se mantuvieron en desecación sobre el soporte de silicio durante 7 días (10% HR, 37°C) y posteriormente se midieron por AFM en las horas inmediatamente posteriores, empleando dos tipos de cantiléver con constantes de fuerza de 2,8 y 42 N·m⁻¹, y realizando dos mediciones independientes de cada una de las muestras.

Como resultado de estas mediciones se pudo observar que, pese a que la constante de fuerza media entre cada experimento es similar, en el caso de la muestra medida con un cantiléver más blando las medidas son muy dispares y, por tanto, no se puede obtener una buena resolución con un cantiléver tan blando. En el caso de los otros tres experimentos, se obtuvo una constante de fuerza entre 40,78-45,84 N·m⁻¹ (Figura R2.13).

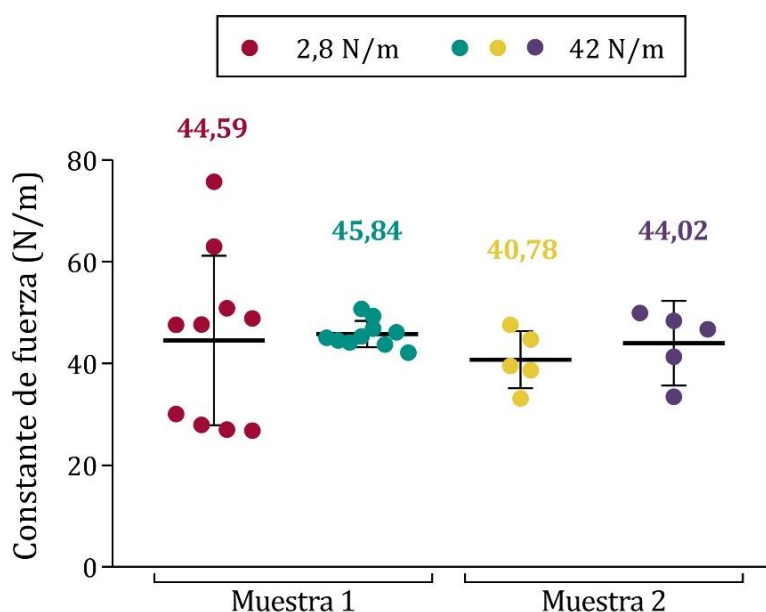


Figura R2.13. Comparación de la rigidez de células de *Exiguobacterium* sp. Helios desecadas con distintos cantiléver. Cada punto representa la media de al menos 8 réplicas en cada bacteria.

Continuando con el análisis de la muestra 2, se planteó un nuevo experimento en el que se rehidrataron las células sobre la superficie de silicio y se volvió a medir la constante de fuerza de las células de la misma región para ver cómo variaba en función de la humedad. El experimento 1 representa las medidas tras la hidratación de la muestra durante 2,5 h, mientras que en el experimento 2 se rehidrató la muestra durante 4,5 h (Figura R2.14). La constante de fuerza descendió drásticamente en los dos casos hasta menos de la mitad de la que presentaban las muestras antes de ser rehidratadas (13,22 - 20,93 N·m⁻¹).

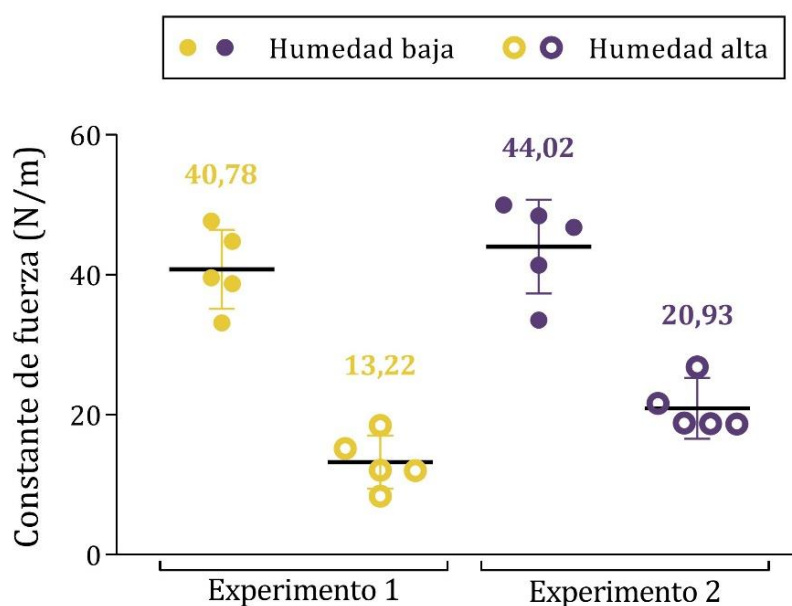


Figura R2.14. Comparación de la rigidez de células de *Exiguobacterium* sp. Helios desecadas antes y después de la rehidratación. Cada punto representa la media de al menos 8 réplicas en cada bacteria.

Estos datos no solo confirman que *Exiguobacterium* sp. Helios bajo la forma cocoide de mayor resistencia presenta una mayor rigidez que el resto de las células de forma bacilar, sino que además demuestran que estas células resistentes son capaces de regresar a su forma original al poco tiempo de ser rehidratadas.

3.5. Estudio de la topografía

Otra de las posibilidades que ofrece la AFM es la de analizar la superficie de la muestra gracias a las imágenes no ópticas que se pueden obtener por diversos métodos. Esto facilita la detección de cambios en las fuerzas de adhesión, cambios en la rigidez de la superficie y una visualización de la topografía a una escala que otras técnicas no alcanzan, permitiendo observar la morfología y estructura superficial con resolución nanométrica.

3.5.1. Estudio de la estructura de la pared celular

Se pudo distinguir en la imagen topográfica estructuras superficiales en forma de anillos transversales al eje longitudinal de la bacteria (Figura R2.15). Estas formaciones podrían corresponder a nanoestructuras de peptidoglicano que dan forma a la pared celular.

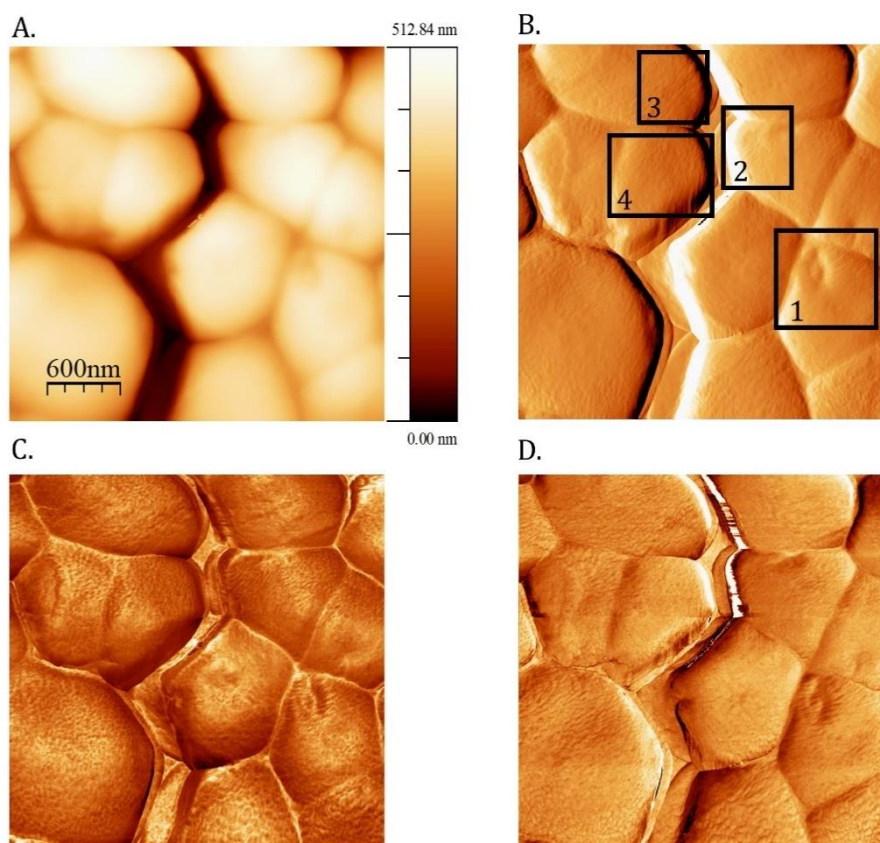
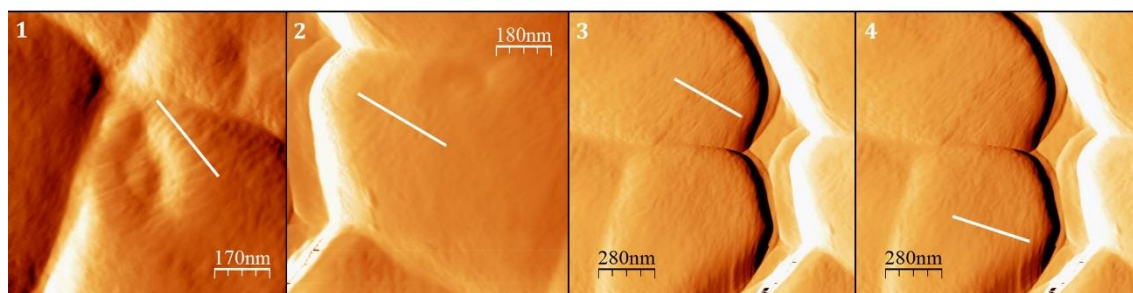


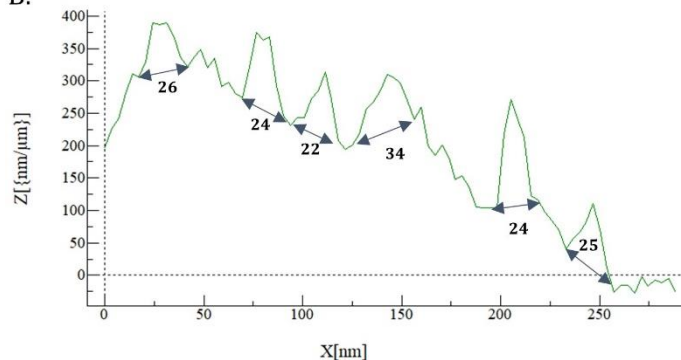
Figura R2.15. Análisis de la topografía de células de *Exiguobacterium sp. Helios*. Imagen topográfica de AFM tomada mediante el método *jumping* (A), y su respectiva derivada topográfica (B) rigidez (C) y adhesión (D).

Mediante la realización de perfiles de las imágenes de la derivada de la topografía de cuatro células diferentes (Figura R2.16.A) se pudo determinar la dimensión de estas nanoestructuras conformacionales de la pared celular (Figura R2.16.B). Se observó que presentan una anchura desde los 18 nm hasta aproximadamente 35 nm con una altura de alrededor de 2,5 nm (Figura R2.16.C).

A.



B.



C.

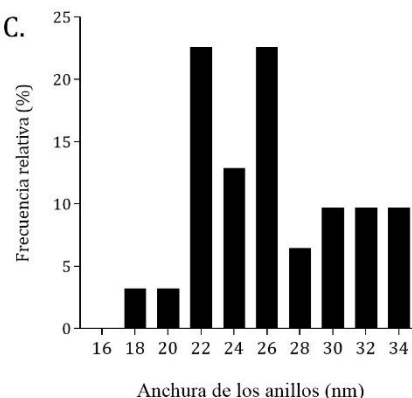


Figura R2.16. Análisis de la topografía de células de *Exiguobacterium* sp. Helios. Imagen de la derivada topográfica de AFM de cuatro células diferentes (A), el perfil realizado en la imagen A1 (B) y la frecuencia relativa de la anchura de los anillos en las cuatro células (C).

Se pudo observar que estas estructuras son especialmente visibles en el extremo de las bacterias mientras que en la parte central se observa una superficie granulosa (Figura R2.17.A,B), como ya se ha descrito en otras Gram positivas como *S. aureus* (Figura R2.17.C), según se trate de peptidoglicano nuevo (anillos) o antiguo (gránulos) (Turner et al., 2010).

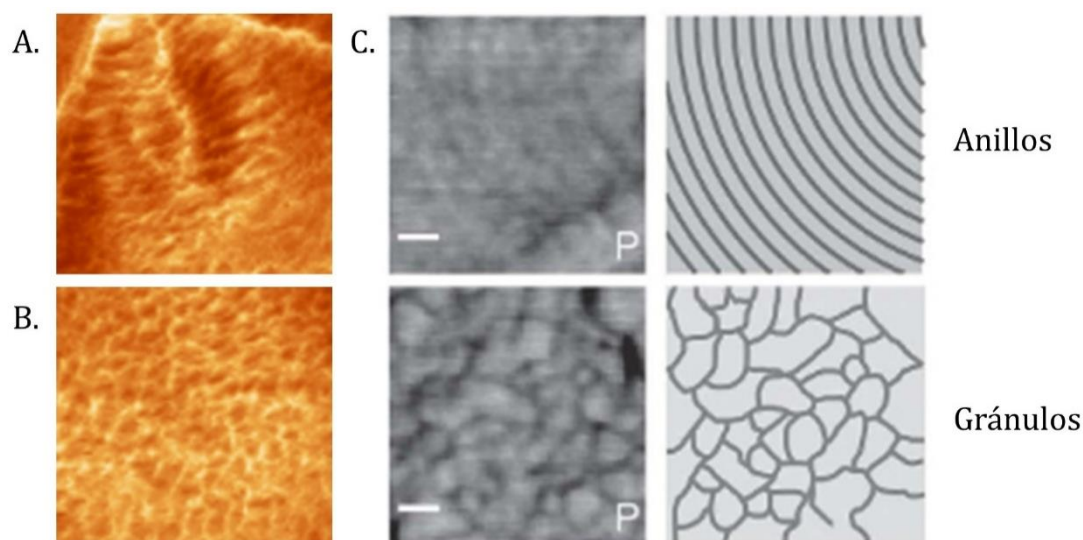


Figura R2.17. Análisis de la topografía de células de *Exiguobacterium sp. Helios*. Imagen de la derivada topográfica de AFM (A), el perfil realizado en la imagen A1, en la zona extrema de la célula (peptidoglicano nuevo) (B) y en la zona central de la bacteria (peptidoglicano antiguo) (C). Detalles de sáculos de *S. aureus* que muestran textura anular y granular (Turner et al., 2010).

3.5.2. Estudio de la adhesión

Por último, se detectaron zonas que presentaban diferencias en la fuerza de adhesión, las más notables parecían formar una línea a lo largo de algunas células (Figura R2.18.A,B), disponiéndose de forma perpendicular al eje de división (Figura R2.18.C).

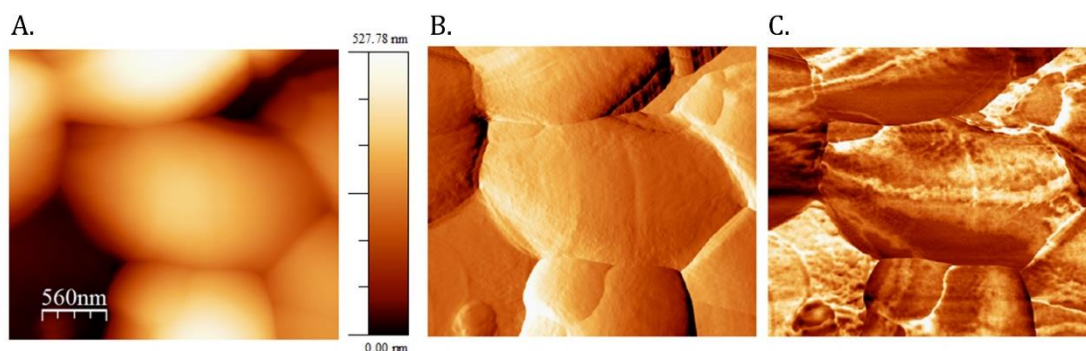


Figura R2.18. Análisis de las fuerzas de adhesión de células de *Exiguobacterium sp. Helios*. Imagen topográfica de AFM tomada mediante el método de *jumping* (A), derivada topográfica (B) y adhesión (C).

4. Estudio de los mecanismos de xerotolerancia mediante análisis transcriptómico

Exiguobacterium sp. Helios presentaba diferentes fenotipos dependiendo de la fase de crecimiento; las células en fase exponencial temprana mostraban una morfología bacilar de bastones, mientras que en fase estacionaria se transformaban en células con morfología cocoide. Además, estas células cocoides, que aparecían mayoritariamente en fase estacionaria y que también se observaban de manera mayoritaria en todas las fases en cultivos a 4°C, presentaban una rigidez muy por encima de la mostrada por especies cercanas filogenéticamente y consideradas resistentes a condiciones de estrés. La mayor xerotolerancia observada en estas células, podría deberse en parte a la adquisición de un fenotipo de envoltura celular cocoide engrosada. Sin embargo, todavía se desconoce cómo las células aumentan sus propiedades de xerotolerancia a lo largo de la fase de crecimiento para alcanzar su máxima tolerancia en la fase estacionaria.

Por este motivo, se propuso analizar mediante un enfoque transcriptómico cómo las células de *Exiguobacterium* sp. Helios coordinan el metabolismo a lo largo de la curva de crecimiento, no solo para cambiar la morfología de bacilar a cocoide, sino también para sobrevivir al estrés de la desecación. Considerando que durante la fase exponencial algunas células aún sobreviven a la desecación, también hemos analizado el transcriptoma de las células que sobreviven en esta fase para compararlo con el de las otras fases de crecimiento (Figura R2.19).

Los resultados de la comparación de la expresión diferencial de genes (DEG) en un medio rico de cultivo entre las 4 condiciones estudiadas mostró que el perfil de expresión de la fase exponencial tardía y la fase estacionaria era extremadamente similar (Figura R2.20), por lo que en adelante el análisis se centró en comparar las fases exponencial temprana y estacionaria.

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

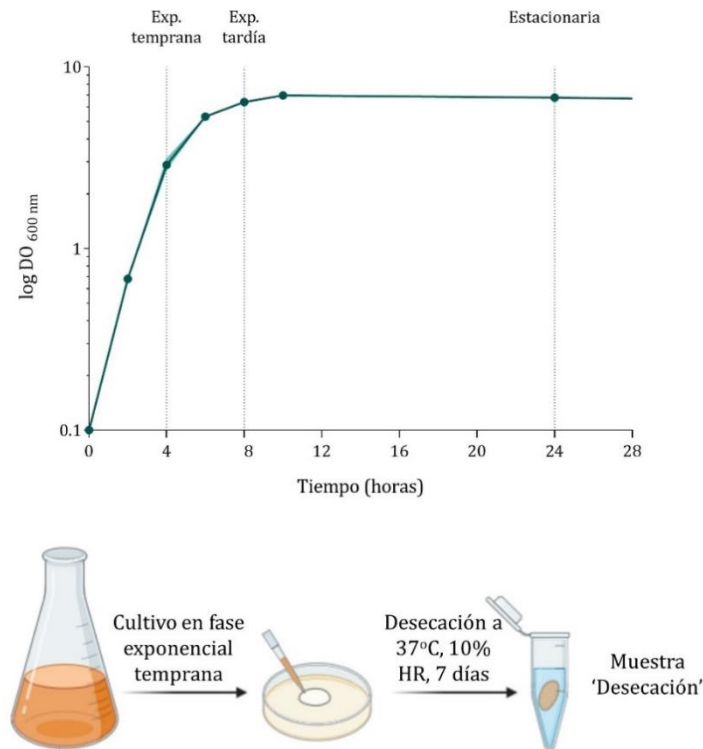


Figura R2.19. Selección de muestras para análisis transcriptómico de *Exiguobacterium sp. Helios*. Se tomaron muestras de tres puntos diferentes de la curva de crecimiento de un cultivo desarrollado en medio LB a 30°C y una última muestra de células procedentes de la fase exponencial temprana tras un ensayo de desecación de 7 días. HR, humedad relativa.

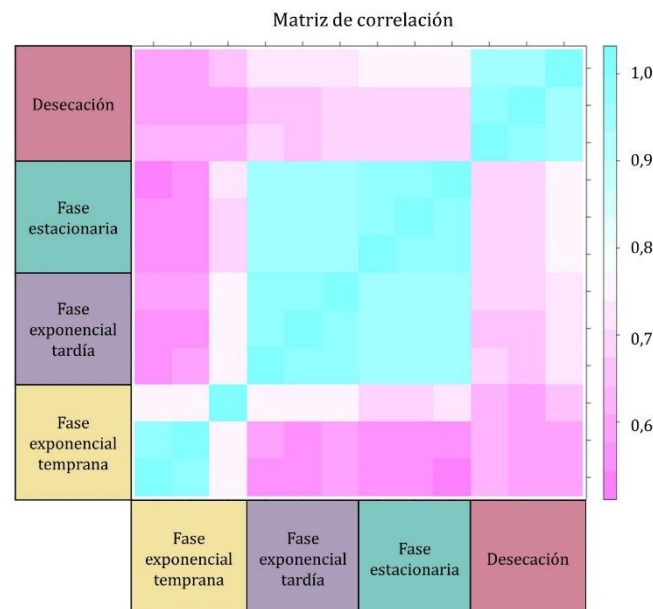


Figura R2.20. Matriz de correlación entre las muestras para las cuatro condiciones estudiadas por transcriptómica. Se compara la correlación entre las muestras, con 3 réplicas para cada una de las condiciones estudiadas.

4.2. Principales cambios de expresión observados en la fase estacionaria del cultivo

Como resultado de comparar los transcriptomas de la fase estacionaria y la fase exponencial temprana de *Exiguobacterium* sp. Helios se obtuvieron 1145 genes diferencialmente expresados (DEGs) cuyo $|\log_2FC| > 2$. Para comenzar a estudiar la expresión diferencial del genoma en la fase estacionaria respecto a la fase exponencial temprana, se clasificaron los genes cuyo $|\log_2FC| > 2$ (Figura R2.21), y de un total de 979 genes que cumplían ese requisito, 45 se quedaron sin clasificar en ninguna de estas categorías. A continuación, se muestran en detalle algunas de las categorías de genes que presentan mayores cambios en la expresión y que resultan más interesantes para el estudio de los mecanismos de xerotolerancia.

4.2.1. Genes de movilidad

El genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios contiene dos grandes regiones involucradas en la síntesis del flagelo (Tabla R2.1) que están organizadas en dos clústeres: *HNY42_RS11055-HNY42_RS11200* y *HNY42_RS13935-HNY42_RS14085* las cuales se extienden durante 23,9 kb y 29,4 kb, respectivamente.

Además de estos genes del flagelo, en el genoma se detectan varios genes que regulan el sistema de quimiotaxis (Tabla R2.2), como los receptores MCP (*methyl-accepting chemotaxis protein*, proteína de quimiotaxis aceptora de metilo). La presencia de estos genes sugiere que Helios es motil igual que *E. sibiricum* y otras especies del género *Exiguobacterium* (Kasana & Pandey, 2018). Los datos de expresión sugieren que al entrar en la fase estacionaria las células dejan de expresar estos genes flagelares y por lo tanto se asume que deben de perder el flagelo. Este resultado es consistente con el hecho de que al entrar en la fase estacionaria las células adquieren una forma cocoide donde ya no se observa el flagelo. Esto parece un proceso habitual en otras bacterias, ya que cuando las células entran en la fase estacionaria se observa una disminución del número de células flageladas (Zhuang & Lo, 2020). El único gen que aparece sobreexpresado en fase estacionaria y que está relacionado con motilidad corresponde a una MCP

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

que presenta homología con el regulador de quimiotaxis BdlA, esencial para la dispersión y formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa* y que se activa ante cambios bruscos en la concentración de ciertos solutos en el ambiente (Morgan et al., 2006). El resto de DEGs relacionados con la movilidad están subexpresados en *Exiguobacterium* sp. Helios. Este comportamiento también se observa en otras bacterias cuando al escasear los nutrientes las células adoptan una estrategia de supervivencia (Zhu & Gao, 2020).

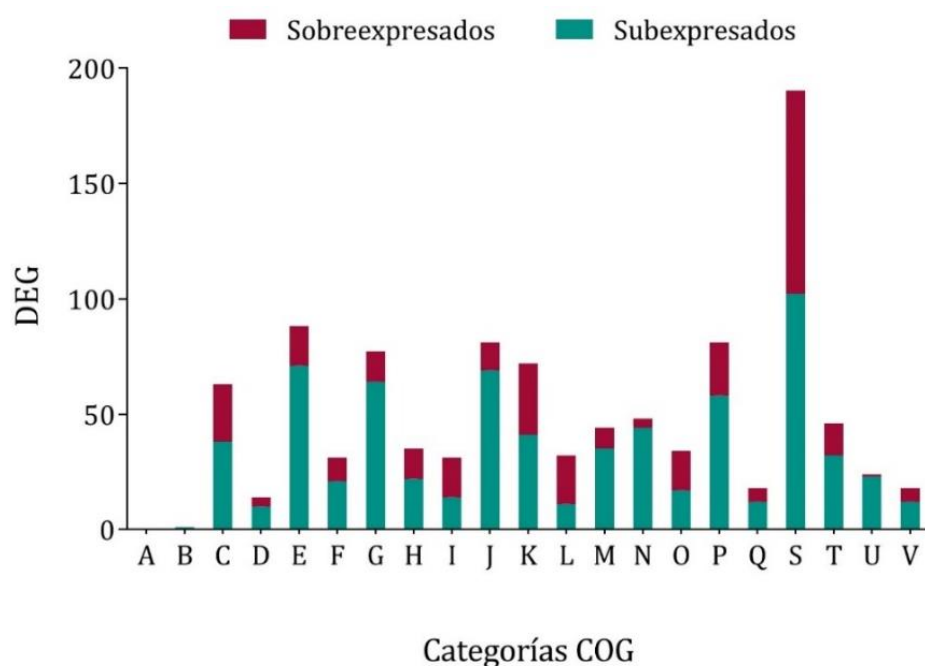


Figura R2.21. Gráfica del número de genes diferencialmente expresados entre la fase estacionaria y exponencial temprana en cada categoría COG. Se muestran las proporciones de genes sobreexpresados (rojo) y subexpresados (azul). A: Procesamiento y modificación de ARN; B: Estructura y dinámica de la cromatina; C: Producción y conversión de energía; D: Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; H: Transporte y metabolismo de coenzimas; I: Transporte y metabolismo de lípidos; J: Traducción, estructura ribosómica y biogénesis; K: Transcripción; L: Replicación, recombinación y reparación; M: Biogénesis de pared/membrana/envoltura celular; N: Motilidad celular; O: Modificación postraduccional, recambio proteico, acompañantes; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; S: Función desconocida; T: Mecanismos de transducción de señales; U: Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; V: Mecanismos de defensa.

Tabla R2.1. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en la formación del flagelo. Se muestran los genes cuyo $|\log_2FC| > 2$.

Gen	Locus (HNY42_)	Descripción	\log_2FC	p valor
<i>motA</i>	RS00450	Proteína de rotación del motor flagelar	-6,10	$9,57 \times 10^{-19}$
<i>motB</i>	RS00455	Proteína de rotación del motor flagelar	-3,29	$1,79 \times 10^{-13}$
<i>fleN</i>	RS11080	Regulador de la síntesis flagelar	-4,18	$1,13 \times 10^{-12}$
<i>flhF</i>	RS11085	Proteína de biosíntesis flagelar	-4,80	$2,16 \times 10^{-16}$
<i>flhA</i>	RS11090	Proteína de biosíntesis flagelar	-4,61	$1,21 \times 10^{-19}$
<i>flhB</i>	RS11095	Proteína de biosíntesis flagelar	-5,17	$4,19 \times 10^{-23}$
<i>fliR</i>	RS11100	Proteína de biosíntesis flagelar	-5,14	$3,11 \times 10^{-18}$
<i>fliQ</i>	RS11105	Proteína de biosíntesis flagelar	-5,92	$1,47 \times 10^{-11}$
<i>fliP</i>	RS11110	Proteína de biosíntesis flagelar	-6,01	$2,51 \times 10^{-29}$
<i>fliZ</i>	RS11115	Proteína de biosíntesis flagelar	-6,35	$1,27 \times 10^{-33}$
<i>fliN</i>	RS11125	Proteína de interruptor del motor flagelar	-6,24	$8,88 \times 10^{-36}$
<i>fliM</i>	RS11130	Proteína de interruptor del motor flagelar	-5,91	$7,15 \times 10^{-26}$
<i>fliL</i>	RS11135	Proteína de biosíntesis flagelar	-5,60	$3,58 \times 10^{-14}$
<i>flbD</i>	RS11140	Proteína flagelar	-6,25	$1,15 \times 10^{-15}$
<i>flgE</i>	RS11145	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar	-5,39	$4,97 \times 10^{-20}$
<i>flgD</i>	RS11150	Proteína de modificación de bastones del cuerpo basal flagelar	-5,92	$4,85 \times 10^{-14}$
<i>fliK</i>	RS11155	Proteína de control de la longitud del gancho flagelar	-7,59	$5,01 \times 10^{-19}$
<i>flbB</i>	RS11160	Proteína flagelar	-6,41	$2,30 \times 10^{-14}$
<i>fliJ</i>	RS11165	Proteína flagelar	-6,14	$8,32 \times 10^{-16}$
<i>fliI</i>	RS11170	ATP sintasa específica de flagelo	-5,34	$1,46 \times 10^{-15}$
<i>fliH</i>	RS11175	Proteína de ensamblaje flagelar	-5,33	$1,05 \times 10^{-12}$
<i>fliG</i>	RS11180	Proteína de interruptor del motor flagelar	-5,28	$7,75 \times 10^{-14}$
<i>fliF</i>	RS11185	Proteína del anillo M flagelar	-5,13	$2,96 \times 10^{-14}$
<i>fliE</i>	RS11190	Proteína del complejo corporal flagelar-gancho basal	-6,66	$5,96 \times 10^{-9}$
<i>flgC</i>	RS11195	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar	-2,96	0,014137
<i>flgB</i>	RS11200	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar	-6,39	$2,24 \times 10^{-10}$
<i>fliS</i>	RS13935	Chaperona de secreción flagelar	-6,38	$5,72 \times 10^{-18}$
<i>fliD</i> /	RS13975	Proteína asociada al gancho flagelar	-4,27	$4,04 \times 10^{-28}$
<i>yvyC</i>	RS13980	Proteína flagelar	-4,45	$2,68 \times 10^{-12}$
<i>flaA</i> /	RS13940	Flagelina	-4,00	$6,95 \times 10^{-28}$
<i>hag</i>	RS13985	Flagelina	-7,49	$8,90 \times 10^{-104}$
<i>flgN</i>	RS14080	Biosíntesis flagelar/chaperona de la vía secretora tipo III	-5,20	$7,39 \times 10^{-9}$
<i>flhP</i>	RS15010	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar	-3,81	$5,10 \times 10^{-27}$
<i>flhO</i>	RS15015	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar	-3,29	$6,6 \times 10^{-22}$

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

Tabla R2.2. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en quimiotaxis. Se muestran los genes cuyo $|\log_2FC| > 2$

Locus (HNY42_)	Descripción	log ₂ FC	p valor
RS02605	MCP	-7,08	4,54 x 10 ⁻³⁰
RS02870	MCP	-3,44	2,47 x 10 ⁻¹¹
RS05535	MCP	-2,50	0,000155
RS06485	Proteína de quimiotaxis CheV	-7,40	4,77 x 10 ⁻¹²
RS08865	MCP	-3,39	1,23 x 10 ⁻¹¹
RS09335	MCP	-5,68	1,84 x 10 ⁻¹⁷
RS09400	MCP	2,60	2,82 x 10 ⁻¹⁵
RS11065	Proteína de quimiotaxis CheC, inhibidor de la metilación de MCP	-4,78	7,13 x 10 ⁻²⁸
RS11070	Proteína CheW, regulador positivo de CheA	-4,79	1,83 x 10 ⁻²⁵
RS11075	Proteína CheA histidina quinasa	-4,14	5,04 x 10 ⁻¹⁵
RS11120	Regulador de quimiotaxis CheY, transmite señales de quimiorreceptores al motor flagelar	-5,03	2,08 x 10 ⁻²⁰
RS13990	MCP	-4,95	1,37 x 10 ⁻¹⁸
RS14270	MCP	-3,93	1,76 x 10 ⁻¹⁷

4.2.2. Metabolismo del ácido fenilacético

El análisis del genoma revela que *Exiguobacterium* sp. Helios contiene un clúster de 11,7 kb (HNY42_RS03440-HNY42_RS03510) que codifica la ruta completa de degradación del ácido fenilacético. La bacteria es capaz de utilizar el ácido fenilacético como única fuente de carbono y energía y por lo tanto esta ruta es funcional en esta cepa (datos no mostrados). Se sabe que muchas bacterias contienen esta ruta que se controla a través del represor PaaX que es inducible por fenilacetil-CoA (del Peso-Santos et al., 2006).

Los genes de la ruta de degradación del fenilacetato aparecen sobreexpresados en la fase estacionaria (Figura R2.22, Tabla R2.3). El papel que estos genes, las enzimas o los metabolitos puedan desempeñar en esta fase resulta de momento muy difícil de explicar. Se ha descrito que puede existir una relación entre la ruta del ácido fenilacético y la protección frente al estrés oxidativo por H₂O₂, y que además la expresión de la ruta puede inducir la producción de biopelículas a través de la proteína Csu (Jiao et al., 2022).

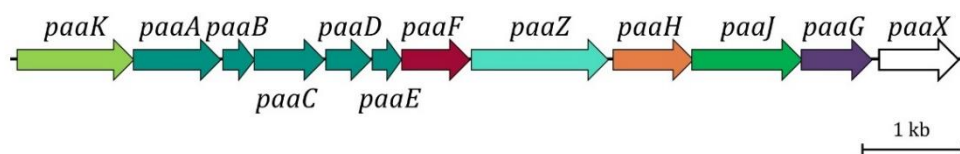


Figura R2.22. Clúster de genes involucrados en la ruta de degradación aerobia del ácido fenilacético en *Exiguobacterium* sp. Helios. La función hipotética correspondiente a cada gen se detalla en la Tabla R2.3.

Tabla R2.3. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en la ruta de degradación del ácido fenilacético.

Gen	Locus (HNY42_)	Descripción	log ₂ FC	p valor
<i>paaK</i>	RS03445	Fenilacetato-CoA ligasa	4,76	1,29 x 10 ⁻²⁸
<i>paaA</i>	RS03450	1,2-fenilacetil-CoA epoxidasa subunidad A	3,92	3,83 x 10 ⁻³³
<i>paaB</i>	RS03455	1,2-fenilacetil-CoA epoxidasa subunidad B	3,41	1,55 x 10 ⁻¹¹
<i>paaC</i>	RS03460	Fenilacetato-CoA oxigenasa subunidad C	2,71	1,156 x 10 ⁻²²
<i>paaD</i>	RS03465	Fenilacetato-CoA oxigenasa subunidad D	2,34	8,19 x 10 ⁻²⁶
<i>paaE</i>	RS03470	Reductasa de la familia EthD	2,04	6,37 x 10 ⁻²⁴
<i>paaF</i>	RS03475	Enoil-CoA hidratasa	1,42	4,59 x 10 ⁻²⁰
<i>paaZ</i>	RS03480	Aldehído deshidrogenasa	2,42	6,54 x 10 ⁻³⁵
<i>paaH</i>	RS03485	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	3,36	3,45 x 10 ⁻¹¹
<i>paaJ</i>	RS03490	Acetil-CoA C-aciltransferasa	3,47	2,4 x 10 ⁻²⁰
<i>paaG</i>	RS03495	Enoil-CoA hidratasa	3,45	2,89 x 10 ⁻¹³
<i>paaX</i>	RS03500	Proteína de regulación negativa del operón de degradación del ácido fenilacético	3,72	9,19 x 10 ⁻⁶

4.2.3. Morfología, pared celular y EPS

El genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios contiene los genes típicos que determinan la morfología, división celular y elongación de las bacterias Gram-positivas, en dos clústeres de 11,8 kb (*HNY42_RS11575-HNY42_RS11620*) y 5,4 kb (*HNY42_RS12335-HNY42_RS12365*). Tanto los genes *mur*, encargados de la biosíntesis del peptidoglicano y de la elongación de la bacteria, como los genes *fts*,

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

responsables de la división celular (Carballido-López & Formstone, 2007), se encuentran subexpresados en la fase estacionaria, lo cual explicaría la morfología cocoide de *Helios* en la fase estacionaria. Por otra parte, también están subexpresados los genes que codifican las proteínas relacionadas con el reciclaje del peptidoglicano y los genes del clúster *eps* de síntesis de exopolisacárido (*HNY42_RS14850-HNY42_RS14875*) (Tabla R2.4).

Tabla R2.4. DEGs de *Exiguobacterium* sp. *Helios* relacionados con pared celular y síntesis de exopolisacárido. Se muestran los genes cuyo $|\log_2 FC| > 2$.

Locus (<i>HNY42_</i>)	Descripción	$\log_2 FC$	<i>p</i> valor
Morfología y división celular			
<i>RS11585</i>	Proteína de división celular FtsA	-2,43	$3,78 \times 10^{-12}$
<i>RS11590</i>	Proteína FtsQ que contiene un dominio POTRA	-2,87	$8,48 \times 10^{-15}$
<i>RS11605</i>	Fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido-transferasa	-2,55	$3,33 \times 10^{-11}$
<i>RS11610</i>	UDP-N-acetilmuramoil-tripéptido	-2,00	$2,40 \times 10^{-6}$
<i>RS11620</i>	Proteína de división celular FtsL	-2,13	$4,05 \times 10^{-17}$
<i>RS12345</i>	Proteína de determinación de forma bacilar MreD	-2,18	$5,51 \times 10^{-7}$
Componentes de la pared celular de Gram positivas			
<i>RS00500</i>	N-acetilmanosaminitransferasa (TagA/CpsF)	2,87	$1,75 \times 10^{-16}$
<i>RS10615</i>	PBP1a	3,59	$3,06 \times 10^{-32}$
<i>RS15470</i>	Sintasa de ácido lipoteicoico LtaP	2,81	N/A
Reciclaje de peptidoglicano			
<i>RS06585</i>	Muramoiltetrapéptido carboxipeptidasa	-2,33	$6,86 \times 10^{-7}$
<i>RS08625</i>	Metalopeptidasa de la familia M15	-2,95	0,002348
<i>RS14560</i>	Serina hidrolasa	-6,50	$8,32 \times 10^{-21}$
Biosíntesis de exopolisacárido			
<i>RS14850</i>	Undecaprenil-fosfato galactosafosfotransferasa	-2,40	0,000456
<i>RS14865</i>	Proteína tirosina fosfatasa dependiente de manganeso	-2,97	$1,23 \times 10^{-8}$
<i>RS14870</i>	Tirosina-proteína quinasa EpsD (CpsD)	-3,13	$2,06 \times 10^{-6}$
<i>RS14875</i>	Modulador transmembrana de proteína tirosina-quinasa EpsC de biosíntesis capsular	-3,39	$8,21 \times 10^{-6}$

Por el contrario, en la fase estacionaria se sobreexpresan los genes relacionados con la biosíntesis de ácidos teicoicos y lipoteicoicos (genes *tag*) y una PBP (*penicilin-binding protein*) codificada por el gen *HNY42_RS10615* (Tabla R2.4) que podría ser responsable de polimerizar los glicanos y entrecruzar las cadenas laterales peptídicas (Koyano et al., 2023).

Todos estos cambios en la expresión sugieren modificaciones en la composición y en los enlaces del peptidoglicano que podrían ser responsables del engrosamiento de la envoltura celular y del aumento de la rigidez que presentan las células de *Exiguobacterium* sp. Helios en la fase estacionaria.

4.2.4. Genes de estabilidad de membrana

El clúster *HNY42_RS04505-HNY42_RS04525* presente en el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios contiene algunos de los genes más sobreexpresados de todo el transcriptoma. Este clúster codifica el sistema de proteínas de respuesta a la infección por fagos (Psp, *phage shock proteins*). Este sistema se activa como respuesta general a diferentes tipos de estrés en bacterias y arqueas, y está altamente conservado en especies de *Bacillus* y *Listeria*, donde es conocido como sistema Lia (Thurotte et al., 2017) (Figura R2.23, Tabla R2.5).

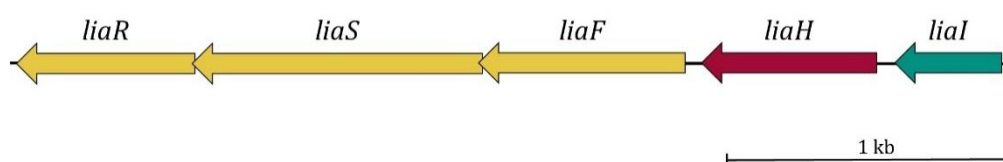


Figura R2.23. Clúster de genes del sistema Psp/Lia en *Exiguobacterium* sp. Helios. La función hipotética correspondiente a cada gen se detalla en la Tabla R2.5.

En condiciones de estrés, LiaF libera a la histidina quinasa bifuncional LiaS, que cambia su actividad del estado de fosfatasa al estado de quinasa. Una vez activado por fosforilación, el factor de transcripción LiaR que se encontraba inhibido induce la transcripción del operón *liaIH*. LiaI actúa como un ancla de membrana para LiaH, escanea la membrana y recluta a LiaH en el sitio donde se han producido los daños en la envoltura celular. Se cree que los complejos

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

oligoméricos LiaI/LiaH estabilizan una envoltura perturbada en los sitios con daño de la membrana. Este sistema se activa por diferentes tipos de estrés, como exposición a estrés alcalino, disolventes orgánicos, detergentes, estrés osmótico, calor y, en particular, antibióticos como la vancomicina y la bacitracina (Suntharalingam et al., 2009; Thurotte et al., 2017).

Tabla R2.5. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en el sistema Psp/Lia

Gen	Locus (HNY42_)	Descripción	log ₂ FC	p valor
<i>liaR</i>	RS04505	Factor de transcripción regulador de respuesta	3,68	1,14 x 10 ⁻²³
<i>liaS</i>	RS04510	Sensor histidina quinasa	5,93	2,99 x 10 ⁻³⁴
<i>liaF</i>	RS04515	Proteína de respuesta a antibióticos activa en la pared celular LiaF	5,89	1,42 x 10 ⁻²¹
<i>liaH</i>	RS04520	Proteína de la familia PspA/IM30	6,80	N/A
<i>liaI</i>	RS04525	Proteína hipotética	6,98	7,98 x 10 ⁻³⁴

Parece razonable pensar que estas proteínas desempeñan un papel importante en la xerotolerancia de Helios, ya que la supervivencia depende en gran medida de que las membranas, y en general la envoltura celular, se mantengan estables después de la desecación.

4.2.5. Genes relacionados con esporulación

Aunque ya se ha establecido que *Exiguobacterium* sp. Helios no es una bacteria que esporula, no se puede ignorar que su genoma contiene algunos genes relacionados con la esporulación cuyo papel en la xerotolerancia podría ser importante. Se ha descrito previamente una firma genómica conservada de unos 50 genes que codifican la maquinaria mínima necesaria para endosporulación, la cual permite distinguir organismos formadores de endosporas (Abecasis et al., 2013). *Exiguobacterium* sp. Helios contiene tan solo 17 genes de esta huella genómica, lo que quiere decir que solo presenta el 34% de los genes necesarios para esporular, confirmando que no es una bacteria formadora de esporas. De

estos 17 genes, solamente 8 muestran una expresión diferencial en la fase estacionaria (con el fondo naranja, [Tabla R2.6](#)).

El factor sigma SigB codificado por el gen *HNY42_RS00075* y sus proteínas reguladoras accesorias, los antifactores sigma RsbW y RsbV, codificados por los genes *HNY42_RS00080* y *HNY42_RS00085*, respectivamente, están presentes en el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios. SigB, cuyo gen está sobreexpresado en fase estacionaria ([Tabla R2.6](#)), es conocido por su control sobre regulones de estrés general que son activados por la exposición a estrés ambiental o nutricional (Rodríguez Ayala et al., 2020).

La proteína reguladora SpoVT, codificada por el gen *HNY42_RS01560*, está subexpresada en la fase estacionaria de *Exiguobacterium* sp. Helios ([Tabla R2.6](#)). Esta proteína está activa durante las últimas etapas de esporulación y se sabe que desempeña un papel importante en el ajuste de la regulación de la expresión genética específica de la esporulación (Eijlander et al., 2016).

Por otro lado, las proteínas SpoVG y SpoVS, codificadas por los genes *HNY42_RS01605* y *HNY42_RS06705*, están sobreexpresados en Helios en la fase estacionaria ([Tabla R2.6](#)). SpoVG es un regulador ampliamente conservado, especialmente entre bacterias Gram-positivas, siendo importante para la supervivencia y adaptabilidad ambiental. SpoVG regula la etapa V de la esporulación. SpoVG es un regulador importante de Spo0A, subexpresada en estas condiciones, y que es crucial tanto para la esporulación como para la formación de biopelículas (Huang et al., 2021).

Por su parte, SpoVS regula la maduración del septo bajo el control del factor sigma H (Resnekov et al., 1995). La proteína CwlD, codificada por el gen *HNY42_RS14150*, cuya expresión está reducida en Helios en su fase estacionaria, es responsable de la degradación del peptidoglicano de la espora para que ésta pueda germinar (Gilmore et al., 2004). La proteína SpoIIIAA, codificada por el gen *HNY42_RS12180* y sobreexpresada en fase estacionaria, pertenece a un grupo de 8 proteínas bajo la regulación del factor sigma E en la célula madre que forman el canal de unión que atraviesa el septo y la comunica con la pre-espora (Zeytuni et al., 2018).

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

Tabla R2.6. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios hipotéticamente involucrados en esporulación. Se muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos (% aa). En naranja se indican los genes con $|\log_2 FC| > 2$ en fase estacionaria.

Gen	Locus (HNY42_)	Función definida en <i>B. subtilis</i> . 168	Nº acceso %aa	log ₂ FC	p valor
<i>sigB</i>	RS00075	Factor σ B de ARN polimerasa. Proteína de estrés general.	P06574.3 63,18	2,04	7,08 x 10 ⁻¹²
<i>rsbW</i>	RS00080	Anti-sigma B factor RsbW.	P17904.1 55,70	1,46	0,000107
<i>rsbV</i>	RS00085	Anti-sigma B factor RsbV.	P17903.1 48,62	1,01	0,027915
<i>ykvl</i>	RS00585	7-carboxi-7-deazaguanin (CDG) sintasa. Modificación de ARNt.	O31677.1 49,79	-1,21	0,015883
<i>yyaC</i>	RS01240	Proteasa específica de la espora.	P37521.1 48,90	-0,93	0,020935
<i>spoVT/abrB</i>	RS01560	Proteína reguladora de transición AbrB	P08874.1 81,11	-2,23	8,74 x 10 ⁻⁷
<i>spoVG</i>	RS01605	Regulador necesario para la síntesis del córtex de la espora.	P28015.1 65,59	2,25	1,96 x 10 ⁻¹⁵
<i>mcsA</i>	RS01805	Activador de proteína quinasa McsB.	P37569.1 26,70	0,21	0,629778
<i>mcsB</i>	RS01810	Proteína arginina quinasa.	P37570.1 49,13	0,04	0,931477
<i>sigH</i>	RS01870	σ H Transcripción de genes de fase estacionaria temprana	P17869.1 71,50	1,50	8,63 x 10 ⁻⁵
<i>dapG</i>	RS03930	Aspartato quinasa.	P08495.2 40,30	-2,79	1,09 x 10 ⁻¹⁹
<i>yqhQ</i>	RS06055	Regulones de σ B y σ F. Supervivencia a condiciones de estrés.	P54515.2 55,16	3,34	7,78 x 10 ⁻⁶⁴
<i>spo0A</i>	RS06130	Coordina la replicación de ADN y la iniciación de la esporulación mediante sitios de unión cercanos al <i>oriC</i> .	P06534.1 47,47	-1,80	4,09 x 10 ⁻¹³
<i>spoVS</i>	RS06705	Regulador necesario para la rehidratación del núcleo de la espora y ensamblaje de la cápsula.	P45693.1 87,21	2,62	N/A
<i>spoIIIAA</i>	RS12180	Proteína YrvN no caracterizada con dominio AAA.	O34528.1 48,12	2,31	0,000587
<i>ytlI</i>	RS13260	Desconocida	O34991.1 38,58	-0,86	0,006968
<i>cwlD</i>	RS14150	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, síntesis del peptidoglicano de la corteza de la espora.	O32041.1 24,19	-4,26	3,25 x 10 ⁻²⁷

4.2.6. Estrés osmótico y oxidativo

Una de las estrategias típicas para resistir condiciones de estrés es la acumulación de compuestos osmoprotectores. La betaína (N,N,N-trimetilglicina) es un osmolito muy eficiente que se acumula en concentraciones citoplasmáticas altas en respuesta a estrés osmótico (Gonzalez et al., 2019). En este sentido, el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios contiene genes homólogos para los tres tipos de transportadores de glicina-betaína descritos en *B. subtilis*: el gen *HNY42_RS02725*, que codifica un transportador del tipo BCCT, OpuD, y los genes *HNY42_RS10560* y *HNY42_RS10565*, que codifican transportadores de tipo ABC, OpuA y OpuC (Hoffmann & Bremer, 2016). Se observa que en fase estacionaria *Exiguobacterium* sp. Helios no presenta sobreexpresión en ninguno de estos sistemas, por lo que es improbable que se sirva de la acumulación de glicina o betaína para tolerar la desecación. No se han encontrado en *Exiguobacterium* sp. Helios genes similares a los descritos en las cinco rutas establecidas para la síntesis de la trehalosa, ni tampoco para la síntesis de betaína y sacarosa. Por esa razón, se asume que esta cepa no produciría trehalosa, betaína, ni sacarosa para ser xerotolerante. Pese a que *Exiguobacterium* sp. Helios tiene los genes responsables de la síntesis de prolina (*HNY42_RS00546*, *HNY42_RS08890*, *HNY42_RS14320*), estos se encuentran subregulados en fase estacionaria y por eso se puede descartar que la producción de prolina sea un mecanismo de xerotolerancia.

En cambio, sí se han encontrado sobreexpresados varios genes de regulación de estrés por peróxido, como el represor transcripcional PerR (*HNY42_RS04800*), cuya implicación en respuesta al estrés oxidativo ha sido descrita en otras bacterias como *Clostridium difficile* (Troitzsch et al., 2021) o la glutatión peroxidasa (*HNY42_RS14525*) que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno utilizando glutatión como agente reductor. La peroxirredoxina (Prx), también presente en el genoma de Helios (*HNY42_RS04185*), y la glutatión peroxidasa (Gpx) son las más estudiadas debido a su papel principal en la protección de las células al daño oxidativo causado por ROS (Bao et al., 2023) (Tabla R2.7). Además, se han encontrado un transportador de metales (*HNY42_RS05805*), especialmente manganeso y hierro, regulado por dos

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

homólogos de la proteína Fur (*HNY42_RS05810* y *HNY42_RS06560*), que podrían estar relacionados con el mantenimiento de un equilibrio Mn^{2+}/Fe^{2+} similar al encontrado en otras bacterias como *D. radiodurans*, que garantiza la protección de los sistemas enzimáticos como cofactor de enzimas esenciales para el ciclo redox intracelular (Santos et al., 2019; Ul Hussain Shah et al., 2014) (Tabla R2.7).

Tabla R2.7. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios relacionados con resistencia al estrés. Se muestran los genes cuyo $|\log_2FC| > 2$.

Locus (HNY42_)	Descripción	\log_2 FC	p valor
<i>RS02620</i>	Proteína A de inanición de carbono	-3,28	N/A
<i>RS04185</i>	Regulador transcripcional de resistencia al hidroperóxido orgánico. Familia Ohr peroxiredoxina	-2,74	$8,64 \times 10^{-5}$
<i>RS04485</i>	Regulador transcripcional, familia Crp/Fnr	-3,69	$4,40 \times 10^{-23}$
<i>RS04800</i>	Represor transcripcional PerR, regulador del estrés por peróxido	5,04	$5,06 \times 10^{-43}$
<i>RS05160</i>	Proteína facilitadora de la absorción de glicerol (acuaporina)	-7,38	$2,57 \times 10^{-15}$
<i>RS05805</i>	Proteína reguladora de la absorción férrica Fur, represor transcripcional	3,45	$6,34 \times 10^{-19}$
<i>RS05810</i>	Permeasa de metales, transportador ABC Proteína de membrana del sistema de transporte de manganeso MntC	2,51	$3,68 \times 10^{-16}$
<i>RS06520</i>	Proteína de unión a ATP de importación de sulfato y tiosulfato CysA	2,01	$1,31 \times 10^{-7}$
<i>RS06560</i>	Proteína reguladora de la absorción férrica Fur, represor transcripcional	2,82	$9,75 \times 10^{-22}$
<i>RS08790</i>	Diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa (dominios GGDEF y EAL) con sensor(es) PAS/PAC	3,13	$2,84 \times 10^{-19}$
<i>RS09940</i>	Regulador transcripcional MarR	3,24	$1,53 \times 10^{-47}$
<i>RS09945</i>	Proteína de resistencia al hidroperóxido orgánico	-4,03	$5,023 \times 10^{-17}$
<i>RS14525</i>	Glutación peroxidasa	4,46	$7,11 \times 10^{-29}$

4.2.7. Reparación de ADN

La familia de proteínas inducibles por daño en el ADN (*damage-inducible, din*) está sobreexpresada en *D. radiodurans*, con 13 genes homólogos, cuya expresión es altamente inducida en respuesta a exposición a la radiación gamma

(radiación γ) y a mitomicina C (MMC) (Appukuttan et al., 2015). El genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios codifica cuatro homólogos específicos de DinB (*HNY42_RS08570*, *HNY42_RS08860*, *HNY42_RS01380*, y *HNY42_RS13495*). Dos de estos genes codificantes de DinB están sobreexpresados (Tabla R.2.8) y podrían desempeñar ese papel protector del ADN en fase estacionaria, mientras que uno de ellos está subexpresado en esta condición.

Es destacable la sobreexpresión de RecF (*HNY42_RS01300*), RecR (*HNY42_RS01415*), RecA (*HNY42_RS06690*), RecU (*HNY42_RS10620*), que son necesarias para la resistencia de las esporas de *B. subtilis* a la rotura de la doble cadena del ADN (Vlašić et al., 2014).

Tabla R2.8. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios relacionados con reparación de ADN.

Locus (<i>HNY42_</i>)	Descripción	log ₂ FC	p valor
<i>RS01300</i>	Proteína de replicación/protección del ADN RecF	3,21	5,89 x 10 ⁻²⁷
<i>RS01380</i>	Proteína de la familia DinB	-2,28	0,002119
<i>RS01415</i>	Mediador de recombinación RecR	2,70	7,15 x 10 ⁻²⁷
<i>RS06690</i>	Recombinasa RecA	1,98	5,33 x 10 ⁻¹⁶
<i>RS08570</i>	Proteína de la familia DinB	1,89	1,95 x 10 ⁻⁹
<i>RS08860</i>	Aciltransferasa/hidrolasa autoproteolítica	3,41	9,56 x 10 ⁻⁴⁷
<i>RS10620</i>	Resolvasa de la unión de Holliday RecU	2,73	3,54 x 10 ⁻¹⁰

4.2.8. Proteínas de respuesta al frío

En el genoma de *Exiguobacterium* sp. helios pueden encontrarse cinco genes que codifican pequeñas proteínas (66 aminoácidos) de respuesta/resistencia al frío (*cold shock proteins*, Csp) (*HNY42_RS10205-HNY42_RS10210-HNY42_RS10215*; *HNY42_RS13925* y *HNY42_00710*), de los cuales tres están diferencialmente sobreexpresados (Tabla R2.9). Muchas bacterias producen estas pequeñas proteínas como respuesta a rápidas bajadas

VI. RESULTADOS. Capitulo 2

de temperatura (*cold shock*). Sin embargo, algunas Csp no son inducibles por frío y se ha descrito que están involucradas en procesos celulares para promover el crecimiento normal y respuestas de adaptación al estrés. Se ha demostrado que las Csp contribuyen a la tolerancia al estrés osmótico, oxidativo, por inanición, por pH y por etanol, además de a la invasión de la célula hospedadora (Keto-Timonen et al., 2016).

Tabla R2.9. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios que codifican Csp

Locus (HNY42_)	Descripción	log ₂ FC	p valor
RS10205	Csp	2,42	2,13 x 10 ⁻⁵
RS10210	Csp	3,54	5,15 x 10 ⁻¹¹
RS10215	Csp	4,78	5,28 x 10 ⁻³²

4.3. Principales diferencias en el transcriptoma de las bacterias desecadas

Como resultado de comparar los transcriptomas de la fase exponencial temprana y después de la desecación de *Exiguobacterium* sp. Helios se obtuvieron 784 genes diferencialmente expresados (DEGs) con $|\log_2 FC| > 2$. Las células de estas dos condiciones provienen del mismo punto de la curva de crecimiento, por lo que el número de DEGs es menor, pero se esperaría que el resultado ponga el foco en los genes más importantes para la xerotolerancia.

Para comenzar a estudiar la expresión diferencial del genoma en fase exponencial temprana frente a la desecación, se clasificaron los genes cuyo $|\log_2 FC| > 2$ (Figura R2.24), y de un total de 660 genes que cumplían ese requisito, 36 se quedaron sin clasificar en ninguna de estas categorías.

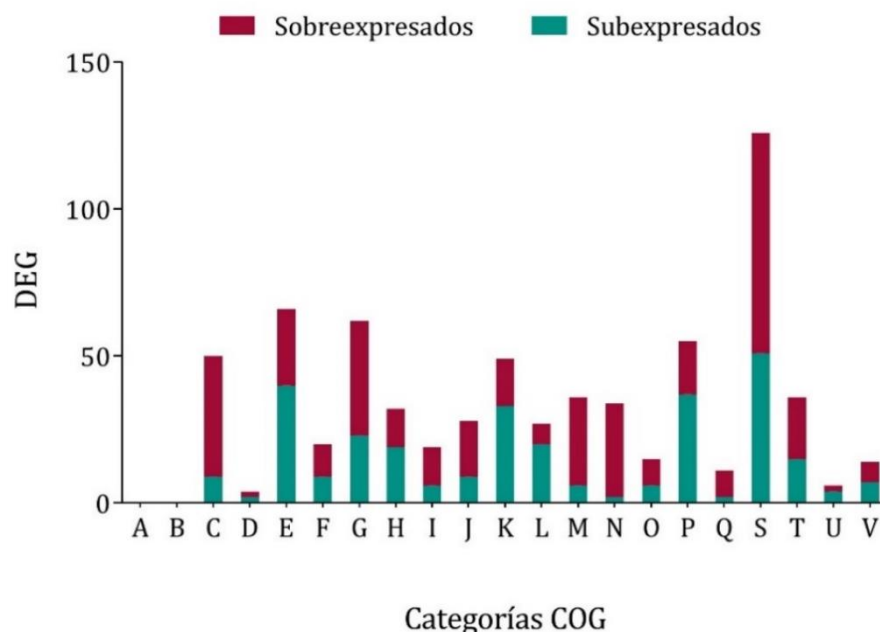


Figura R2.24. Gráfica del número de genes diferencialmente expresados entre la fase exponencial temprana y desecación en cada categoría COG. Se muestran las proporciones de genes sobreexpresados (rojo) y subexpresados (verde). A: Procesamiento y modificación de ARN; B: Estructura y dinámica de la cromatina; C: Producción y conversión de energía; D: Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; H: Transporte y metabolismo de coenzimas; I: Transporte y metabolismo de lípidos; J: Traducción, estructura ribosómica y biogénesis; K: Transcripción; L: Replicación, recombinación y reparación; M: Biogénesis de pared/membrana/envoltura celular; N: Motilidad celular; O: Modificación postraduccional, recambio proteico, acompañantes; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; S: Función desconocida; T: Mecanismos de transducción de señales; U: Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; V: Mecanismos de defensa.

Pueden destacarse algunos DEGs que no aparecían en la transcriptómica de la fase estacionaria, especialmente un número muy elevado de genes relacionados con la producción y la conversión de energía, especialmente los genes que codifican las subunidades de ensamblaje del citocromo c oxidasa (COX) y la ATP sintasa (Tabla R2.10). La COX es el aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria de muchas bacterias que cataliza la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno molecular. Esta reacción está acoplada a la translocación de protones a través de la membrana (Schimo et al., 2017).

VI. RESULTADOS. Capítulo 2

Se observan también subexpresados los genes *HNY42_RS00875*, *HNY42_RS00880*, *HNY42_RS02455*, *HNY42_RS04310* (Tabla R2.10), que codifican las nitroreductasas que metabolizan diversos compuestos nitrogenados, como nitrofuranos, nitrofenoles, nitrobenzenos, nitrobenzoato, nitroimidazoles o nitrotoluenos, utilizando NADH o NADPH como poder reductor. Es posible que en condiciones de desecación estas enzimas tengan un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo como indican algunos estudios, como por ejemplo el equilibrio tiol-disulfuro en la célula lo mantienen algunas proteínas similares a NfsA de *S. aureus* y *B. subtilis*. (Boddu et al., 2020).

Tabla R2.10. DEGs relacionados con producción y conversión de energía. Se muestran los genes cuyo $|\log_2FC| > 2$.

Locus (<i>HNY42_</i>)	Descripción	$\log_2 FC$	<i>p</i> valor
<i>RS04495</i>	Citocromo c oxidasa subunidad II	8,88	$1,38 \times 10^{-23}$
<i>RS04500</i>	Citocromo c oxidasa subunidad I	8,26	$2,83 \times 10^{-33}$
<i>RS05740</i>	Citocromo c	3,82	$4,17 \times 10^{-32}$
<i>RS10720</i>	Citocromo b reductasa subunidad b/c	3,92	$3,30 \times 10^{-114}$
<i>RS10725</i>	Citocromo b	3,82	$5,25 \times 10^{-74}$
<i>RS11715</i>	Citocromo c oxidasa subunidad IV	3,80	$5,27 \times 10^{-17}$
<i>RS11720</i>	Citocromo subunidad ubiquinol oxidasa III	3,98	$3,71 \times 10^{-28}$
<i>RS11725</i>	Citocromo c oxidasa subunidad I	5,16	$4,19 \times 10^{-127}$
<i>RS11730</i>	Citocromo c oxidasa subunidad II	5,59	$8,55 \times 10^{-79}$
<i>RS11875</i>	Citocromo bd subunidad oxidasa terminal II	2,85	$3,83 \times 10^{-24}$
<i>RS11880</i>	Citocromo subunidad ubiquinol oxidasa I	3,148	$4,70 \times 10^{-29}$
<i>RS14955</i>	Ferredoxina	2,82	0,000164
<i>RS15050</i>	ATP sintasa F1 subunidad epsilon	3,51	$4,97 \times 10^{-49}$
<i>RS15055</i>	ATP sintasa F1 subunidad beta	2,92	$5,49 \times 10^{-35}$
<i>RS15060</i>	ATP sintasa F1 subunidad gamma	2,15	$3,34 \times 10^{-15}$
<i>RS15085</i>	ATP sintasa subunidad A	2,44	$2,77 \times 10^{-8}$

CAPÍTULO 3

ESTUDIO METABÓLICO DE *EXIGUOBACTERIUM*

SP. HELIOS

1. Degradación de compuestos de interés

Este capítulo se desarrolla en gran medida no solo para comprobar las capacidades metabólicas de Helios sino también con el objetivo de validar un modelo metabólico de *Exiguobacterium* sp. Helios elaborado elaborado por Arián Ferrero, Paola Corbín y Juli Peretó (Ferrero-Fernández 2022) dentro del grupo de Ingeniería Metabólica de Sistemas del Instituto de Biología Integrativa de Sistemas I2SysBio (UVEG-CSIC). Este modelo metabólico constituye el primero creado para una bacteria del género *Exiguobacterium* y es vital para el análisis de su metabolismo y para su posible manipulación.

El gran número de genes relacionado con el metabolismo de los carbohidratos anotados en el cromosoma de *Exiguobacterium* sp. Helios sugiere una notable habilidad para utilizar varios monosacáridos y carbohidratos poliméricos como fuentes de carbono. Por ejemplo, entre ellos, los genes *HNY42_RS05125* y *HNY42_RS00620* codifican posiblemente una sacarosa-6-fostato hidrolasa y una fructoquinasa, respectivamente, muy probablemente involucradas en el catabolismo de la sacarosa. En el genoma se encuentra también el clúster de utilización de la arabinosa *araBDA* (*HNY42_RS08030-HNY42_RS08040*) y el gen *rbsK* (*HNY42_RS13665*) que codifica la riboquinasa. También se han identificado genes de utilización de lactosa y galactosa como el clúster *HNY42_RS03390-HNY42_RS03405*, entre otros.

Para comprobar que estas anotaciones tenían sentido se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo M63 a 30°C con varios carbohidratos como fuente principal de carbono comprobándose que es capaz de utilizar fructosa, sacarosa, maltosa, glucosa y ribosa (Figura R3.1). Hay que señalar que el cultivo contiene una pequeña cantidad de casaminoácidos para complementar las auxotrofías de la bacteria.

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

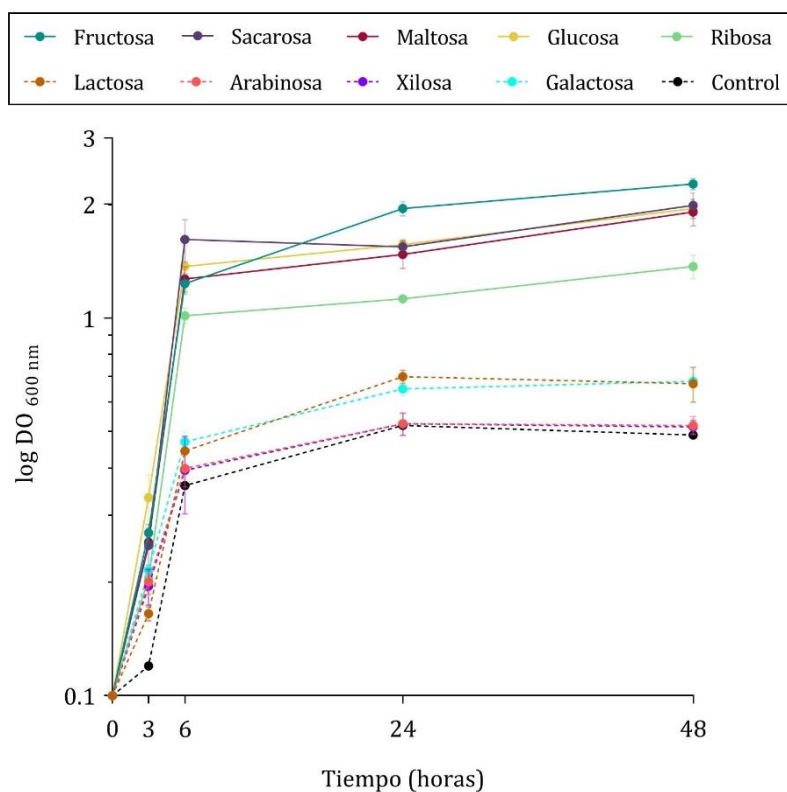


Figura R3.1. Crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios en diferentes azúcares. Se representan con línea discontinua las curvas de crecimiento cuya máxima $DO_{600nm} < 1$. Todos los carbohidratos se adicionaron a una concentración final de 10 mM al medio mínimo M63 conteniendo casaminoácidos ($0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se consideró como control el cultivo sin carbohidrato que presenta un crecimiento reducido gracias a los casaminoácidos.

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios contiene un clúster de 11,7 kb (*HNY42_RS03440-HNY42_RS03510*) que codifica la vía de degradación completa del ácido fenilacético (Figura R2.20).

Los genes *HNY42_00705*, *HNY42_07190*, *HNY42_08240*, *HNY42_08800*, y *HNY42_14205* anotados como proteínas de la familia VOC y/o estradiol dioxigenasas de clase I podrían estar involucradas en la degradación de otros compuestos aromáticos, como 3,4-dihidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato o benzoato. Además, al analizar el genoma se observa que Helios presenta el gen que codifica la 2,3-catecol dioxigenasa (*HNY42_RS02890*), que abre el anillo del catecol en posición meta, pero no se encuentran genes que puedan continuar la ruta de degradación.

Se cultivaron Helios y *E. sibiricum* en medio mínimo M63 a 30°C con diferentes compuestos aromáticos de interés y se pudo comprobar que *Exiguobacterium* sp. Helios crecía en presencia de benzoato, 4-hidroxibenzoato y 3,4-dihidroxibenzoato, aunque no alcanzaba densidades ópticas muy elevadas, pero no crecía utilizando 3-hidroxibenzoato, catecol o gentisato. Se observó que *E. sibiricum* mostraba el mismo comportamiento en presencia de esas fuentes de carbono (Tabla R3.1).

Tabla R3.1. Crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios y *E. sibiricum* 255-15 en diferentes fuentes de carbono. (+) Cuando las células alcanzan una $DO_{600nm} > 0,4$; (+/-) Cuando las células alcanzan una $DO_{600nm} > 0,2$ y $< 0,4$; (-) Cuando las células alcanzan una $DO_{600nm} < 0,2$.

Sustratos	<i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	<i>E. sibiricum</i> 255-15
3,4-dihidroxibenzoato	+	+
3-hidroxibenzoato	-	-
4-hidroxibenzoato	+	+
Benzoato	+	+
Gentisato	-	-
Ácido fenilacético	+	+
Catecol	-	-
3-hidroxibutirato	-	-
Citrato	+	+
Piruvato	+	+
Succinato	+	+

También se comprobó el crecimiento en presencia de algunos compuestos clave del metabolismo central como citrato, piruvato y succinato, y tanto Helios como *E. sibiricum* crecían en estos compuestos (Tabla R3.1).

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

Pese a que se encuentra en el genoma la ruta de utilización del 3-hidroxi-butirato, incluida su permeasa (*HNY42_RS07410-HNY42_RS07430*) en un pequeño clúster típico y bien organizado de 4,8 kb (Figura R3.2), no se ha observado crecimiento al cultivar *Exiguobacterium* sp. Helios en presencia de este compuesto (Tabla R3.1).

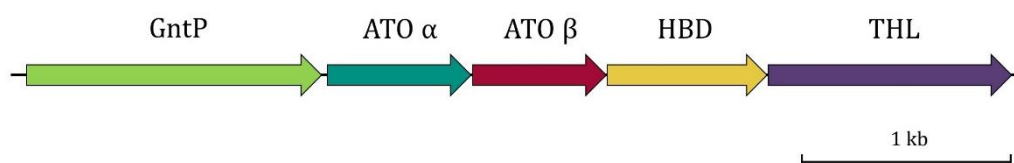


Figura R3.2. Clúster de genes involucrados en la ruta de degradación aerobia del 3-hidroxi-butirato en *Exiguobacterium* sp. Helios. GntP: permeasa. ATO α/β: acetoacil transferasa α o β. HBD: 3-hidroxi-butiril deshidrogenasa. THL: acetoacil-CoA tiolasa.

2. Estudio del metabolismo anaerobio en *Exiguobacterium* sp. Helios

El género *Exiguobacterium* está clasificado como anaerobio facultativo (Kasana & Pandey, 2018; Vishnivetskaya et al., 2009), por lo que se propuso determinar si la cepa Helios también presentaba esta capacidad.

En particular, en su genoma se ha encontrado el gen *pflB* (*HNY42_RS04545*) que codifica una enzima perteneciente a una familia de enzimas necesarias para el crecimiento en anaerobiosis como la formato-C-acetiltransferasa, y su activasa *pflA* (*HNY42_RS04540*), que se encuentran en muchas bacterias que crecen en anaerobiosis como *Haemophilus influenzae*, *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. y algunos *Streptococcus*. La enzima PflB cataliza la conversión reversible de piruvato en formiato, produciendo acetil-CoA (Leibig et al., 2011).

Por otro lado, se ha identificado el gen *adhE* (*HNY42_RS07800*), que codifica una acetaldehído/alcohol deshidrogenasa bifuncional que participa en los pasos finales de la fermentación de etanol en muchos anaerobios mediante dos reacciones rédox reversibles: de acetil-CoA a acetaldehído, y de acetaldehído a

etanol (Wang et al., 2021). También se ha encontrado el gen *ldh* (*HNY42_RS05920*) que codifica una lactato deshidrogenasa (LDH) que convierte el piruvato en lactato durante la fermentación anaerobia (Larsson et al., 2005). Además, se han identificado algunos genes relacionados con funciones básicas de la célula, como la síntesis de desoxirribonucleótidos, precursores del ADN. Los genes *nrdD* (*HNY42_RS06810*) y *nrdG* (*HNY42_RS06815*) codifican las dos subunidades de una ribonucleótido reductasa (RNR) de clase III. La enzima NrdD es la subunidad catalítica y la proteína NrdG es la activasa y responsable de generar un radical glicilo extremadamente sensible al oxígeno, por lo que sólo es activa en condiciones anaeróbicas (Torrents, 2014).

Con toda esta información parecía razonable pensar que Helios era capaz de crecer en anaerobiosis. Por ello, se comprobó la capacidad de crecimiento en ausencia de oxígeno de la cepa *Exiguobacterium* sp. Helios realizando cultivos en botellas de anaerobiosis, inoculando diferentes medios ricos (TSB, TGY, LB y LB suplementado con glucosa) con una DO_{600nm} inicial de 0,1. Se estudió su crecimiento monitorizando la absorbancia de los cultivos y se observó que la cepa Helios era capaz de crecer en anaerobiosis, alcanzando mejores resultados en los medios TSB y LB con glucosa (Figura R3.3).

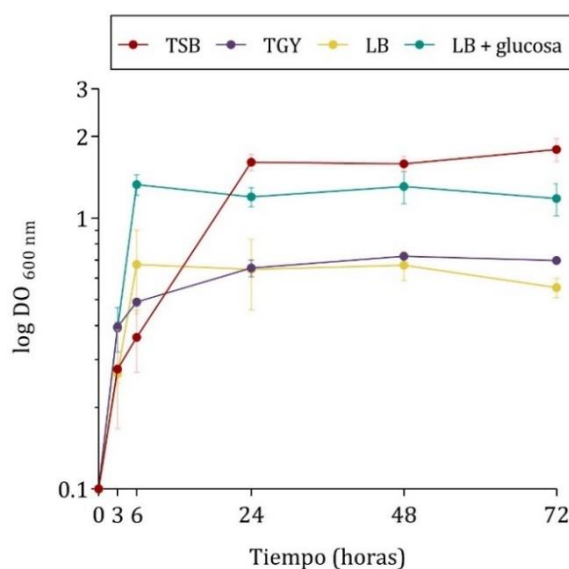


Figura R3.3. Crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios en diferentes medios ricos en condiciones de anaerobiosis. Se emplearon los medios ricos TSB, TGY, LB y LB suplementado con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa. La gráfica representa el promedio de DO_{600nm} correspondiente a tres réplicas biológicas junto con la desviación estándar.

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

Se estudió también el crecimiento en anaerobiosis en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono, en presencia o ausencia de nitrato potásico (KNO_3) para evaluar si el metabolismo anaerobio se produce por respiración o por fermentación. Se pudo observar que *Exiguobacterium* sp. Helios crece mejor en presencia de KNO_3 , que es utilizado como aceptor de electrones en la respiración, pero que también es capaz de crecer sin nitrato en presencia de glucosa, indicando que se está produciendo una fermentación (Figura R3.4.A).

Además, se analizó la capacidad de Helios de crecer en microaerofilia, empleando las mismas botellas de anaerobiosis, pero sin eliminar por completo el oxígeno, limitando el porcentaje de aire en el cultivo. Las diferencias en el crecimiento al variar el porcentaje de aire en el cultivo son muy pequeñas, aunque se observa un peor crecimiento en los cultivos con 10% de aire (Figura R3.4.B).

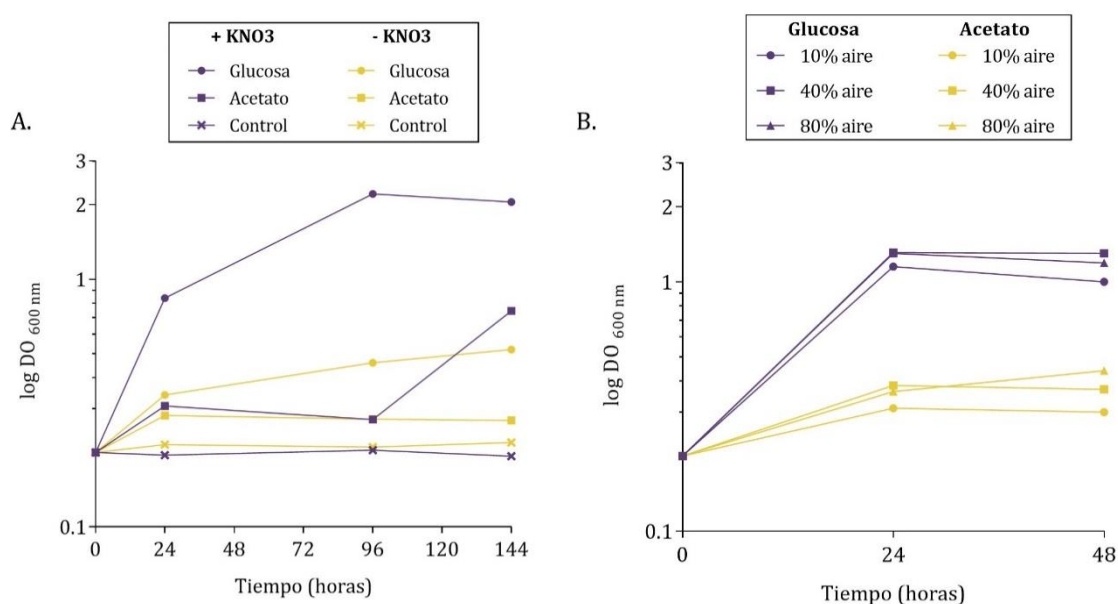


Figura R3.4. Crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios en medio mínimo en condiciones de anaerobiosis (A) y microaerofilia (B) Las fuentes de carbono se emplearon a una concentración final de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y se consideró como control el cultivo sin fuente de carbono (casaminoácidos a $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Las gráficas representan el promedio de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ correspondiente a dos réplicas biológicas.

3. Estudio de las auxotrofías de *Exiguobacterium* sp. Helios

3.1. Metabolismo del azufre

El análisis de los datos obtenidos con el modelo metabólico de *Exiguobacterium* sp. Helios destacó la ausencia de los genes esenciales para la activación del sulfato y su transformación en sulfito (Ferrero-Fernández 2022). Al igual que se había descrito en *E. sibiricum* (Rodrigues et al., 2008), no se encontraron genes que codificaran la ATP sulfurilasa, APS (adenosina 5'-fosfosulfato) reductasa o la APS quinasa y la PAPS (3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato) reductasa, aunque sí se encontraron genes que codificaban la sulfito reductasa (*HNY42_RS03245*) y la cisteína sintasa (*HNY42_RS01695*) (Figura R3.5). Esto sugiere que Helios requiere una fuente orgánica de azufre, como la metionina o la cisteína.

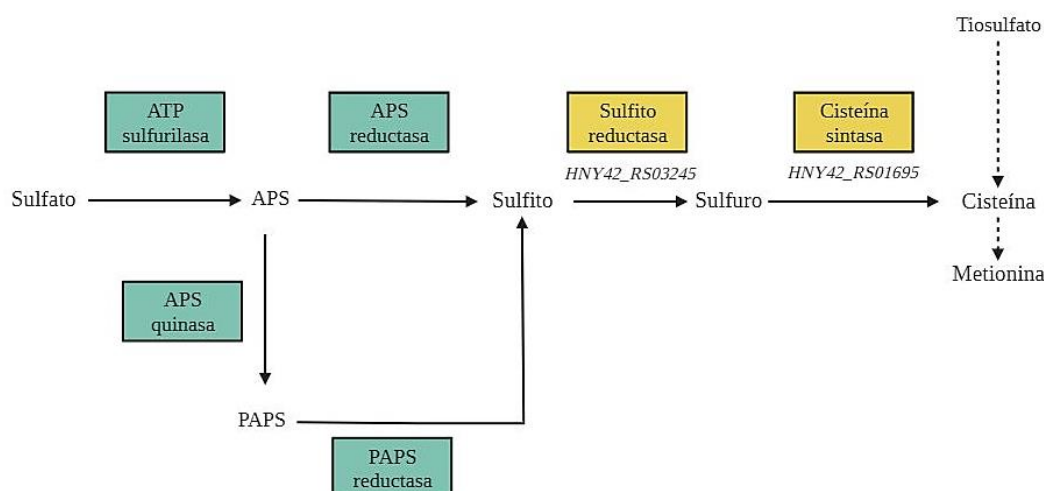


Figura R3.5. Ruta clásica de asimilación de sulfato en bacterias. Se indican en amarillo las enzimas de la ruta con homólogos en *Exiguobacterium* sp. Helios. Modificado de (Williams et al., 2002).

3.2. Aminoácidos de cadena ramificada

El modelo metabólico a escala genómica de *Exiguobacterium* sp. Helios (Ferrero-Fernández 2022) sugería que faltaban las enzimas de la ruta clásica de biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada, leucina, valina e isoleucina, de la misma forma que ocurre en *E. sibiricum* (Rodrigues et al., 2008). Al realizar

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

un estudio comparativo con el genoma de *B. subtilis* 168 se pudo determinar que había genes homólogos para dos de las ocho enzimas de la ruta, indicados en amarillo en la [Figura R3.6](#), que son *ileE* (*HNY42_RS03955*), que codifica la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada y *leuB* (*HNY42_RS12805*), que codifica la 3-isopropilmalato deshidrogenasa.

Por ello, se analizó el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios en busca de genes homólogos para alguna de las rutas alternativas para la síntesis de estos aminoácidos. Existen varios precedentes de rutas alternativas que coexisten con la ruta clásica descritos en microorganismos anaerobios, como la biosíntesis de leucina a partir de isovalerato en *Bacteroides ruminicola* y *Bacteroides fragilis* (Allison et al., 1984), la biosíntesis de isoleucina por una ruta dependiente de citramalato en *Geobacter sulfurreducens* (Risso et al., 2008) o en las cianobacterias *Leptospira interrogans* (Xu et al., 2004) y *Cyanothece* spp. (Wu et al., 2010), que también sintetizan isoleucina a través de la ruta dependiente de citramalato. Ninguna de estas rutas está presente en el genoma de Helios.

4. Estudio del metabolismo del acetato en *Exiguobacterium* sp. Helios

Aunque *Exiguobacterium* sp. Helios es capaz de crecer en acetato como única fuente de carbono, es sorprendente que el modelo metabólico a escala genómica no contenga ciclo de glioxilato ni ninguna de las rutas de asimilación de acetato descritas hasta la fecha (Ferrero-Fernández 2022). Además, la comparación de los genomas disponibles del género *Exiguobacterium* muestra que ninguno de los miembros del Clado I presenta los genes para las enzimas clave del ciclo del glioxilato (isocitrato liasa y malato sintasa), mientras que todos los genomas pertenecientes al Clado II sí que los contienen (Ferrero-Fernández 2022).

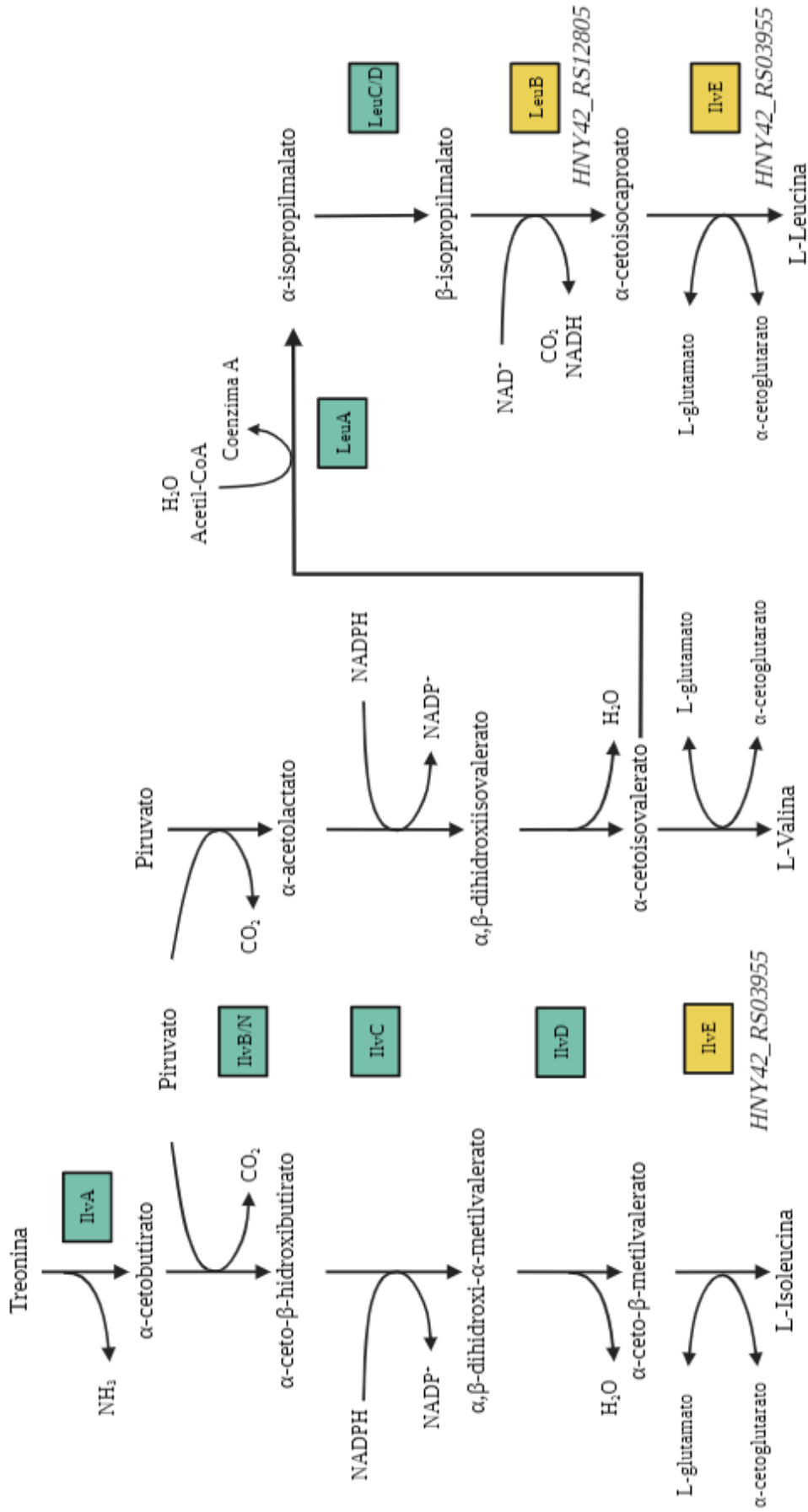


Figura R3.6. Ruta de biosíntesis de los aminoácidos ramificados en *B. subtilis*. Se indican en amarillo las enzimas de la ruta con homólogos en *Exiguobacterium* sp. Helios. Adaptado de la entrada de KEGG bsu01230.

Existen otras rutas descritas para el metabolismo del acetato que también se analizaron. En este sentido, se sabe que en ausencia de la isocitrato liasa algunas rutas de asimilación de acetato en metilotrofos y bacterias púrpuras parten de la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA en acetoacetyl-CoA, y después continúan hacia 3-hydroxybutyryl-CoA. A partir de este punto hay diferentes variantes, en la primera se genera mesaconyl-CoA, que después es hidratado y escindido hasta formar glyoxylate y propionyl-CoA. En la otra versión, denominada regeneración del ciclo del glyoxylate, el 3-hydroxybutyryl-CoA sufre una deshidratación y una reducción a butyryl-CoA, que después de una carboxilación pasa a ethylmalonyl-CoA, concluyendo con la formación de succinate (Ensign, 2006).

En el género *Clostridium* se ha descrito la utilización de acetato a través de la β -oxidación inversa, transformando el acetato en acetyl-CoA mediante una acetato quinasa y una fosfotransacetylase (Kutscha & Pflügl, 2020). En algunas bacterias reductoras de sulfato, el acetato se metaboliza completamente a CO₂ mediante el ciclo de Krebs formando acetyl-CoA a partir de acetato mediante una succinyl-CoA:acetate-CoA transferase; otras bacterias reductoras de sulfato, emplean una vía inversa de Wood-Ljungdahl para crecer en acetato (Kutscha & Pflügl, 2020). Utilizando esta información se comprobó que Helios no posee genes homólogos de ninguna de estas otras rutas descritas para la utilización del acetato como única fuente de carbono y energía.

4.1. Crecimientos en matraz

Resultó interesante comprobar que en la bibliografía se hacía referencia a que *E. sibiricum*, *E. undae* y *E. acetylicum* eran capaces de usar el acetato como fuente de carbono, aunque estos datos no se habían comprobado en cultivo líquido y no era evidente que el acetato pudiese ser utilizado como fuente exclusiva de carbono y energía (Rodrigues et al., 2006).

Con el objetivo de confirmar el crecimiento de *Exiguobacterium* sp. Helios en presencia de acetato se cultivó en medio mínimo M63 con 4 g·L⁻¹ de acetato sódico en presencia de casaminoácidos, y se comparó con cultivos en las mismas condiciones de la cepa *P. putida* DOC 21, que consume acetato por la vía del

glioxilato, y su mutante *P. putida* DOC 21 Δ 33, que tiene deletado el gen que codifica la isocitrato liasa. Los experimentos se realizaron tanto en cultivo líquido (Figura R3.7.A) como en placa (Figura R3.7.B). Se pudo observar que Helios crecía en presencia de acetato con menor eficiencia que la cepa DOC 21, pero claramente mejor que el mutante carente de la ruta del glioxilato que mostraba un crecimiento residual debido a los casaminoácidos.

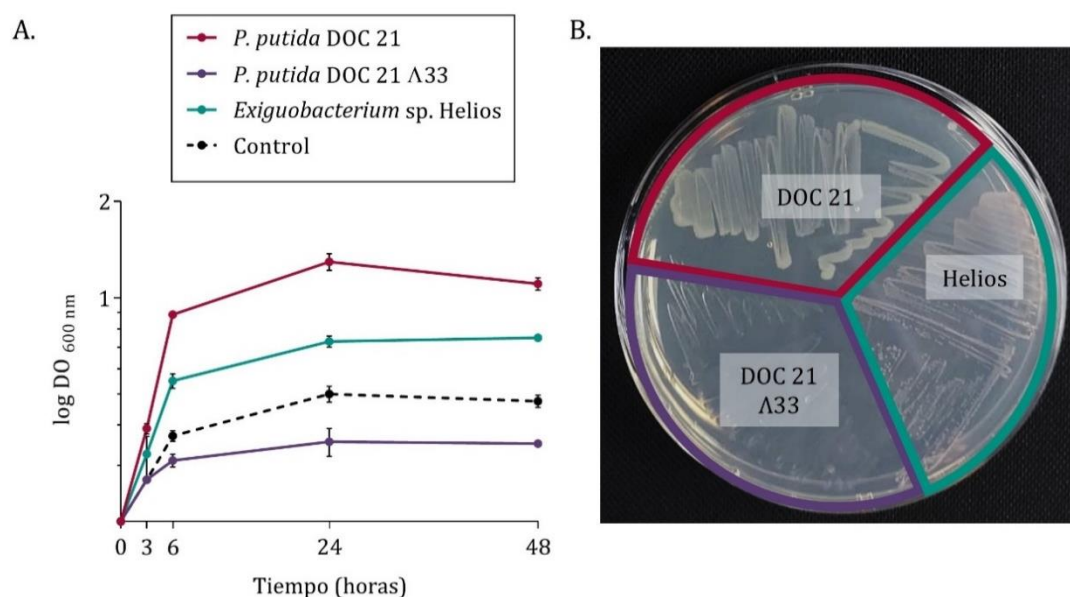


Figura R3.7. Confirmación del crecimiento en acetato sódico de *Exiguobacterium* sp. Helios en cultivo líquido (A) o en placa (B). Se utilizó como control positivo *P. putida* DOC 21 y como control negativo el mutante de la ruta del glioxilato *P. putida* DOC 21 Δ 33. Las gráficas representan el promedio de DO_{600nm} correspondiente a dos réplicas biológicas.

También se estudió el crecimiento de otras dos cepas del género *Exiguobacterium* en medio mínimo M63 en presencia de acetato, y se comparó con su crecimiento en glucosa. Para este ensayo se probaron las cepas *E. sibiricum* y *E. antarcticum*, además de Helios. Se pudo observar que, mientras que todas las cepas crecían hasta superar una DO_{600nm} de más de 1 con glucosa (Tabla R3.2), solamente *Exiguobacterium* sp. Helios era capaz de crecer en el medio con acetato como única fuente de carbono (Tabla R3.2). El crecimiento residual en acetato se debe a los casaminoácidos.

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

Tabla R3.2. Crecimiento de varias cepas del género *Exiguobacterium* en medio mínimo M63 con glucosa y acetato. El control de cultivo sin fuente de carbono, sólo casaminoácidos a 0,4 g·L⁻¹ creció hasta una DO_{600nm} 0,4 partiendo de un preinóculo de DO_{600nm} 0,1.

Cepa	Glucosa (DO _{600nm} 24h)	Acetato (DO _{600nm} 24h)
<i>Exiguobacterium</i> sp. Helios	1,27	0,75
<i>E. sibiricum</i>	1,34	0,4
<i>E. antarcticum</i>	1,46	0,4

4.4. Análisis transcriptómico en presencia de acetato

Dado que Helios es capaz de crecer en presencia de acetato como única fuente de carbono y energía, y que no parece tener los genes de ninguna ruta descrita hasta la fecha para el consumo de acetato, se propuso analizar mediante un enfoque transcriptómico la expresión diferencial de *Exiguobacterium* sp. Helios cultivado en presencia de acetato frente a otra fuente de carbono como la glucosa.

Para comenzar el estudio de la expresión diferencial del genoma en presencia de acetato frente a glucosa, se clasificaron según sus categorías COG los genes cuyo $|\log_2FC| > 2$. Se encontraron un total de 178 genes que cumplían ese requisito de sobreexpresión o subexpresión, y de estos solo 15 se quedaron sin clasificar en ninguna de las categorías (Figura R3.8). El resto de genes analizados (un total de 2893) mantienen un nivel de expresión similar en glucosa y acetato.

En un análisis global se puede apreciar que hay una gran mayoría de genes sobreexpresados en comparación con los subexpresados en acetato. En este sentido destaca una gran mayoría de genes sobreexpresados de función desconocida, lo que complica mucho el análisis previsto, ya que es difícil especular sobre su posible función y sugiere que puede haber rutas alternativas que serán difíciles de clasificar.

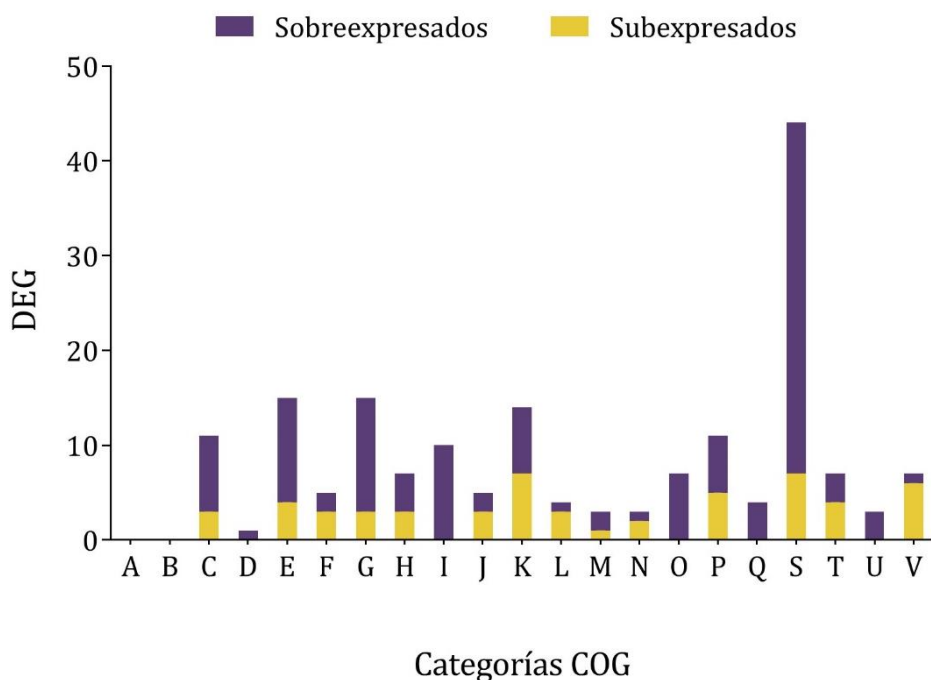


Figura R3.8. Gráfica del número de genes diferencialmente expresados en presencia de acetato frente a glucosa en cada categoría COG. Se muestran el número de genes sobreexpresados (morado), subexpresados (amarillo). A: Procesamiento y modificación de ARN; B: Estructura y dinámica de la cromatina; C: Producción y conversión de energía; D: Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica; E: Transporte y metabolismo de aminoácidos; F: Transporte y metabolismo de nucleótidos; G: Transporte y metabolismo de carbohidratos; H: Transporte y metabolismo de coenzimas; I: Transporte y metabolismo de lípidos; J: Traducción, estructura ribosómica y biogénesis; K: Transcripción; L: Replicación, recombinación y reparación; M: Biogénesis de pared/membrana/envoltura celular; N: Motilidad celular; O: Modificación postraduccional, recambio proteico, acompañantes; P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q: Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; S: Función desconocida; T: Mecanismos de transducción de señales; U: Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; V: Mecanismos de defensa.

El primer aspecto que se analizó fue la expresión de los genes responsables del transporte del acetato y de su conversión en acetil-CoA. El acetato se puede transformar en acetil-CoA mediante dos reacciones reversibles catalizadas por acetato quinasa (AK) y fosfotransacetilasa (PTA) o mediante una reacción irreversible mediada por la acetil-CoA sintetasa (ACS) (Kutscha & Pflügl, 2020). En este sentido se observó que en presencia de glucosa la ruta de formación de acetil-CoA via PTA y AK esta sobreexpresada y, sin embargo, en presencia de acetato la

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

formación de acetil-CoA depende de la ACS (Tabla R3.3). Resulta sorprendente que el posible transportador de acetato ActP (*HNY42_RS00380*), aparece subexpresado en el transcriptoma en línea con la subexpresión de PTA y AK, sugiriendo que este transportador funcionaría solo durante el metabolismo de la glucosa para recuperar el posible acetato secretado (Tabla R3.3).

Se analizaron las rutas que utilizan el acetil-CoA como sustrato. La acetil-CoA carboxilasa transforma el acetil-CoA en malonil-CoA, que es a su vez es transformado a malonil ACP por la malonil-CoA ACP transacetilasa y seguidamente en acetoacetil-ACP por la acetoacetil-ACP sintasa III, y de esta forma se inicia la biosíntesis de ácidos grasos. Los genes que codifican para estas enzimas (Tabla R3.4) tienen un nivel de expresión muy similar tanto en presencia de glucosa como de acetato.

Se ha observado que los genes *pflB* (*HNY42_RS04545*), *pflA* (*HNY42_RS04540*), *adhE* (*HNY42_RS07800*), y *ldh* (*HNY42_RS05920*) (Tabla R3.5), que habían sido identificados en el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios como parte del metabolismo en anaerobiosis, están subexpresados en presencia de acetato, es decir, se están sobreexpresando en presencia de glucosa, indicando que se está produciendo fermentación alcohólica.

Tabla R3.3. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en el transporte y en la transformación del acetato en acetil-CoA del acetato. Se muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos (% aa) comparados con *B. subtilis* 168.

Locus (<i>HNY42_</i>)	Función definida en <i>B subtilis</i> 168	Nº acceso %aa	log ₂ FC	p valor
<i>RS00380</i>	Transportador ActP	P39599.2 73,68	-0,39	0,174056
<i>RS02580</i>	Fosfato acetiltransferasa PTA	P39646.3 66,98	0,28	0,409717
<i>RS12890</i>	Acetato quinasa AK	P37877.1 68,69	-0,50	0,116430
<i>RS12945</i>	Acetil-CoA sintetasa ACS	P39062.1 70,18	3,74	3,50 x 10 ⁻²²

Tabla R3.4. Genes de *Exiguobacterium* sp. Helios que utilizan el acetil-CoA como sustrato. Se muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos (% aa) comparados con *B subtilis* 168.

Locus (HNY42_)	Función definida en <i>B subtilis</i> 168	Nº acceso %aa	log ₂ FC	p valor
RS12830	Acetil-CoA carboxilasa carboxiltransferasa subunidad α (<i>accA</i>)	O34847.1 67,43	0,03	0,934972
RS12835	Acetil-CoA carboxilasa carboxiltransferasa subunidad β (<i>accD</i>)	C0SP93.1 55,12	-0,49	0,285146
RS06075	Acetil-CoA carboxilasa proteína transportadora de biotina-carboxilo (<i>accB</i>)	P49786.2 32,69	1,16	0,036814
RS06080	Acetil-CoA carboxilasa subunidad carboxilasa de biotina (<i>accC</i>)	P49787.3 64,25	-0,47	0,285695
RS11335	Malonil-CoA ACP transacetilasa (<i>fadD</i>)	P71019.2 43,28	0,47	0,224855
RS12100	Acetoacetil-ACP sintasa III (<i>fadH</i>)	O34746.1 49,36	-0,17	0,705804

Tabla R3.5. DEGs del metabolismo anaerobio de *Exiguobacterium* sp. Helios.

Locus (HNY42_)	Descripción	log ₂ FC	p valor
RS04540	Activasa <i>pflA</i>	-2.26	2,88 x 10 ⁻⁶
RS04545	Formato-C-acetiltransferasa <i>pflB</i>	-1,80	1,80 x 10 ⁻⁷
RS05920	Lactato deshidrogenasa <i>ldh</i>	-2,25	1,23 x 10 ⁻⁵
RS07800	Acetaldehído/alcohol deshidrogenasa bifuncional <i>adhE</i>	-2,29	1,86 x 10 ⁻⁷

Se analizaron los genes de metabolismo central y sus rutas anapleróticas (TablaR3.6). Es destacable la presencia de una malato quinona oxidoreductasa (HNY42_RS01035) alternativa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a la malato deshidrogenasa (HNY42_RS12800), y que se encuentra sobreexpresada en acetato (log₂ FC = 1,63). Esta enzima es energéticamente más favorable que la malato deshidrogenasa y realiza el paso de malato a oxalacetato de forma irreversible (Förster-Fromme & Jendrossek, 2005; Harold et al., 2022).

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

Tabla R3.6. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en el ciclo de Krebs. Se muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos (% aa) comparados con *B. subtilis* 168.

Locus (HNY42_)	Función definida en <i>B subtilis</i> 168	Nº acceso %aa	log ₂ FC	p valor
RS07285	Aconitasa	P09339.4 69,87	1,18	0,002588
RS10305	α-cetoglutarato deshidrogenasa E2	P16263.2 66,11	0,42	0,238358
RS10310	α-cetoglutarato deshidrogenasa E1	P23129.3 57,96	1,33	0,001591
RS10505	Fumarato hidratasa	P07343.2 70,65	-0,45	0,299578
RS10850	Glutamato deshidrogenasa	P50735.2 81,80	2,15	3,96 x 10 ⁻⁷
RS11240	Succinil-CoA sintetasa α	P80865.3 76,59	0,46	0,197899
RS11245	Succinil-CoA sintetasa β	P80886.2 73,51	1,39	0,000195
RS11750	Piruvato carboxilasa	Q9KWU4.1 67,37	-0,59	0,065322
RS12210	Aspartato aminotransferasa	P53001.1 61,64	-1,11	0,005704
RS12565	Succinato deshidrogenasa	P08066.3 77,60	0,21	0,553975
RS12800	Malato deshidrogenasa	P49814.3 75,08	-0,79	0,031948
RS12805	Isocitrato deshidrogenasa	P39126.1 85,24	-0,23	0,460366
RS12810	Citrato sintasa	P39120.2 63,88	1,69	0,000413
RS12820	Forfoenolpiruvato carboxiquinasa	P54418.3 64,18	3,35	1,77 x 10 ⁻¹³

Se puede observar que están sobreexpresados los genes que codifican las enzimas que catalizan el paso de α-cetoglutarato a succinil-CoA y éste a succinato, produciendo ATP, y el paso de malato a oxalacetato (mediante la malato quinona oxidoreductasa) y éste a citrato y después a isocitrato, con el gasto de acetil-CoA y la liberación de coenzima A.

La piruvato carboxilasa (*HNY42_RS11750*) que cataliza el paso de piruvato a oxalacetato está subexpresada en presencia de acetato. Esta enzima es dependiente de ATP y de biotina, y se activa alostéricamente por acetil-CoA. Por el contrario, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*HNY42_RS13175*) está sobreexpresada en presencia de acetato, por lo que se estaría formando fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato.

Por otro lado, el α -cetoglutarato del ciclo de Krebs podría estar siendo repuesto a partir de glutamato, ya que está sobreexpresada la glutamato deshidrogenasa (*HNY42_RS10850*).

Resulta muy interesante comprobar que en presencia de acetato los genes de la ruta de formación de butiril-CoA (Tabla R3.7) se encuentran sobreexpresados. Dos moléculas de acetil-CoA se pueden condensar para formar acetoacetil-CoA mediante la enzima THL (*HNY42_RS13505*). Posteriormente, la enzima bifuncional BHBD/CRO (*HNY42_RS13510*) transformaría el acetoacetil-CoA en hidroxibutiril-CoA y crotonil-CoA.

Tabla R3.7. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en la degradación del acetato. Se muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos (% aa).

Locus (<i>HNY42_</i>)	Función definida en <i>B subtilis</i> 168	Nº acceso %aa	log ₂ FC	p valor
RS07415	Butiril-CoA:acetoacetato CoA transferasa subunidad A (ATO)	NP_391778.1 69,57	-1,04	0,018402
RS07420	Butiril-CoA:acetoacetato CoA transferasa subunidad B (ATO)	NP_391777.1 75,71	-0,97	0,037895
RS12610	Flavoproteína de transferencia de electrones subunidad alfa FixB	NP_390730.1 64,49	4,25	3,49 x 10 ⁻¹⁸
RS12615	Flavoproteína de transferencia de electrones subunidad beta FixA	NP_390731.1 70,82	4,49	7,51 x 10 ⁻²⁴
RS13500	Butiril-CoA deshidrogenasa BCD	NP_391161.1 65,66	4,84	2,27 x 10 ⁻¹³
RS13505	Acetil-Coa acetiltransferasa / acetoacetil-CoA tiolasa THL	NP_391162.1 69,74	5,17	2,23 x 10 ⁻¹⁷
RS13510	Enoil-CoA hidratasa / 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa bifuncional BHBD/CRO	NP_391163.2 58,84	6,53	2,01 x 10 ⁻⁴⁴

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

La conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA se catalizaría por el complejo BCD (*HNY42_RS13500*) FixAB (*HNY42_RS12610* y *HNY42_RS12615*) dependiente de ferredoxina (*HNY42_RS10885*). Finalmente, el butiril-CoA se transformaría en butiril fosfato y posteriormente en butirato, mediante las enzimas PTB (*HNY42_RS06145*) y BUK (*HNY42_RS06155*), y como consecuencia se produciría butirato (Kutscha & Pflügl, 2020) (Figura R3.9).

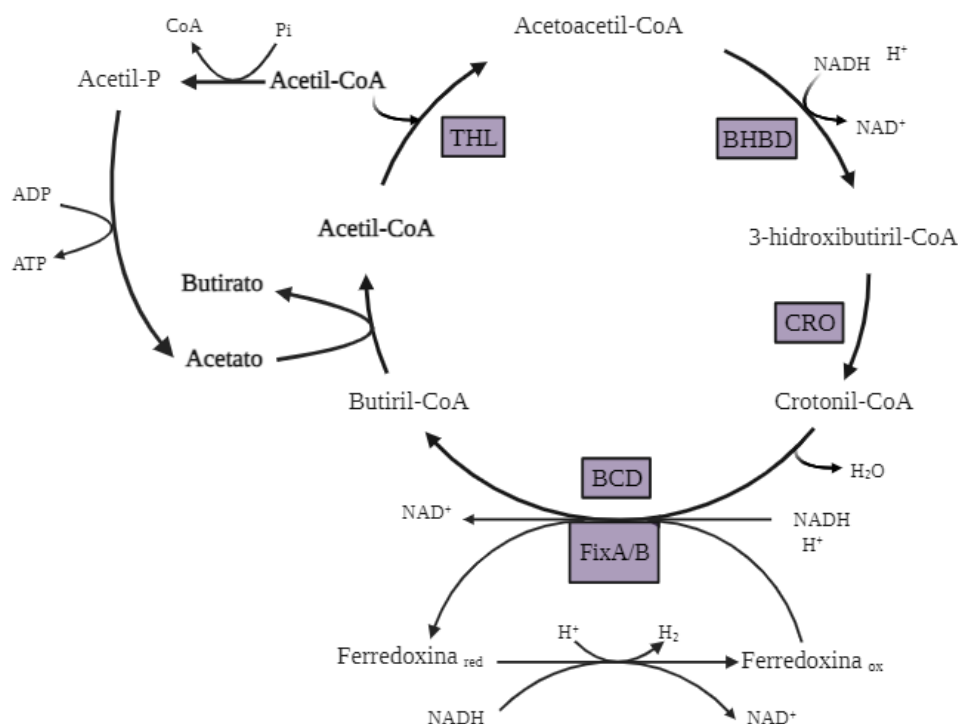


Figura R3.9. Ruta de síntesis del butiril-CoA. Se indican las enzimas presentes en *Exiguobacterium* sp. Helios y sobreexpresadas en presencia de acetato. Adaptado de Kutscha & Pflügl, (2020).

Un resultado en gran medida sorprendente fue encontrar que el clúster que codifica la ruta de degradación del fenilacético está muy sobreexpresado en *Exiguobacterium* sp. Helios en presencia de acetato (Tabla R3.8). Esta ruta está contigua en el genoma a la ruta de degradación de fenilalanina (*HNY42_RS03415*-*HNY42_RS03435*), que también se encuentra sobreexpresada en estas condiciones.

Tabla R3.8. DEGs de *Exiguobacterium* sp. Helios involucrados en la ruta de degradación del ácido fenilacético.

Gen	Locus (HNY42_)	Descripción	log ₂ FC	p valor
<i>paaK</i>	RS03445	Fenilacetato-CoA ligasa	6,13	5,33 x 10 ⁻²⁸
<i>paaA</i>	RS03450	1,2-fenilacetil-CoA epoxidasa subunidad A	5,45	8,11 x 10 ⁻¹⁹
<i>paaB</i>	RS03455	1,2-fenilacetil-CoA epoxidasa subunidad B	4,53	9,28 x 10 ⁻⁹
<i>paaC</i>	RS03460	Fenilacetato-CoA oxigenasa subunidad C	4,79	9,28 x 10 ⁻²³
<i>paaD</i>	RS03465	Fenilacetato-CoA oxigenasa subunidad D	5,22	7,13 x 10 ⁻¹⁵
<i>paaE</i>	RS03470	Reductasa de la familia EthD	6,42	1,31 x 10 ⁻¹⁸
<i>paaF</i>	RS03475	Enoil-CoA hidratasa	4,14	4,46 x 10 ⁻¹⁴
<i>paaZ</i>	RS03480	Aldehído deshidrogenasa	4,88	7,44 x 10 ⁻¹⁷
<i>paaH</i>	RS03485	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	3,10	2,33 x 10 ⁻⁸
<i>paaJ</i>	RS03490	Acetil-CoA C-aciltransferasa	2,10	4,96x 10 ⁻⁵
<i>paaG</i>	RS03495	Enoil-CoA hidratasa	3,22	4,15 x 10 ⁻⁹
<i>paaX</i>	RS03500	Proteína de regulación negativa del operón de degradación del ácido fenilacético	1,34	0,005383

Por otro lado, es interesante reseñar la existencia de una tioesterasa (*HNY42_RS03440*), que es homóloga a la fluoroacetil-CoA tioesterasa de *Streptomyces cattleya*, que cataliza la hidrólisis de fluoroacetil-CoA a fluoroacetato, que actúa como un sistema de defensa para evitar que el fluoroacetil-CoA pueda entrar en el ciclo de Krebs e inhibirlo (Dias et al., 2010). Para comprobar la posible implicación de esta enzima en el metabolismo de Helios se realizó un experimento en el que se estudió la concentración mínima inhibitoria (MIC) de una serie de compuestos fluorados como 3-fluoroacetato, 2-fluorfenilacético, 3-fluorfenilacético y 4-fluorfenilacético utilizando el medio de cultivo LB. Los resultados se muestran en la [Tabla R3.9](#), donde se puede observar que *Exiguobacterium* sp. Helios es capaz de crecer en presencia de concentraciones muy altas de estos compuestos.

Tabla R3.9. Concentraciones mínimas inhibitorias de compuestos fluorados en *Exiguobacterium* sp. Helios.

Compuesto	MIC (mM)
2-fluorofenilacético	10
3-fluorofenilacético	10
4-fluorofenilacético	15
3-fluoroacetato	10

Otro resultado que de momento no tiene una explicación evidente es que el gen más sobreexpresado (\log_2 FC = 9,52) en el transcriptoma de *Exiguobacterium* sp. Helios en presencia de acetato es un transportador de carbohidratos tipo ABC (*HNY42_RS04440*) no caracterizado, pero que presenta un dominio conservado presente en los genes *ugp* de *E. coli*, que codifican un sistema de absorción para diésteres de sn-glicerol-3-fosfato y glicerol 3-fosfato (Wuttge et al., 2012).

4.5. Hipótesis propuesta para la utilización del acetato como fuente de carbono y energía

A partir de los datos anteriores no se puede inferir cómo se puede conseguir una ruta anaplerótica que explique el crecimiento de Helios en acetato. Sin embargo, el modelo metabólico a escala genómica (Ferrero-Fernández 2022) sugiere una vía alternativa y nueva basada en la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa PFOR (*HNY42_RS06710*, *HNY42_RS06715*), como se muestra en la [Figura R3.10](#). Los niveles de expresión de PFOR y de la ferredoxina que emplean para el equilibrio rédox (*HNY42_RS10885*) son muy similares tanto en presencia de glucosa como de acetato.

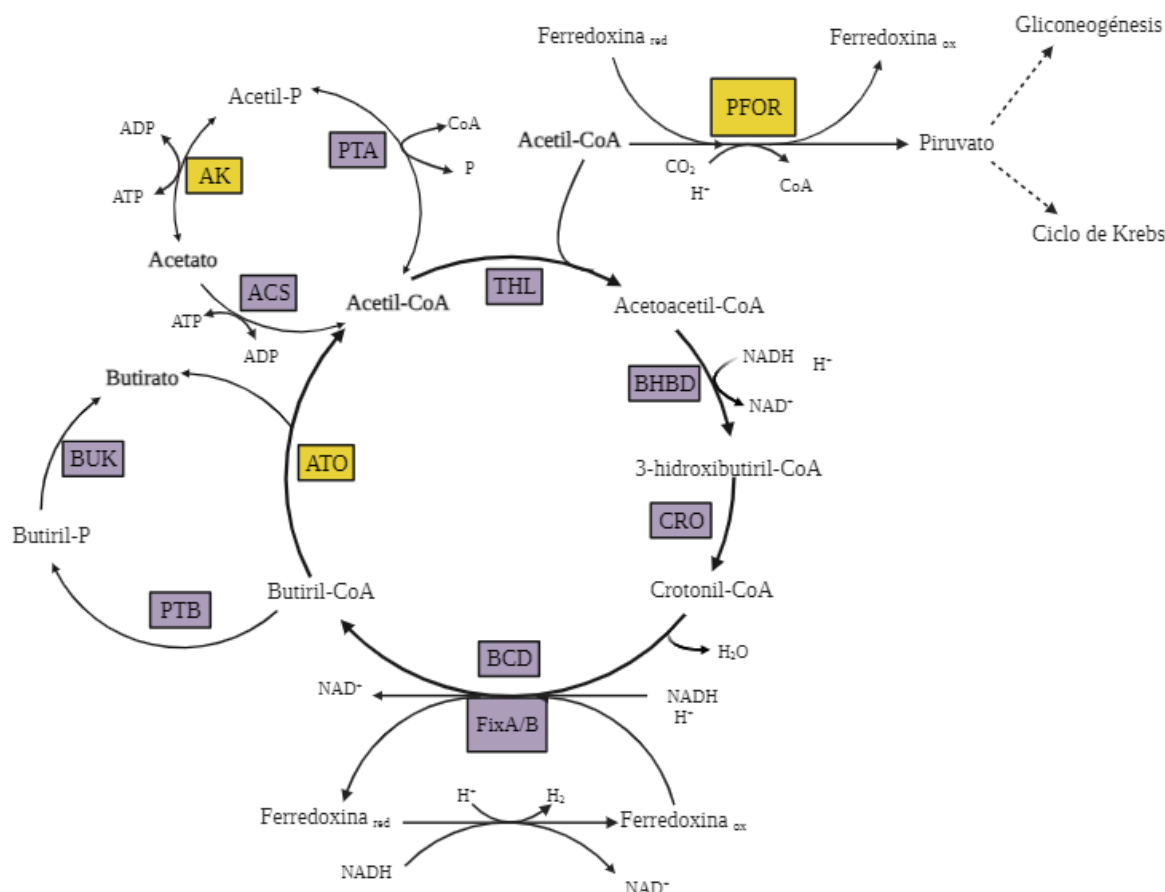


Figura R3.10. Ruta hipotética para la utilización del acetato en *Exiguobacterium* sp. Helios. Las enzimas están indicadas en morado (sobreexpresadas) o amarillo (subexpresadas). PTB: Fosfato butiriltransferasa; BUK: Butirato quinasa; ATO: Butiril-CoA:acetoacetato CoA transferasa; FixA/B: Flavoproteína de transferencia de electrones; BCD: Butiril-CoA deshidrogenasa; THL: Acetil-Coa acetiltransferasa / acetoacetyl-CoA tiolasa; BHBD/CRO: Enoil-CoA hidratasa / 3-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa bifuncional; PFOR: piruvato-ferredoxina oxidoreductasa; PTA: Fosfato acetiltransferasa; AK: Acetato quinasa; ACS: Acetil-CoA sintetasa. Modificado de Kutscha & Pflügl, 2020.

La PFOR es una enzima clave en el metabolismo anaeróbico, que en la mayoría de los casos oxida el piruvato para generar acetil-CoA, dióxido de carbono (CO_2) y ferredoxina reducida. La ferredoxina reducida es un donante de electrones para muchas enzimas en anaerobios (Katsyv et al., 2021). La reacción inversa, la reducción de acetil-CoA a piruvato, es igualmente importante para los anaerobios autótrofos porque vincula la vía Wood-Ljungdahl de formación de acetil-CoA con el ciclo reductor incompleto del ácido tricarbóxico para la síntesis de precursores biosintéticos de carbono más largos (Furdui & Ragsdale, 2000). El complejo PFOR

que presenta *Exiguobacterium* sp. Helios pertenecería a una clasificación particular de este tipo de enzimas presente en extremófilos (*Sulfolobus*, *Aeropyrum*, *Halobacterium*, y *Hydrogenobacter*) que se caracteriza por ser operativo en presencia de oxígeno (Yan et al., 2016). Esta propuesta está basada en el análisis comparado de la estructura tridimensional de PFOR de *Exiguobacterium* sp Helios obtenida mediante el algoritmo AlphaFold con la PFOR de *Sulfolobus tokodaii* (Ferrero-Fernández 2022). Este modelo, explicaría cómo parte del acetato genera electrones y ATP, y cómo el complejo PFOR podría generar piruvato a partir de acetyl-CoA, un metabolito de tres carbonos que permite la síntesis de todos los precursores de biomasa en *Exiguobacterium* sp. Helios y, por tanto, el crecimiento con acetato (Ferrero-Fernández 2022).

4.6. Análisis de metabolitos por HPLC

Con el objetivo de comprobar la hipótesis planteada sobre la degradación de acetato en *Exiguobacterium* sp. Helios y así validar el modelo metabólico, se realizaron cultivos en matraz en medio mínimo M63 con $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato de sodio, observando las diferencias al suplementar los medios con diferentes concentraciones de casaminoácidos, que fueron $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ o $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura R3.11). El aporte de casaminoácidos garantiza la suplementación de las auxotrofías de Helios. Para lograr mayor biomasa y poder analizar con más facilidad los metabolitos secundarios y el consumo de acetato, se dio un segundo pulso de fuente de carbono (otros $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato de sodio) a los 7 días de crecimiento.

Los cultivos se monitorizaron midiendo la $\text{DO}_{600\text{nm}}$, y se observó que, aunque alcanzaban más rápidamente la fase exponencial los cultivos suplementados con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de casaminoácidos, no continuaban consumiendo acetato tras el segundo pulso de fuente de carbono. Sin embargo, los cultivos suplementados con $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ continuaban acumulando biomasa tras el segundo pulso y alcanzaron una densidad óptica mayor (en torno a 3).

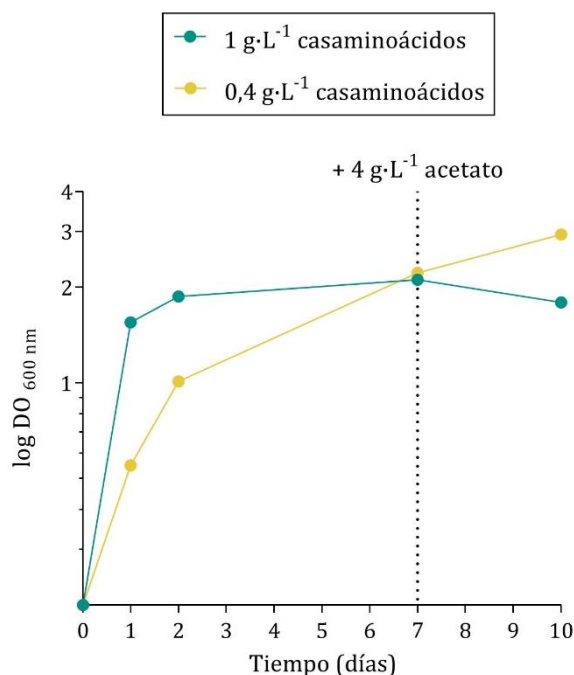


Figura R3.11. Crecimientos en acetato de *Exiguobacterium sp. Helios*. Los cultivos se suplementaron con 0,4 g·L⁻¹ (azul) o 1g·L⁻¹ (amarillo) de casaminoácidos.

Se recogieron los sobrenadantes de este experimento a tiempo final (10 días) y se analizaron por HPLC. Se compararon los resultados con patrones de butirato, para comprobar si se acumulaba este metabolito como predecía el modelo, y con patrones de acetato, para comprobar su consumo. Se comprobó que en la muestra 1 (Figura R3.12), correspondiente a los cultivos suplementados con 1 g·L⁻¹ de casaminoácidos, se seguía observando el pico del acetato a tiempo final, por lo que no se había consumido completamente (Figura R3.12.D). Por otra parte, en la muestra 2 (Figura R3.13), que corresponde a los cultivos suplementados con 0,4 g·L⁻¹ de casaminoácidos, el pico del acetato no se detectaba a tiempo final (Figura R3.13.D).

En ninguna de las muestras se observó un pico del butirato, que debería aparecer en el minuto 25,2. Sin embargo, se pudo observar un pico de elución que aparecía en ambas muestras en el minuto 23,1 (Figura R3.12.D y Figura R3.13.D) y que aumentaba de tamaño cuando se consumía más acetato, pero que aún no ha sido identificado. También se observaron a tiempo final otros dos picos a 9,3 min y a 10,4 min, que aún no se han identificado (Figura R3.12.D y Figura R3.13.D).

VI. RESULTADOS. Capítulo 3

Pese a que no se pudo comprobar la producción de metabolitos secundarios consecuencia de la degradación del acetato que confirmasen la hipótesis desarrollada para *Exiguobacterium* sp. Helios, se pudo comprobar su consumo por completo por HPLC y se determinaron unas condiciones de cultivo eficientes mediante pulsos de fuente de carbono (*feed-batch*) que serán de gran utilidad para futuros experimentos.

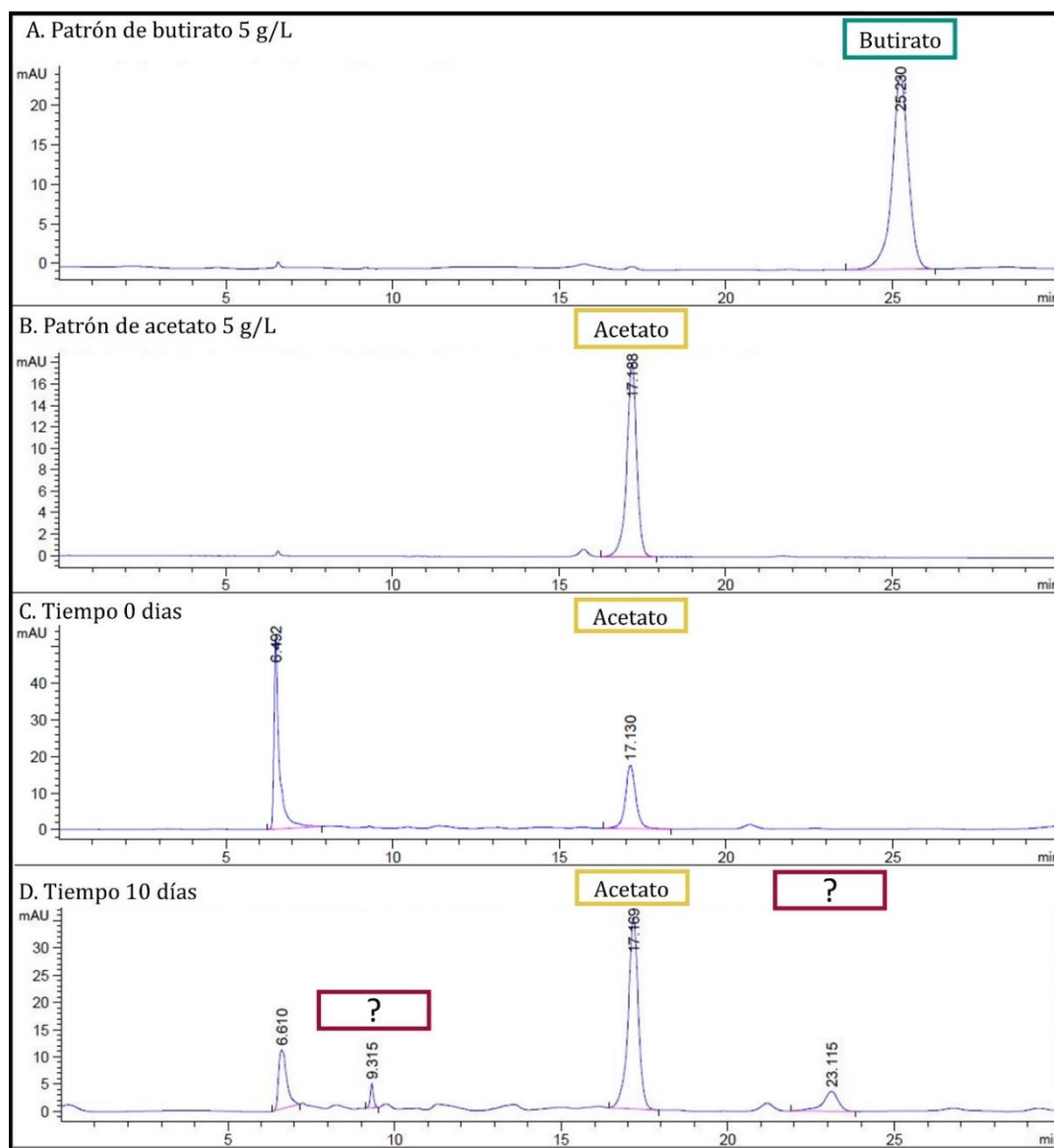


Figura R3.12. Análisis mediante HPLC del sobrenadante de cultivos en acetato de *Exiguobacterium* sp. Helios. A. Patrón de butirato a una concentración de 5 g·L⁻¹. B. Patrón de acetato a una concentración de 5 g·L⁻¹. C. Muestra 1, sobrenadante de cultivos de *Exiguobacterium* sp. Helios con 4 g·L⁻¹ de acetato suplementados con 1 g·L⁻¹ de casaminoácidos. D. Muestra 2, sobrenadante de cultivos de *Exiguobacterium* sp. Helios con 4 g·L⁻¹ de acetato suplementados con 0,4 g·L⁻¹ de casaminoácidos. Se muestran los cromatogramas de 230 nm.

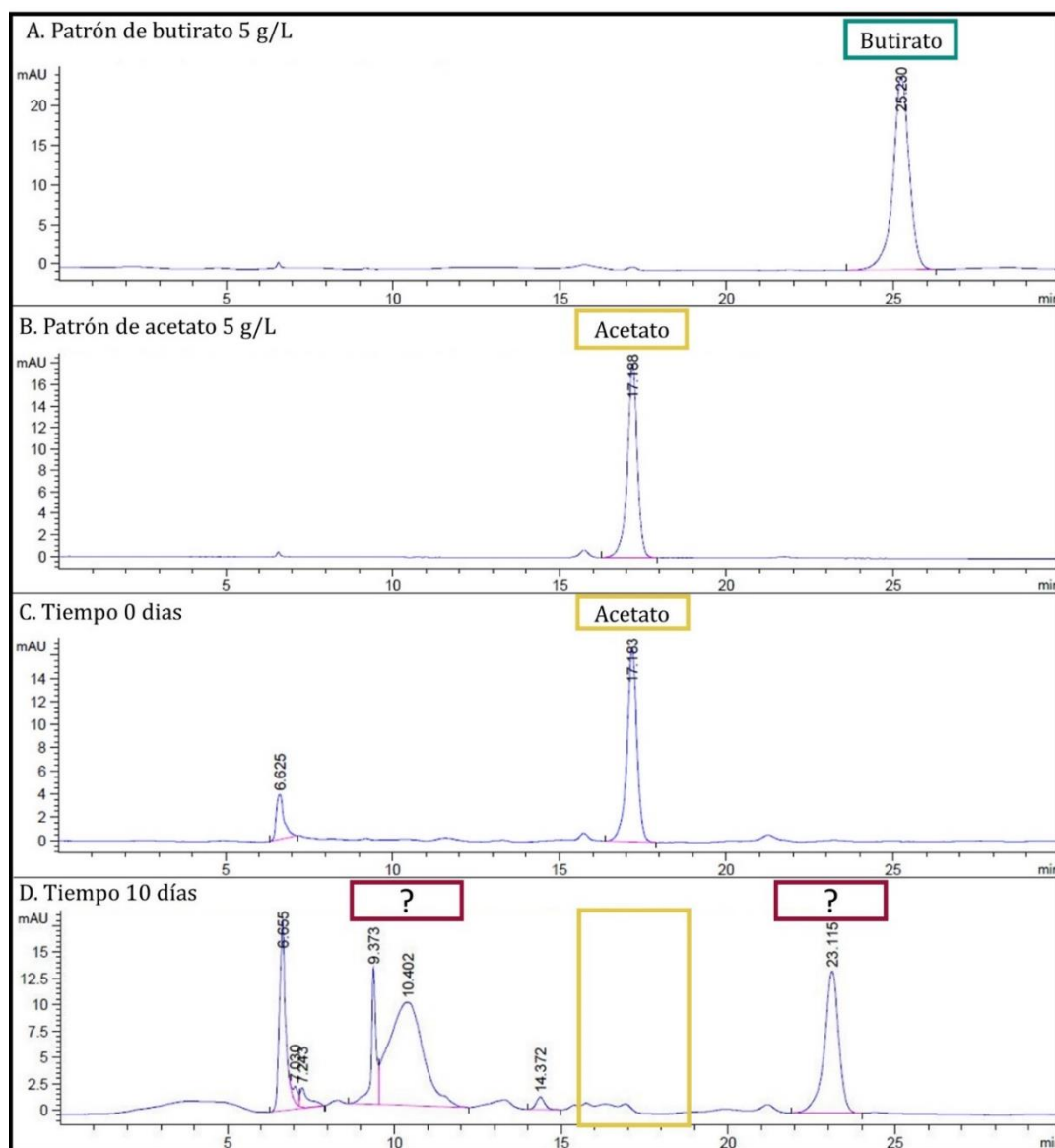


Figura R3.13. Análisis mediante HPLC del sobrenadante de cultivos en acetato de *Exiguobacterium* sp. Helios. A. Patrón de butirato a una concentración de 5 g·L⁻¹. B. Patrón de acetato a una concentración de 5 g·L⁻¹. C. Muestra 1, sobrenadante de cultivos de *Exiguobacterium* sp. Helios con 4 g·L⁻¹ de acetato suplementados con 1 g·L⁻¹ de casaminoácidos. D. Muestra 2, sobrenadante de cultivos de *Exiguobacterium* sp. Helios con 4 g·L⁻¹ de acetato suplementados con 0,4 g·L⁻¹ de casaminoácidos. Se muestran los cromatogramas de 230 nm.

Discusión

1. Caracterización del poliextremófilo *Exiguobacterium* sp. Helios

1.1. *Exiguobacterium* sp. Helios: aislamiento y genoma

En la Tierra se pueden encontrar muchos entornos naturales extremos y complejos, pero también otros tantos artificiales que han surgido por la acción del hombre. El muestreo y los avances en secuenciación han permitido detectar la presencia de vida en muchos de estos ambientes (Ando et al., 2021; Satari et al., 2023). Como precedente a esta tesis doctoral, se había investigado si los microorganismos pueden adaptarse a paneles solares, estructuras fabricadas que soportan condiciones ambientales extremas (Dorado-Morales et al., 2016). Sorprendentemente, los resultados mostraron que los paneles solares albergaban una comunidad microbiana muy diversa, de la que podrían aislarse diferentes poliextremófilos potenciales (Dorado-Morales et al., 2016; Porcar et al., 2018). En concreto, ya que durante muchas horas al día los paneles solares están sometidos a sequedad e irradiación absolutas, era de esperar que allí se encontraran bacterias altamente tolerantes a la desecación.

Un sencillo procedimiento de detección utilizando varios ciclos de desecación extrema, permitió aislar varias bacterias de los paneles solares que pudieron sobrevivir después de este proceso. Dicho procedimiento se validó utilizando *D. radiodurans* como control positivo y *E. coli* como control negativo. Aunque el análisis global preliminar del microbioma de los paneles solares no reveló la presencia de un número significativo de bacterias del género *Exiguobacterium* (Dorado-Morales et al., 2016), una de las bacterias aisladas más xerotolerantes de los paneles solares fue clasificada mediante análisis de ARNr 16S como *Exiguobacterium* sp. Helios, filogenéticamente muy cercano a *E. sibiricum*. Vale la pena mencionar que las pruebas de detección adicionales de paneles solares permitieron aislar otra cepa de *Exiguobacterium* llamada HE 26.4, así como muchas otras cepas xerotolerantes que aún no se han caracterizado por completo (Anexo 3).

VII. DISCUSIÓN

Exiguobacterium sp. Helios fue clasificado taxonómicamente en el Clado I del género, que se encuentra dividido en dos grupos, y siendo la especie más cercana el aislado del permafrost *E. sibiricum*. La gran similitud entre los genomas de estas dos especies encontradas en lugares tan lejanos y diferentes del planeta hace preguntarse como funcionan los sistemas de poliextremofilia de estas bacterias y qué mecanismos las hacen tan versátiles.

Su genoma, similar en tamaño y contenido en G+C al del resto de especies del género, fue ensamblado y anotado, identificando 3241 secuencias codificantes. Además, Helios presentaba un plásmido, denominado pMCEX (110 kb), de tamaño similar a los encontrados en *E. acetylicum* (Selvakumar et al., 2009) o en *E. alkaliphilum*, con tamaños de entre 43,8 kb y 119,8 kb.

Existen una serie de diferencias principales entre los genomas de *E. sibiricum* y *Exiguobacterium* sp. Helios. Helios presenta el clúster de biosíntesis del sideróforo petrobactina, del que *E. sibiricum* carece. El genoma de *E. sibiricum* contiene un sistema CRISPR-CAS, presente en otras cepas del género, y 27 transposasas que no están presentes en la cepa *Exiguobacterium* sp. Helios. Un número bajo de transposasas es beneficioso para su uso como chasis biotecnológico robusto, ya que las transposasas plantean una amenaza para los organismos debido a que la especificidad de secuencia de las inserciones por transposición es normalmente baja, y las transposiciones pueden alterar genes vitales (Darmon & Leach, 2014).

1.2. Estudio de la poliextremofilia

Desde el punto de vista de la biotecnología y la producción industrial, es interesante contar con nuevos modelos bacterianos capaces de producir biomasa en rangos de temperatura y pH extremos. *Exiguobacterium* sp. Helios se pudo cultivar a temperaturas tan extremas como 4°C y 42°C, alcanzando el valor máximo de DO_{600 nm} a temperaturas más bajas, por lo que se podría considerar que, al igual que otros miembros de su género, Helios es un psicrófilo. Esta cualidad puede ser beneficiosa en algunos bioprocesos, como ya se ha visto en el caso de la

acetilesterasa activa en frío *EaAcE*, de *E. antarcticum* B7, que permanece estable más tiempo gracias a su tolerancia al frío (Wang et al., 2019).

La tolerancia a diferentes rangos de pH también puede ser de gran utilidad ya que, ecológicamente, los microorganismos pH-tolerantes presentan actividades y funciones que son esenciales para regular el ciclo de los nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo, etc.) en condiciones ambientales extremas (Dhakar & Pandey, 2016). En esta tesis se ha podido comprobar que el rango de pH en el que es capaz de crecer en cultivo *Exiguobacterium* sp. Helios se encuentra entre pH 5 y 11, aunque su rango óptimo se encuentra entre pH 7 y 9. Además, se ha observado que Helios es capaz de regular el pH en entornos básicos, estabilizándolo en torno a pH 8. Esta versatilidad permitiría a Helios producir un abanico muy amplio de enzimas. Los alcalófilos son conocidos por la producción de proteasas alcalinas, celulasas, quitinasas y otros productos metabólicos como carotenoides, esteroides, antibióticos y ácidos orgánicos de importancia biotecnológica (Dhakar & Pandey, 2016). Un ejemplo sería la β -galactosidasa expresada por *E. acetylicum*, cuya actividad específica es alta, su pH óptimo es ligeramente ácido, y presenta buena estabilidad térmica (Aburto et al., 2019).

Exiguobacterium sp. Helios puede crecer en un medio que contenga 35% de PEG 6000 (estrés hídrico matricial), pero solo puede ser cultivado hasta una concentración de sal máxima de $70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (estrés hídrico osmótico), a diferencia de otras especies de su género, que alcanzan concentraciones de hasta $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sal en el medio. Esto significa que la adaptación a condiciones de baja actividad de agua depende del tipo de perturbaciones osmóticas; es decir, estrés osmótico electrolítico o no electrolítico conocido como estrés matricial causado a las células, ya que los mecanismos de adaptación son diferentes.

Entre las tolerancias a metales y metaloides que presenta *Exiguobacterium* sp. Helios, es destacable la resistencia al selenito, llegando a crecer en presencia de hasta 40 mM de selenito en el medio. Esta resistencia es especialmente interesante porque el mecanismo molecular que emplea la bacteria para sobrevivir a este metaloide tiene como resultado su reducción a selenio elemental, generando nanopartículas de selenio (SeNPs) en su interior. Las SeNPs tienen

VII. DISCUSIÓN

potenciales aplicaciones biotecnológicas, tales como la habilidad de modular el sistema inmune, generar efectos anticancerígenos y antibacterianos o promover el crecimiento óseo (Xia et al., 2022).

Generalmente, las nanopartículas de selenio se pueden sintetizar mediante métodos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, las SeNPs sintetizadas biológicamente demuestran una mayor compatibilidad con los órganos y tejidos humanos (Vahdati & Tohidi Moghadam, 2020). Las Bio-SeNPs son sintetizadas a partir de extractos de bacterias, hongos y plantas (Ao et al., 2023). En el caso de las bacterias, éstas son consideradas una biofábrica eficiente para la síntesis de nanomateriales como las BioSeNPs, que son sintetizadas como un mecanismo de desintoxicación celular para eliminar selenitos y oxianiones de selenato altamente tóxicos en algunas bacterias (Ojeda et al., 2020) como *Providencia* sp. DCX (H. Zhang et al., 2021), las bacterias halófilas *Halomonas elongata* y *Salinicoccus iranensis* (Tabibi et al., 2023) o bacterias probióticas como *Lactobacillus pentosus* (Adebayo-Tayo et al., 2021) o *Lactobacillus acidophilus* (Alam et al., 2020).

La mayoría de las SeNP que oscilan entre 50 y 200 nm poseen eficacia para su aplicación como agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer y en aplicaciones antioxidantes y antimicrobianas según lo expuesto en la literatura (Bisht et al., 2022), por lo que las SeNPs sintetizadas por *Exiguobacterium* sp. Helios, que presentan un diámetro medio de 162 ± 57 nm, son competentes en este aspecto.

El proceso de síntesis de Bio-SeNPs presenta diversidad y complejidad, por lo que para su producción es necesario elegir un sistema biológico seguro, que sintetice Bio-SeNPs con altas propiedades antibacterianas y baja toxicidad. Aunque actualmente se utilizan en envasado de alimentos y fertilizantes, es importante desarrollar formas de aplicación adicionales para maximizar su valor económico (Ao et al., 2023).

Por otra parte, se evaluó la resistencia de *Exiguobacterium* sp. Helios a la radiación UV-C. Aunque la región UV-C no es ambientalmente relevante, ya que no llega a la superficie terrestre al ser absorbida por la atmósfera (Molina-Menor et al., 2023), es útil para evaluar la sensibilidad a los rayos UV de bacterias que son

altamente tolerantes o insensibles a altas dosis de UV-B (Etemadifar et al., 2016). La resistencia a la radiación UV-C tanto de Helios como de *E. sibiricum* y *E. antarcticum* fue muy inferior a la que presenta la cepa modelo *D. radiodurans*. Sin embargo, lograron sobrevivir a la dosis más alta aplicada en el ensayo ($1000 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$), que a su vez era superior a la dosis máxima utilizada en algunos estudios para esterilizar por completo el agua ($600 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$) (Molina-Menor et al., 2023). El hecho de que *Exiguobacterium* sp. Helios no tenga una resistencia a la radiación UV tan alta como *D. radiodurans* hace pensar que sus mecanismos de resistencia pueden ser distintos a los presentados por *D. radiodurans*, que incluyen una poderosa capacidad de reparación del ADN tras el estrés, acumulación de una proporción Mn/Fe elevada o la expresión de proteínas tipo chaperonas de choque térmico (HSP) (Paulino-Lima et al., 2016; Porcar et al., 2018; Xue et al., 2019)

1.3. Desarrollo de herramientas genéticas

Hasta el momento de la escritura de esta tesis doctoral, no existen precedentes de modificación genética en el género *Exiguobacterium*. Esta ausencia de herramientas limita enormemente los estudios que se pueden realizar para conocer mejor el metabolismo y los mecanismos de resistencia del género, y las aplicaciones biotecnológicas que se podrían llegar a implementar con ellos. Por este motivo se exploraron múltiples estrategias de transformación entre las que se encuentran la electroporación, la conjugación o la competencia natural, y se trató de conseguir tanto la expresión de vectores de diferentes orígenes como su modificación genómica.

De entre todos estos esfuerzos se consiguió obtener el primer protocolo de transformación por electroporación de *Exiguobacterium* sp. Helios, que fue capaz de expresar los vectores pRCR12 y pSEVA3b67Rb. Estos vectores contenían genes de resistencia al cloranfenicol, que resultó un antibiótico eficaz para la transformación de esta cepa, y genes codificantes de RFP, que permitieron una selección de candidatos positivos rápida y sencilla por el color rojizo que adoptaban las colonias, y además fueron útiles para el seguimiento y mantenimiento estéril de los cultivos en el laboratorio.

VII. DISCUSIÓN

Se construyeron varios vectores diseñados para la inserción y delección de genes en el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios. Un vector basado en el sistema “*Bacillus SEVA siblings*”, una tecnología basada en la ampliamente conocida librería SEVA que permitiría adaptar su sistema modular para crear nuevos vectores fácilmente. El otro vector fue sintetizado sobre la estructura de un pK18mob, también muy ampliamente utilizado en ingeniería genética. No se han obtenido transformantes de momento. La dificultad que se ha encontrado a la hora de transformar esta cepa no puede atribuirse *a priori* a sistemas de defensa genética, ya que no se han identificado en el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios.

Como trabajo futuro, se pretenden continuar los experimentos con estos vectores, optimizando el protocolo de electroporación y estudiando la eficiencia de la recombinación homóloga en esta cepa. Además, se buscará ampliar el alcance de estas herramientas para poder modificar otras especies del género y así expandir las posibles aplicaciones biotecnológicas del género *Exiguobacterium*.

2. Estudio de la xerotolerancia de *Exiguobacterium* sp. Helios

2.1. Resistencia a la desecación del género *Exiguobacterium*

El estrés más común al que se enfrentan las bacterias en el entorno natural es la pérdida de agua durante la desecación. Como resultado, las moléculas se condensan, se producen alteraciones en la membrana, se pierde actividad enzimática y las proteínas se desnaturalizan, se inactivan los mecanismos antioxidantes los radicales libres que comienzan a acumularse dañan el ADN, proteínas y lípidos, provocando finalmente daños irreversibles. Pese a que las bacterias han elaborado múltiples mecanismos que les ayudan a resistir el estrés de la desecación durante períodos prolongados, solo algunas estrategias han sido bien caracterizadas, como la formación de biopelículas y esporas, la acumulación de solutos compatibles y la síntesis de proteínas de estrés, mientras que otros mecanismos permanecen sin explicación (Laskowska & Kuczyńska-Wiśnik, 2020).

Considerando que ninguna de las especies de *Exiguobacterium* ha sido descrita como xerotolerante hasta el momento, se investigó si esta propiedad era específica de las cepas de *Exiguobacterium* aisladas de paneles solares o si podría ser una característica de todos ellos. Aunque se ha demostrado que *E. sibiricum* puede sobrevivir en condiciones de baja actividad de agua (Dias et al., 2018; Ponder et al., 2008; Rodrigues et al., 2008), esta habilidad no necesariamente le confiere la posibilidad de sobrevivir en condiciones extremas de desecación.

Al estudiar la xerotolerancia de varias cepas del género *Exiguobacterium* a 30°C, lo primero que se observa es que existen diferencias claras si se realiza el ensayo en fase exponencial, en la que presentan una resistencia muy baja (0,1-1% de supervivencia), o en fase estacionaria, en la que observamos que algunas cepas alcanzan supervivencias de hasta el 50-70%.

También se pudo observar, especialmente en la fase estacionaria, una gran diferencia entre la supervivencia de las especies pertenecientes al Clado I, *Exiguobacterium* sp. Helios, *E. sibiricum* y *E. antarcticum*, y el resto de las especies pertenecientes al Clado II. En estas condiciones, Helios presenta una xerotolerancia mayor que la que se observa en *E. sibiricum*, que a su vez es mayor que la de *E. antarcticum*.

Aunque la xerotolerancia parece ser una característica propia del género, es más pronunciada en las especies del Clado I y, en especial, en la cepa Helios. Estas diferencias, que se vuelven más evidentes al realizar los mismos experimentos empleando bacterias cultivadas a 4°C, pueden deberse al tipo de mecanismos de resistencia que prevalecen en un grupo y otro. Las cepas *E. sibiricum* y Helios han sido aisladas de lugares en los que el estrés por desecación era más crítico, es decir, había poca disponibilidad de agua. Por el contrario, las cepas del Clado II son en su mayoría halófilas, resistentes a estrés osmótico, y por lo tanto sus mecanismos de resistencia están especializados para sobrevivir a ese tipo de estrés.

2.2. Relación entre morfología y xerotolerancia

En los estudios realizados por Rodrigues et al. (2008) en *E. sibiricum* con el objetivo de comprender mejor su adaptación térmica, se observaron los cambios morfológicos observados en las células cultivadas a $-2,5^{\circ}\text{C}$ (Figura D1.A), provocados por la modificación de la membrana y la pared celular, cambiando la saturación y la longitud de la cadena de los ácidos grasos de la membrana y espesando el peptidoglicano. *E. sibiricum* presenta una envoltura celular más gruesa, lo que le permite soportar altas presiones de turgencia.

Este parece ser también el caso de *Exiguobacterium* sp. Helios, ya que las células que sobreviven a la desecación tienen una morfología cocoide con una gruesa envoltura celular y significativamente más pequeñas, según se ha podido observar mediante microscopía óptica, MET (Figura D1.B) y AFM. Nuestra hipótesis es que *Exiguobacterium* sp. Helios es capaz de generar esta morfología durante su crecimiento, particularmente durante la fase estacionaria, y sólo las células que tienen una envoltura celular más gruesa resistirán las condiciones de desecación. Esta hipótesis concuerda con la observación de que las células de *Exiguobacterium* sp. Helios recuperadas mediante rehidratación muestran un fenotipo cocoide que pronto cambia a un fenotipo bacilar cuando las células comienzan a crecer nuevamente.

Además, las células de Helios cultivadas a 4°C adquieren esta morfología mucho antes en su curva de crecimiento, lo que tiene como consecuencia que al llegar a fase estacionaria la proporción de células cocoides de envoltura engrosada es mucho mayor y por ese motivo la xerotolerancia en estas condiciones podría ser superior.

Estos cambios morfológicos se han podido observar en todas las cepas estudiadas en esta tesis doctoral del género *Exiguobacterium*, especialmente en las cepas del Clado I, lo que hace pensar que existiría una relación entre el cambio morfológico y los mecanismos de resistencia a la desecación.

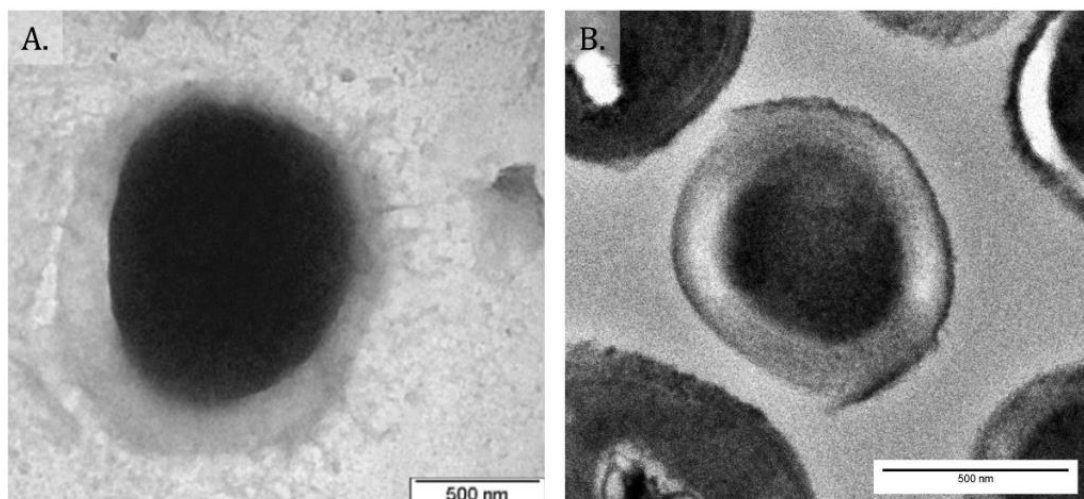


Figura D1. Comparación de (A) *E. sibiricum* 25-15 y (B) *Exiguobacterium* sp. Helios. por microscopía electrónica de transmisión. La fotografía de *E. sibiricum* está tomada de Rodrigues et al. (2008), donde cultivaron a la bacteria en placas a $-2,5^{\circ}\text{C}$, mientras que la de Helios fue realizada en esta tesis doctoral, de células en fase estacionaria tras la desecación.

2.3. Propiedades mecánicas

La microscopía de fuerza atómica (AFM) puede ofrecer resultados únicos, incluyendo imágenes de súper resolución, sensibilidad de piconewton a la fuerza, nanomanipulación y la posibilidad de trabajar en condiciones fisiológicas. Estas capacidades abren una vía interesante para la investigación en biología celular y molecular (Dufrière et al., 2021). El AFM presenta algunas ventajas respecto a otras formas de microscopía. Su resolución es mucho mayor que la de la microscopía óptica tradicional, y la manipulación de las muestras es mucho menos compleja e invasiva que la de la microscopía electrónica de barrido o de transmisión (S. Liu & Wang, 2010).

Una de las líneas de investigación en el campo de la microbiología que más ha hecho uso de esta técnica es el estudio de nuevos tratamientos antibióticos. El AFM ha contribuido ampliamente a la comprensión de los mecanismos detrás de la resistencia de cepas multirresistentes, permitiendo identificar cambios en su composición química y en la morfología de su pared celular (Kochan et al., 2019).

VII. DISCUSIÓN

Más allá de las aplicaciones biomédicas, el uso de microscopía de fuerza atómica ha resultado ser una plataforma poderosa para investigar la arquitectura y el ensamblaje a nanoescala del peptidoglicano de la pared celular en bacterias grampositivas vivas. Además, se ha visto que el poder realizar las mediciones aplicando una mayor fuerza permite observar estructuras que de otra manera no podrían apreciarse (Andre et al., 2010). En esta tesis doctoral se ha dado la oportunidad de aprovechar la gran resistencia y dureza de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios para realizar un análisis de las propiedades mecánicas de estas células tan extraordinarias, estudiar las posibles modificaciones que se produzcan en su pared, a la vez que se han intentado desarrollar técnicas y protocolos para el estudio de bacterias por AFM.

Lo primero que hay que tomar en cuenta a la hora de analizar estos resultados es que la constante de fuerza y calibración de la punta que se usa para realizar los experimentos es de vital importancia. Elegir un cantiléver con la constante de fuerza adecuada para medir cada muestra biológica es esencial para adquirir unos datos fiables y reproducibles. A modo de ejemplo, la rigidez obtenida en las medidas de la bacteria modelo *B. subtilis* con un cantiléver de constante de fuerza de $3,4 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ fue de $11,58 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ de media, cercana a la descrita en la literatura para un cantiléver de $2,0 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ ($12,1\pm 4,1 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$) (Su et al., 2012). Sin embargo, al utilizar un cantiléver de constante de fuerza $1,4 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, las medidas de rigidez descendían drásticamente hasta menos de $2 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ (datos no mostrados). Es decir, seleccionar un cantiléver de constante de fuerza adecuada para la muestra que se desea analizar es extremadamente importante.

Se ha podido relacionar la rigidez de las células de *Exiguobacterium* sp. Helios con su morfología, estableciendo que la forma cocoide y de pequeño tamaño que presenta Helios de forma mayoritaria en fase estacionaria presenta una dureza mucho mayor (más del doble) que la de las células bacilares de la fase exponencial. Además, se ha comparado esta rigidez con la de otras cepas del mismo género, siendo destacable que *E. sibiricum* muestra una constante de fuerza superior a la de la cepa Helios. También fue interesante ver que las células de *E. mexicanum* presentaban una rigidez elevada, y superior a la de la cepa modelo *B. subtilis*, lo que hace pensar que es posible que todo el género *Exiguobacterium*

muestre una rigidez superior a otras bacterias Gram positivas. Esta elevada rigidez puede ser una de las razones para la xerotolerancia que presentan *Exiguobacterium* sp. Helios, *E. sibiricum* o incluso *E. mexicanum* en algunas condiciones (xerotolerancia moderada en fase estacionaria tanto a 30°C como a bajas temperaturas).

Por otro lado, se realizó un análisis de cómo va cambiando la rigidez de las células al salir del estado de latencia tras la desecación. Para ello fue necesario utilizar un cantiléver de una constante de fuerza muy elevada, de 42 N·m⁻¹, mucho mayor que las constantes de fuerza que suelen utilizarse en otros microorganismos como *Staphylococcus aureus* (3 N·m⁻¹) (García-Betancur et al., 2017) o *Candida albicans* (0,01 N·m⁻¹) (Formosa et al., 2015), ya que las células desecadas mostraban una rigidez excepcionalmente alta. Al rehidratar las células, se pudo observar como su rigidez descendía, alcanzando valores similares a los de las células sin desecar que se habían estudiado en el resto de experimentos. Se puede afirmar que la forma de resistencia cocoide y de pared engrosada de *Exiguobacterium* sp. Helios presenta una mayor rigidez que el resto de las células de forma bacilar, y que estas células resistentes son capaces de regresar a su forma original al poco tiempo de ser rehidratadas.

Pese a que los estudios realizados sobre la topografía con AFM son muy preliminares, se han podido detectar diferencias en la rigidez de la estructura de peptidoglicano, además de zonas con diferencias en las fuerzas de adhesión a lo largo del eje longitudinal de células en división.

Las estructuras de peptidoglinano en anillo han sido descritas anteriormente en otras bacterias como *S. aureus*, en las que se analizaron sáculos, demostrando que las estructuras de los anillos están hechas de peptidoglicano, no de proteínas o ácido teicoico, y que la forma granular del PG se debe a su antigüedad (Turner et al., 2010). Los gránulos de PG que se observan en las imágenes de *Exiguobacterium* sp. Helios se concentran en la parte central de la célula, mientras que los anillos son especialmente visibles en los extremos. Estas estructuras híbridas de anillo-gránulo sugieren que la remodelación o renovación

VII. DISCUSIÓN

del PG se produce de forma lateral hacia el interior, igual que en *S. aureus* (Turner et al., 2010).

La utilización de esta técnica, que ha arrojado luz sobre las propiedades biomecánicas de los microorganismos pero que continúa poco explotada hasta el momento, puede ser muy beneficiosa para el estudio de nanoestructuras. Combinada con otras técnicas como la manipulación genética, el AFM puede proporcionar información vital sobre interacciones entre células, formación de biopelículas o la estructura de la superficie celular (Goss & Volle, 2020).

2.4. Mecanismos de xerotolerancia

Tras analizar los resultados de la comparación del transcriptoma de *Exiguobacterium* sp. Helios en la fase estacionaria frente a la fase exponencial temprana, y los resultados de la comparación del transcriptoma antes y después de la desecación, se pueden sacar una serie de conclusiones sobre los mecanismos de xerotolerancia que podría tener Helios.

Entre los genes clasificados como genes relacionados con la esporulación que muestra *Exiguobacterium* sp. Helios, destacan algunos que se encuentran sobreexpresados en la fase estacionaria y que pueden tener una función reguladora de la forma de resistencia, como *sigB* o *spoVG*, que son activados por la exposición a condiciones de estrés y tienen un papel importante en bacterias Gram-positivas en la supervivencia y adaptación ambiental (Rodriguez Ayala et al., 2020). Otros, como *spoIIIAA*, pueden estar regulando la formación del septo y la comunicación entre la célula madre y la célula de resistencia (Zeytuni et al., 2018), lo cual es consistente con la división asimétrica que se ha observado en algunas fotografías por MET, en las que se diferencia una célula madre y una célula hija especializada en la que se comienza a ver engrosamiento de la pared (Figura D2).

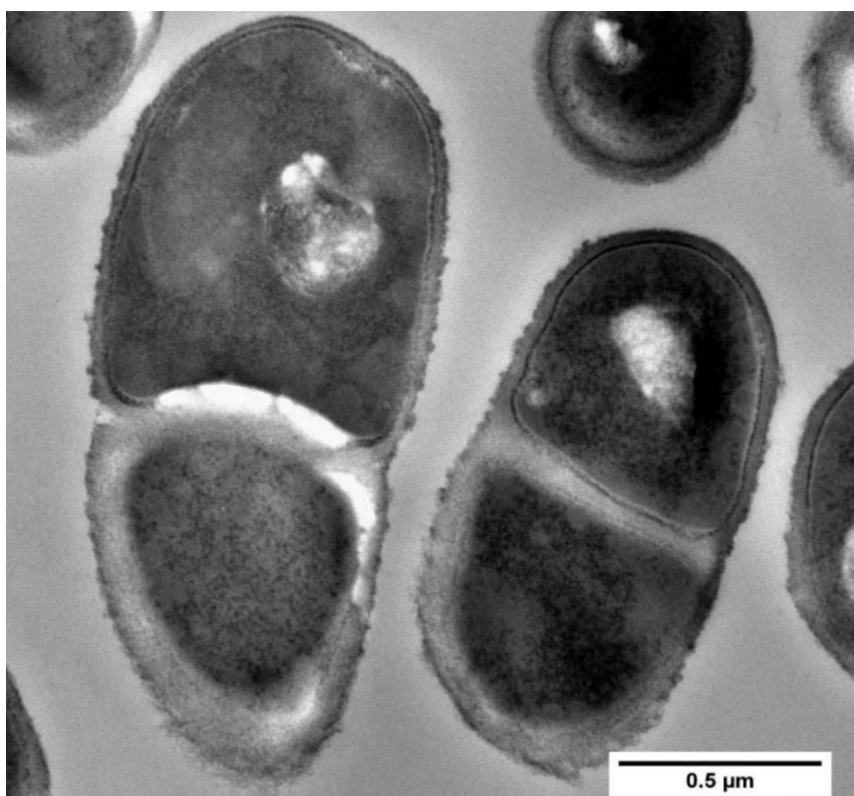


Figura D2. División asimétrica en *Exiguobacterium* sp. Helios. Fotografía tomada por MET de células en fase estacionaria.

2.4.1. Cambio en las concentraciones de metales

Uno de los mecanismos de resistencia que podría presentar *Exiguobacterium* sp. Helios es el mantenimiento de un equilibrio Mn^{2+}/Fe^{2+} que, al igual que en otras bacterias como *D. radiodurans*, garantiza la protección de los sistemas enzimáticos como cofactor de enzimas esenciales para el ciclo redox intracelular (Santos et al., 2019). Este mecanismo en Helios vendría dado por un transportador de metales (proteína de unión a ATP *HNY42_RS05800* y proteína de unión a membrana *HNY42_RS05805*), especialmente manganeso, hierro y zinc, que podría estar regulado por dos homólogos de una proteína tipo Fur (*HNY42_RS05810* y *HNY42_RS06560*), que se encuentran sobreexpresados en fase estacionaria. El control de los niveles de estos metales en el interior celular podría ser de vital importancia para el equilibrio osmótico de Helios en desecación y la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas en fase estacionaria mediante niveles elevados de Mn^{2+} (Ul Hussain Shah et al., 2014).

VII. DISCUSIÓN

2.4.2. Cambios metabólicos

Exiguobacterium sp. Helios parece deshacerse de toda la maquinaria de movilidad al entrar en la fase estacionaria, ya que no solo pierde el flagelo sino que deja de expresar el sistema de quimiotaxis que envía señales al motor flagelar. El único gen que permanece sobreexpresado es un homólogo del regulador *bdlA*, del que se ha descrito su activación frente a estrés osmótico y para la formación de biopelículas (Morgan et al., 2006).

En las células desecadas se pudo observar que una gran cantidad de genes codificantes de citocromos (COX) y síntesis de ATP (ATP sintasa) estaban subexpresados, indicando que toda la maquinaria de la cadena respiratoria y conversión de energía se encuentra limitada en esta condición (Schimo et al., 2017). Esta subexpresión también se había observado en el transcriptoma de *E. sibiricum* cultivado a temperaturas extremas (-2,5°C y 39°C), debido no solo al ahorro de energía sino también a la menor disponibilidad de oxígeno en el medio a medida que se incrementa la temperatura (Rodrigues et al., 2008).

Se ha comprobado que los genes de la ruta de degradación del ácido fenilacético aparecen sobreexpresados en la fase estacionaria, lo cual resulta en cierta forma sorprendente, ya que *a priori* nada hace pensar que en la fase estacionaria exista en el medio de cultivo o en las células una acumulación de ácido fenilacético que pueda inducir la expresión de la ruta. En la bibliografía se describe una posible relación entre la ruta del ácido fenilacético y la protección frente al estrés oxidativo por H₂O₂, y se muestra además que la expresión de esta ruta puede inducir la producción de biopelículas a través de la proteína Csu del pili (Jiao et al., 2022). Es más, varios análisis transcriptómicos realizados en la bacteria *A. baumannii* han encontrado este operón *paa* particularmente sobreexpresado en presencia de factores de estrés, como diversas condiciones ambientales o antibióticos. Aunque las rutas metabólicas a menudo están reguladas en respuesta a cambios ambientales, la ruta de degradación del ácido fenilacético que se inicia en la fenilalanina es la única vía catabólica de aminoácidos en *Acinetobacter* que está consistente y altamente regulada en muchas condiciones (Hooppaw. et al., 2022). Estos antecedentes, sumados a los resultados obtenidos en esta tesis

doctoral, sugieren que tal vez haya que buscar otras explicaciones al margen de una función nutricional para justificar la existencia de esta ruta en un gran número de bacterias.

2.4.3. Incremento de la concentración intracelular de osmolitos y solutos compatibles

Pese a que se han encontrado en el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios los tres tipos de transportadores de glicina-betaína descritos en *B. subtilis* (OpuD, OpuA y OpuC) (Hoffmann & Bremer, 2016), y la ruta de biosíntesis de prolina, ambas consideradas moléculas osmoprotectoras, la falta de sobreexpresión de estos genes en el proceso de desecación o la existencia de cualquiera de las otras rutas de síntesis de solutos compatibles parece indicar que Helios no se sirve de estos mecanismos para resistir a la desecación.

2.4.4. Producción de moléculas que estabilizan a las proteínas tipo chaperonas y proteasas que degraden proteínas dañadas

Las proteínas Csp han sido ampliamente descritas como pequeñas proteínas de respuesta a rápidas bajadas de temperatura que contribuyen a la tolerancia a diferentes tipos de estrés (osmótico, oxidativo, por inanición, por pH, etc.) (Keto-Timonen et al., 2016). En el genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios, tres Csp están diferencialmente sobreexpresados en fase estacionaria. Además, este tipo de proteínas son comunes en el género *Exiguobacterium*, llegando a encontrar hasta 7 Csp en el genoma de *E. antarcticum*, y estando presentes en al menos 10 genomas del género *Exiguobacterium* (Vishnivetskaya et al., 2014).

2.4.5. Regulación de la expresión de captadores de ROS

En cuanto a estrategias para combatir el estrés oxidativo, destacan tres proteínas cuyos genes se sobreexpresan en Helios, como son el represor transcripcional PerR, la glutatión peroxidasa (Gpx) y la peroxirredoxina (Prx), que han sido ampliamente descritas en la bibliografía y que ostentan un papel principal en la protección de las células frente al daño oxidativo causado por ROS (Bao et al., 2023; Troitzsch et al., 2021).

VII. DISCUSIÓN

2.4.6. Reparación del daño al ADN

Se han encontrado sobreexpresados en las células de fase estacionaria de *Exiguobacterium* sp. Helios los sistemas de protección y reparación a ADN DinB y RecA (y sus proteínas accesorias). El genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios codifica cuatro proteínas homólogas de DinB, dos de las cuales están sobreexpresadas y es posible que tengan un papel protector del ADN. En *B. subtilis*, la proteína RecA, con la ayuda de las proteínas accesorias RecF, RecO, RecR y RecX, polimeriza con el ADN monocatenario creando una nucleoproteína que contribuye a inhibir la replicación del ADN (Vlašić et al., 2014), por lo que este mecanismo podría ser responsable de impedir la rotura del ADN en condiciones de estrés en *Exiguobacterium* sp. Helios.

2.4.7. Cambios en la membrana y la pared celular

Uno de los clústeres más sobreexpresados, y que por tanto puede tener un papel vital en la supervivencia de *Exiguobacterium* sp. Helios a la desecación, es el que codifica el sistema Psp/Lia. Este sistema de estabilización de membrana, que se encuentra muy conservado en bacterias, ya ha sido relacionado con la resistencia a diferentes tipos de estrés como estrés alcalino, disolventes orgánicos, detergentes, estrés osmótico, calor y antibióticos (Suntharalingam et al., 2009; Thurotte et al., 2017), pero existen muy pocas referencias a su papel en la resistencia a la desecación. Se ha descrito que PspA tiene un papel importante en la resistencia a la desecación cuando la integridad de membrana se ve comprometida, dependiendo del medio de cultivo empleado para *Rhizobium leguminosarum* (Atieno et al., 2018). Además, se ha visto su implicación en la colonización y transmisión de *Streptococcus pneumoniae*, ya que promueve la supervivencia neumocócica después de la desecación mediante la agregación de un complejo proteico dependiente de PspA (Lane et al., 2023). La alta expresión de estos genes en fase estacionaria hace pensar que desempeñan un papel vital entre los mecanismos de xerotolerancia de *Exiguobacterium* sp. Helios, y que un análisis en profundidad de este sistema sería necesario para comprender las implicaciones que tienen en las membranas en desecación.

No se ha visto un aumento de la expresión génica de proteínas relacionadas con síntesis de PG ni sustancias extracelulares poliméricas como EPS, que es uno de los mecanismos de resistencia a la desecación más extendidos (Singh et al., 2021; Zhao et al., 2023), y que son mecanismos que se habían identificado claramente en *E. sibiricum* en el transcriptoma de cultivos a -2,5°C (Rodrigues et al., 2008). Sin embargo, sí se ha visto sobreexpresión de los genes *tag* de la biosíntesis de ácidos teicoicos y lipoteicoicos, lo que indica que se produce un cambio en la composición y en los enlaces del peptidoglicano. La red de polímero de PG es un factor crucial para la configuración de la morfología celular y desempeña un papel fundamental en la protección contra la presión de turgencia celular (Formstone et al., 2008). Estos cambios podrían ser los responsables del aumento de la rigidez detectada por AFM y responsables de la xerotolerancia.

Todos los mecanismos estudiados en la bacteria xerotolerante *Exiguobacterium* sp. Helios se recogen esquemáticamente en la [Figura D3](#). Algunos de ellos han sido ampliamente estudiados en otros modelos de bacterias xerotolerantes, pero algunos otros parecen abrir un nuevo camino, como los cambios tan notables que se producen en la composición de la pared y que la convierten en una bacteria extremadamente dura y resistente, o las posibles consecuencias que pueda tener para la defensa de la célula la expresión de la ruta de degradación del ácido fenilacético.

La importancia de comprender estos mecanismos marca el siguiente paso a seguir, que consistiría en delecionar los genes principales involucrados en cada uno de estos procesos y estudiar en detalle la pérdida de función que se produce en Helios. Las limitaciones en la transformación genética actualmente son evidentes pero se han establecido las bases para optimizar los protocolos de transformación y así llevar la investigación sobre la xerotolerancia de Helios más allá.

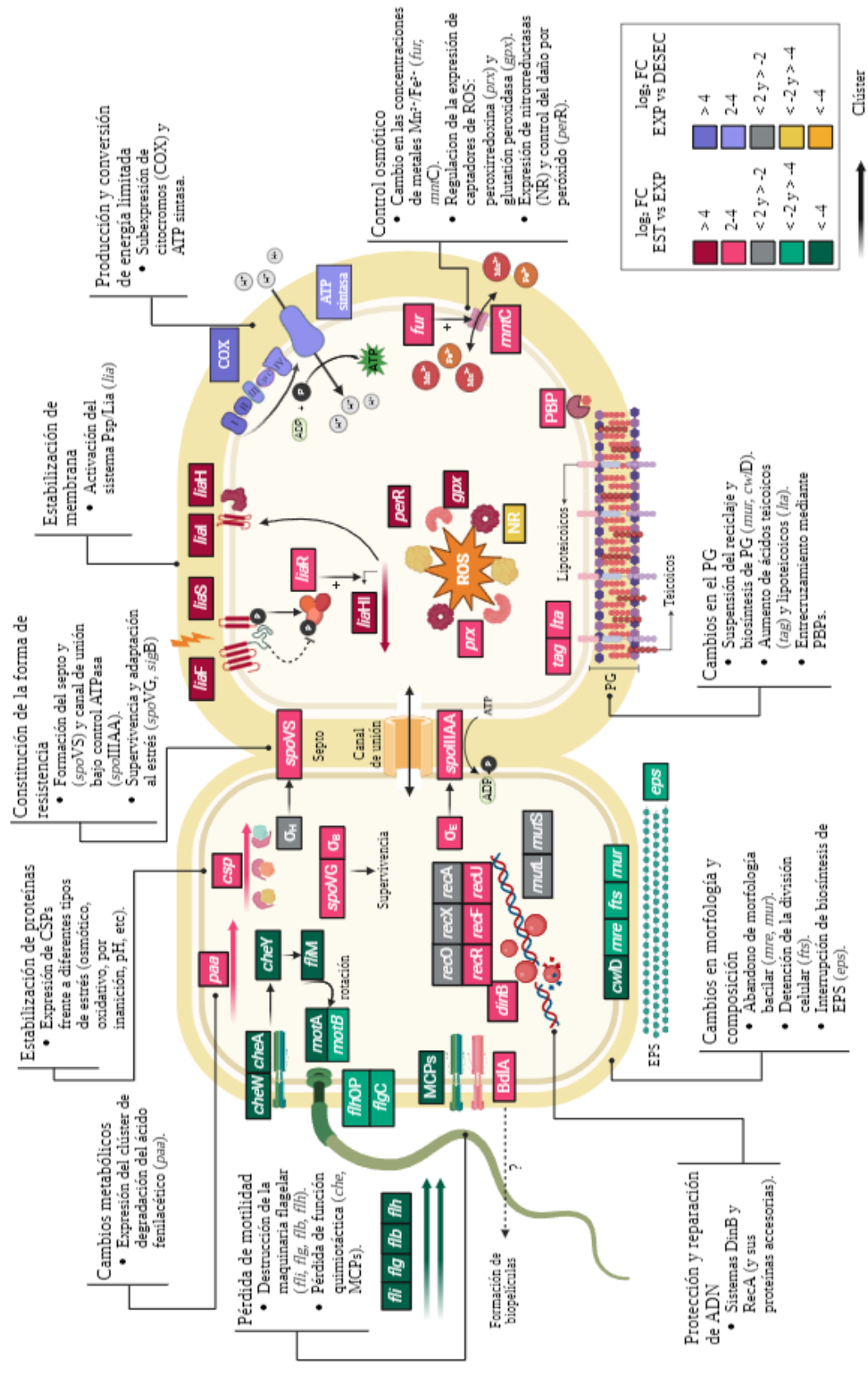


Figura D3. Esquema general de los mecanismos de resistencia a la desecación estudiados en *Exiguobacterium sp. Helios*.

PG: peptidoglicano; EPS: exopolisacárido; PBP: Penicilin-binding protein, CSP: Cold Shock Proteins; ROS: Reactive oxygen species; MCP: methyl-accepting chemotaxis protein; FC: fold change; EXP: fase estacionaria; EST: fase exponencial; DESEC: desecación.

3. Metabolismo de *Exiguobacterium* sp. Helios

En esta tesis doctoral se ha analizado el metabolismo de *Exiguobacterium* sp. Helios con el propósito de validar el primer modelo metabólico de una bacteria de este género (Ferrero-Fernández 2022), elaborado por el grupo de Ingeniería Metabólica de Sistemas del I²SysBio (UVEG-CSIC). Se ha comprobado su crecimiento en varios azúcares, compuestos aromáticos e intermediarios del metabolismo central. Los resultados fueron contrastados con los datos ofrecidos por el modelo y en el caso de algunos compuestos aromáticos se observó que el modelo no contemplaba las reacciones por las que se degradaban estos compuestos. Estos compuestos fueron el benzoato y el 4-hidroxibenzoato. Por lo tanto, habrá que buscar en el genoma genes alternativos no anotados como tales.

Existen varias rutas clásicas de degradación del benzoato. La degradación anaeróbica comienza por su activación a benzoil-CoA, continúa con la reducción de su anillo y por último tiene lugar una ruta de β -oxidación modificada. La degradación aeróbica clásica del benzoato se basa en la hidroxilación del anillo aromático para producir catecol, que luego se desaromatiza mediante una dioxigenasa. Un tercer mecanismo para degradar el benzoato es a través de una vía híbrida aeróbica que inicia la activación del benzoato a benzoil-CoA, sigue con una desaromatización y escisión del anillo, para acabar produciendo succinil-CoA y acetil-CoA mediante un metabolismo similar a la β -oxidación (Valderrama et al., 2012). Pese a que no se pudieron identificar las enzimas que *Exiguobacterium* sp. Helios emplea para la degradación de estos compuestos, queda abierta esta línea de investigación para un trabajo futuro, en el que se contempla realizar un análisis transcriptómico de cultivos en presencia de benzoato y 4-hidroxibenzoato.

Se ha comprobado la capacidad de la bacteria de crecer en condiciones de anaerobiosis, tanto en medios ricos como en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono. Helios parece tener un metabolismo anaerobio más favorable empleando un aceptor de electrones para la respiración anaerobia, pero también es capaz de crecer mediante fermentación.

VII. DISCUSIÓN

Un análisis genético del genoma de *Exiguobacterium* sp. Helios destacó la presencia de auxotrofias relacionadas con el azufre y la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, ya que las rutas están aparentemente incompletas. Se comprobó que Helios no era capaz de crecer en medio mínimo sin suplementarle con leucina, valina, isoleucina y una fuente de azufre como cisteína (datos no mostrados), pero no se pudo conseguir una combinación y concentración de aminoácidos adecuada para satisfacer los requerimientos de la cepa, por lo que se optó por suplementar el medio mínimo M63 con una pequeña cantidad de casaminoácidos.

3.1. Metabolismo del acetato

La propuesta del modelo metabólico a escala genómica (Ferrero-Fernández 2022) de que el metabolismo del acetato no se enmarcaba en las rutas clásicas de utilización de este compuesto supuso un gran reto en esta tesis doctoral. Tras comprobar que *Exiguobacterium* sp. Helios era capaz de crecer en presencia de acetato y determinar que era una característica exclusiva de Helios y que no la compartía con las cepas *E. sibiricum* y *E. antarcticum*, tan cercanas genética y filogenéticamente, se propuso estudiar la expresión genética mediante análisis transcriptómico en presencia de acetato y se comparó con otra fuente de carbono cuyo metabolismo era conocido, como la glucosa.

El análisis diferencial de la expresión de los genes de Helios en ambas condiciones dejó muchos interrogantes. No se pudo dilucidar por qué se encontró una sobreexpresión tan notable de un transportador de carbohidratos tipo ABC que podría tener relación con un sistema de absorción para diésteres de sn-glicerol-3-fosfato y glicerol 3-fosfato. Tampoco se pudo dar una explicación a la elevada expresión de los clústeres de degradación de fenilacetato y fenilalanina que se observó en presencia de acetato.

Sin embargo, se pudo encontrar una ruta hipotética (Figura R3.10) gracias al modelo metabólico que se ajusta a los resultados transcriptómicos. El acetato se internalizaría mediante el transportador ActP dentro de la célula, donde sería activado mediante la acetil-CoA sintetasa ACS en acetil-CoA. La producción de

energía vendría dada por la ruta de biosíntesis de butiril-CoA, que se encuentra sobreexpresada en presencia de acetato, y que condensa dos moléculas de acetil-CoA mediante la acetil-CoA acetiltransferasa (THL). La ruta concluye con la formación de butirato mediante las enzimas fosfato butiriltransferasa (PTB) y butirato quinasa (BUK).

Para la síntesis de biomasa a partir de acetato como fuente de carbono el modelo metabólico a escala genómica (Ferrero-Fernández, 2022) sugiere una vía novedosa basada en la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa PFOR, cuyos niveles de expresión son muy similares tanto en presencia de glucosa como de acetato. La PFOR es una enzima clave en el metabolismo anaeróbico, y se encarga de oxidar el piruvato para generar acetil-CoA, dióxido de carbono (CO₂) y ferredoxina reducida, que actúa como donador de electrones en organismos anaerobios (Katsyv et al., 2021). El modelo metabólico indica que para asimilar acetato se estaría produciendo la reacción inversa, la carboxilación reductiva de acetil-CoA a piruvato. El complejo PFOR que presenta *Exiguobacterium* sp. Helios pertenecería a una clasificación particular de este tipo de enzimas que se caracteriza por ser activo en presencia de oxígeno (Yan et al., 2016; Ferrero-Fernández, 2022). De esta manera, la hipótesis consigue explicar cómo parte del acetato, genera electrones y ATP, y cómo el complejo PFOR podría generar piruvato a partir de acetil-CoA, que a su vez generaría el resto de precursores de la biomasa.

Se han iniciado algunos análisis por HPLC para tratar de detectar metabolitos intermediarios de esta ruta hipotética, y se pretenden realizar fermentaciones en biorreactor para obtener una biomasa suficiente que facilite el análisis. El alto interés de esta posible ruta alternativa de utilización de acetato le da un valor biotecnológico a la bacteria *Exiguobacterium* sp. Helios que va más allá de sus capacidades xerotolerantes o poliextremófilas. El acetato destaca como materia prima ideal y prometedora para la producción de productos bioquímicos mediante diversos microorganismos. El acetato puede obtenerse tanto por métodos biológicos como químicos, incluida la hidrólisis de biomasa lignocelulósica, la digestión anaeróbica, la fermentación de Syngas, la electrosíntesis microbiana y la catálisis química (Gong et al., 2022) (Figura D4). Esto hace que el acetato sea actualmente un sustrato interesante como fuente de

VII. DISCUSIÓN

carbono y energía alternativo al uso de azúcares convencionales, más económico y más eficiente en su asimilación (Kim et al., 2021). El acetato puede transformarse en acetyl-CoA, a través de uno (ACS) o dos pasos (AK y PTA) de catálisis, a diferencia de la conversión de la glucosa, que involucra una ruta más extensa.

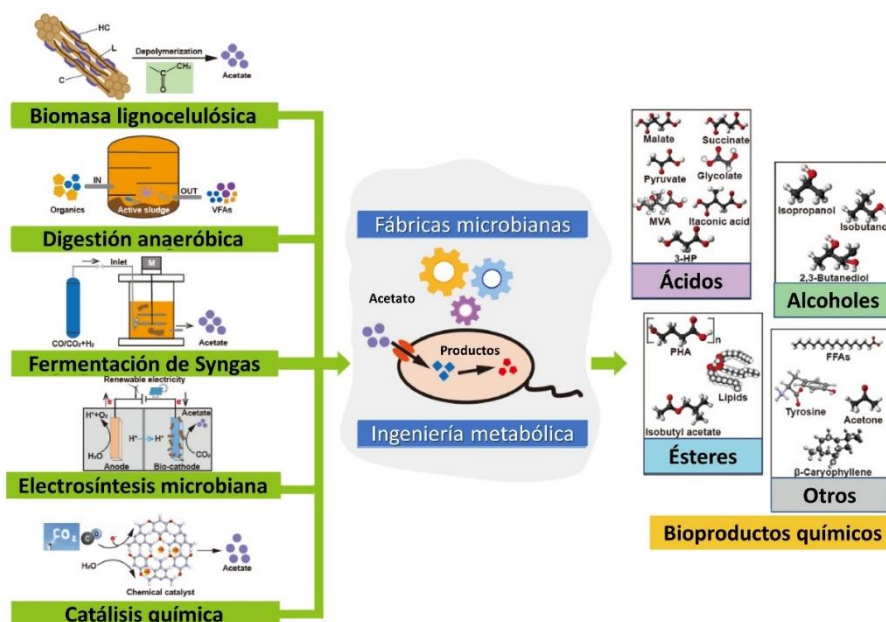


Figura D4. Esquema de diferentes aproximaciones a la generación de acetato y su transformación en productos químicos de base biológica. Adaptado de Gong et al., (2022).

El transporte del acetato hacia el interior de la célula puede ser pasivo, impulsado por el gradiente de concentración o la diferencia de potencial (sin consumo de energía), y activo, donde los simportadores son responsables del transporte de acetato, como el simportador de sodio:soluto, la acetato permeasa (ActP). El transporte de acetato juega un papel crucial en aumentar la velocidad de la asimilación y conversión del acetato, lo que es útil para la ampliación y la industrialización de productos químicos basados en el acetato (Veeravalli et al., 2018).

El acetato puede ser utilizado como materia prima para producir diversos productos químicos de base biológica, ya sean ácidos (piruvato, succinato, 3-hidroxipropionato), alcoholes (etanol, isopropanol, 2,3-butanodiol), ésteres (polihidroxialcanoatos, lípidos) y otros productos químicos (acetona, β-carotenos) mediante ingeniería metabólica (Gong et al., 2022).

Como estrategia para compensar el bajo contenido energético del acetato, muchos estudios han empleado glucosa (u otras fuentes de carbono) y acetato como cosustratos para suministrar más energía. Por ejemplo, utilizando glucosa y acetato como fuentes de carbono combinadas se ha podido producir, manipulando genéticamente la ruta en diferentes puntos, piruvato y lactato como principales productos finales, o solo piruvato (Da et al., 2021). Por lo tanto, una nueva ruta de conversión del acetato en biomasa y metabolitos es de gran interés para el sector biotecnológico. Esta nueva ruta podría suponer la obtención de metabolitos intermediarios o actividades enzimáticas diferentes a los que se pueden obtener con otros chasis productores de acetato, con las ventajas que plantea *Exiguobacterium* sp. Helios por ser anaerobio facultativo, ser capaz de sobrevivir en baja actividad de agua (fermentaciones en estado sólido) o su capacidad para crecer en rangos de pH y temperatura extremos.

VII. Conclusiones

El trabajo descrito en esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones principales:

1. *Exiguobacterium* sp. Helios, aislada de un panel solar y clasificada dentro del Clado I de su género, es una bacteria xerotolerante que posee una resistencia a la desecación comparable a la que posee *D. radiodurans*, que es uno de los organismos más resistentes a la desecación conocidos.
2. *Exiguobacterium* sp. Helios presenta una tolerancia significativa frente al estrés osmótico y la radiación UV, puede crecer a bajas temperaturas y en un amplio rango de pH y, además, soporta bien un alto estrés hidrodinámico en reactor. Todo ello le posiciona como un organismo poli-extremófilo con potencial para convertirse en un chasis para el desarrollo de procesos biotecnológicos.
3. *Exiguobacterium* sp. Helios se puede transformar con plásmidos mediante electroporación empleando los orígenes de replicación de pSH71 y pTHT15.
4. La morfología de *Exiguobacterium* sp. Helios varía entre las distintas fases de crecimiento desde una forma bacilar a una forma cocoide. La forma cocoide presenta una pared muy engrosada que puede explicar su xerotolerancia.
5. *Exiguobacterium* sp. Helios presenta una constante de fuerza mayor en las células de la fase estacionaria frente a las células de fase exponencial, lo que concuerda con los cambios de morfología observados a lo largo de su curva de crecimiento hasta alcanzar la forma cocoide. Sus células poseen una rigidez superior a la de otras bacterias Gram positivas de conocida robustez, como *B. subtilis*.
6. El análisis transcriptómico en las distintas fases de crecimiento sugiere que Helios se prepara en la fase estacionaria para soportar la desecación activando genes de respuesta a estrés, modificando su pared celular, y mejorando la estabilidad de membrana mediada por el sistema Psp/Lia. (*Phage shock proteins*, proteínas de respuesta a la infección por fagos).
7. *Exiguobacterium* sp. Helios puede crecer con acetato como fuente de carbono y energía, aunque en su modelo metabólico no se encuentra ninguna de las rutas

VIII. CONCLUSIONES

conocidas que permiten el crecimiento con acetato. Por ello, se propone una ruta alternativa que incluye la ruta de síntesis de butiril-CoA y la posible adaptación de la enzima PFOR (piruvato-ferredoxina oxidoreductasa) para trabajar en condiciones aeróbicas.

IX. Referencias

- Abecasis, A. B., Serrano, M., Alves, R., Quintais, L., Pereira-Leal, J. B., & Henriques, A. O. (2013). A genomic signature and the identification of new sporulation genes. *Journal of Bacteriology*, 195(9), 2101-2115. <https://doi.org/10.1128/JB.02110-12>
- Aburto, C., Castillo, C., Cornejo, F.A., Arenas-Salinas, M., Vásquez, C.C., Guerrero, C., Arenas, F., Illanes, A., & Vera, C. (2019). β -Galactosidase from *Exiguobacterium acetylicum*: Cloning, expression, purification and characterization. *Bioresource Technology*, 277, 211-215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.005>
- Adebayo-Tayo, B. C., Yusuf, B. O., & Alao, S. O. (2021). Antibacterial activity of intracellular greenly fabricated selenium nanoparticle of *Lactobacillus pentosus* ADET MW861694 against Selected Food Pathogens. *The International Journal of Biotechnology*, 10(1), 39-51. <https://doi.org/10.18488/journal.57.2021.101.39.51>
- Ahmed, M., Hayat, R., Ahmad, M., Ul-Hassan, M., Kheir, A. M. S., Ul-Hassan, F., Ur-Rehman, M. H., Shaheen, F. A., Raza, M. A., & Ahmad, S. (2022). Impact of climate change on dryland agricultural systems: a review of current status, potentials, and further work need. *International Journal of Plant Production*, 16(3), 341-363. <https://doi.org/10.1007/s42106-022-00197-1>
- Alam, H., Khatoon, N., Khan, M. A., Husain, S. A., Saravanan, M., & Sardar, M. (2020). Synthesis of Selenium Nanoparticles Using Probiotic Bacteria *Lactobacillus acidophilus* and Their Enhanced Antimicrobial Activity Against Resistant Bacteria. *Journal of Cluster Science*, 31(5), 1003-1011. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01705-6>
- Allison, M. J., Baetz, A. L., & Wiegel, J. (1984). Alternative pathways for biosynthesis of leucine and other amino acids in *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides fragilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(6), 1111-1117. <https://doi.org/10.1128/aem.48.6.1111-1117.1984>
- Allsup, C. M., George, I., & Lankau, R. A. (2023). Shifting microbial communities can enhance tree tolerance to changing climates. *Science*, 380(6647), 835-840. <https://doi.org/10.1126/science.adf2027>
- Alpert, P. (2005). The limits and frontiers of Desiccation-Tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 685-695. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.685>
- Ando, N., Barquera, B., Bartlett, D. H., Boyd, E., Burnim, A. A., Byer, A. S., Colman, D., Gillilan, R. E., Gruebele, M., Makhatadze, G., Royer, C. A., Shock, E., Wand, A. J., & Watkins, M. B. (2021). The molecular basis for life in extreme environments. *Annual Review of Biophysics*, 50, 343-372. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-100120-072804>
- Andre, G., Kulakauskas, S., Chapot-Chartier, M.-P., Navet, B., Deghorain, M., Bernard, E., Hols, P., & Dufrêne, Y. F. (2010). Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living *Lactococcus lactis* cells. *Nature Communications*, 1(1), 27. <https://doi.org/10.1038/ncomms1027>
- Ao, B., Du, Q., Liu, D., Shi, X., Tu, J., & Xia, X. (2023). A review on synthesis and antibacterial potential of bio-selenium nanoparticles in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1229838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1229838>
- Appukuttan, D., Seo, H. S., Jeong, S., Im, S. B., Joe, M., Song, D., Choi, J., & Lim, S. (2015). Expression and mutational analysis of DinB-Like protein DR0053 in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One*, 10(2), e0118275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118275>

IX. REFERENCIAS

- Aranda, J., Bardina, C., Beceiro, A., Rumbo, S., Cabral, M. P., Barbé, J., & Bou, G. (2011). *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *Journal of Bacteriology*, 193(15), 3740-3747. <https://doi.org/10.1128/jb.00389-11>
- Arora, P., & Bae, H. (2015). Biodegradation of 4-chloroindole by *Exiguobacterium* sp. PMA. *Journal of Hazardous Materials*, 284, 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.021>
- Arora, S., Rani, R., & Ghosh, S. (2018). Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 269, 16-34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>
- Atanasova, N., Stoitsova, S., Paunova-Krasteva, T., & Kambourova, M. (2021). Plastic degradation by extremophilic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5610. <https://doi.org/10.3390/ijms22115610>
- Atieno, M., Wilson, N., Casteriano, A., Crossett, B., Lesueur, D., & Deaker, R. (2018). Aqueous peat extract exposes rhizobia to sub-lethal stress which may prime cells for improved desiccation tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), 7521-7539. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9086-2>
- Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., & Babalola, O. O. (2022). Bioprospecting and challenges of plant microbiome research for sustainable agriculture, a review on soybean endophytic bacteria. *Microbial Ecology*, 85(3), 1113-1135. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02136-z>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, P., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bandi, D. R., Chitturi, C. M. K., Aswathanarayan, J. B., Veeresh, P. K. M., Bovilla, V. R., Sukocheva, O. A., Devi, P. S., Natraj, S. M., & Madhunapantula, S. V. (2023). Pigmented Microbial Extract (PMB) from *Exiguobacterium* Species MB2 Strain (PMB1) and *Bacillus subtilis* Strain MB1 (PMB2) Inhibited Breast Cancer Cells Growth In Vivo and In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/ijms242417412>
- Bao, Y., Zhou, Q., Yu, X., Yu, X., & Castellino, F. J. (2023). Analysis and characterization of glutathione peroxidases in an environmental microbiome and isolated bacterial microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 299-309. <https://doi.org/10.4014/jmb.2209.09006>
- Baraúna, R. A., Freitas, D. Y., Pinheiro, J. C., Folador, A. R. C., & Silva, A. M. S. (2017). A Proteomic perspective on the bacterial adaptation to cold: integrating OMICs data of the psychrotrophic bacterium *Exiguobacterium antarcticum* B7. *Proteomes*, 5(4), 9. <https://doi.org/10.3390/proteomes5010009>
- Barghoth, M. G., Desouky, S. E., Radwan, A. A., Shah, M. P., & Salem, S. S. (2023). Characterizations of highly efficient moderately halophilic toluene degrading *Exiguobacterium mexicanum* M7 strain isolated from Egyptian saline sediments. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 1-19. <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2184053>

- Bednarska, N. G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., & Van Eldere, J. (2013). Protein aggregation in bacteria: the thin boundary between functionality and toxicity. *Microbiology*, 159(Pt_9), 1795-1806. <https://doi.org/10.1099/mic.0.069575-0>
- Berleman, J. E., & Bauer, C. E. (2004). Characterization of cyst cell formation in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum centenum*. *Microbiology*, 150(2), 383-390. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26846-0>
- Bisht, N., Phalswal, P., & Khanna, P. K. (2022). Selenium nanoparticles: A review on synthesis and biomedical applications. *Materials Advances*, 3(3), 1415-1431. <https://doi.org/10.1039/D1MA00639H>
- Blasius, M., Sommer, S., & Hübscher, U. (2008). *Deinococcus radiodurans*: What belongs to the survival kit? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3), 221-238. <https://doi.org/10.1080/10409230802122274>
- Blesa, A., & Berenguer, J. (2016). Transformation of thermus species by natural competence. *Bio-protocol*, 6(22). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2007>
- Blin, K., Shaw, S. J., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). AntISMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W46-W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Boddu, R. S., Perumal, O., & Divakar, K. (2020). Microbial nitroreductases: a versatile tool for biomedical and environmental applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 68: 1518-1530. <https://doi.org/10.1002/bab.2073>
- Bogdanov, M., Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2008). Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: Implications for lipid-linked disorders. *En Sub-cellular biochemistry* (pp. 197-239). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8831-5_8
- Boothby, T. E., Tapia, H., Brozena, A. H., Piszkiwicz, S., Smith, A. E., Giovannini, I., Rebecchi, L., Pielak, G. J., Koshland, D., & Goldstein, B. (2017). Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation. *Molecular Cell*, 65(6), 975-984.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.018>
- Bosch, J., Varliero, G., Hallsworth, J. E., Dallas, T. D., Hopkins, D. W., Frey, B., Kong, W., Lebre, P. H., Makhalanyane, T. P., & Cowan, D. A. (2021). Microbial anhydrobiosis. *Environmental Microbiology*, 23(11), 6377-6390. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15699>
- Bratbak, G., & Dundas, I. (1984). Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 755-757. <https://doi.org/10.1128/aem.48.4.755-757.1984>
- Bremer, E., & Krämer, R. (2019). Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 313-334. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115504>
- Brigidi, P., De Rossi, E., Bertarini, M., Riccardi, G., & Matteuzzi, D. (1990). Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 67(1-2), 135-138. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb13850.x>

IX. REFERENCIAS

- Brim, H., McFarlan, S. C., Fredrickson, J. K., Minton, K. W., Zhai, M., Wackett, L. P., & Daly, M. J. (2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology*, 18(1), 85-90. <https://doi.org/10.1038/71986>
- Brock, T. D., & Freeze, H. H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98(1), 289-297. <https://doi.org/10.1128/jb.98.1.289-297.1969>
- Brumwell, S. L., Van Belois, K. D., Giguere, D. J., Edgell, D. R., & Karas, B. J. (2022). Conjugation-Based genome engineering in *Deinococcus radiodurans*. *ACS Synthetic Biology*, 11(3), 1068-1076. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00524>
- Canganella, F., & Wiegel, J. (2011). Extremophiles: From abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Die Naturwissenschaften*, 98(4), 253-279. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0775-2>
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunić, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). EggNOG-Mapper V2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38(12), 5825-5829. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>
- Carballido-López, R., & Formstone, A. (2007). Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 611-616. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.008>
- Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., & Corsaro, M. M. (2018). Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. *Marine Drugs*, 16(2), 69. <https://doi.org/10.3390/md16020069>
- Castillo, M., Galán, B., Carmona, M., Lloréns, J. M. N., Peretó, J., Porcar, M., Getino, L., Olivera, E. R., Luengo, J. M., Castro, L., & García, J. L. (2021). Xerotolerance: a new property in *Exiguobacterium* genus. *Microorganisms*, 9(12), 2455. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122455>
- Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Mendez, K. N., Morales, N., Márquez, S., Molina, F., Remonsellez, F., Castro-Nallar, E., & Saavedra, C. P. (2020). Genomic variation and arsenic tolerance emerged as niche specific adaptations by different *Exiguobacterium* strains isolated from the extreme Salar de Huasco environment in Chilean - Altiplano. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1632. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01632>
- Castro-Severyn, J., Remonsellez, F., Valenzuela, S. L., Salinas, C., Fortt, J., Aguilar, P. S., Pardo-Esté, C., Dorador, C., Quatrini, R., Molina, F., Aguayo, D., Castro-Nallar, E., & Saavedra, C. P. (2017). Comparative genomics analysis of a new *Exiguobacterium* strain from Salar de Huasco reveals a repertoire of stress-related genes and arsenic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 8: 456. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00456>
- Chaffey, N. (2003). Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular Biology of the Cell. 4th Edn. *Annals of Botany*, 91(3), 401. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg023>
- Chaturvedi, P., & Shivaji, S. (2006). *Exiguobacterium indicum* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(12), 2765-2770. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64508-0>

- Chaturvedi, P., Prabakar, V., Manorama, R., Pindi, P. K., Bhadra, B., Begum, Z., & Shivaji, S. (2008). *Exiguobacterium soli* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(10), 2447-2453. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000067-0>
- Chauhan, D., Agrawal, G., Deshmukh, S., Roy, S. S., & Priyadarshini, R. (2018). Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation. *RSC Advances*, 8(66), 37590-37599. <https://doi.org/10.1039/c8ra06448b>
- Chen, G., & Jiang, X. (2018). Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.016>
- Chikkanna, A., Ghosh, D., & Kishore, A. (2018). Expression and characterization of a potential exopolysaccharide from a newly isolated halophilic thermotolerant bacteria *Halomonas nitroreducens* strain WB1. *PeerJ*, 6, e4684. <https://doi.org/10.7717/peerj.4684>
- Coker, J. (2016). Extremophiles and Biotechnology: Current uses and Prospects. *F1000Research*, 5, 396. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7432.1>
- Coker, J. (2019). Recent advances in understanding extremophiles. *F1000Research*, 8, 1917. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20765.1>
- Coker, J. (2023). 'All about' extremophiles. *Faculty reviews*, 12. <https://doi.org/10.12703/r/12-27>
- Collins, M. D., Lund, B. M., Farrow, J. A. E., & Schleifer, K. (1983). Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*, 129(7), 2037-2042. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-7-2037>
- Collins, T. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(1S), S25-S30. <https://doi.org/10.2144/000112517>
- Cong, M., Jiang, Q., Xu, X., Huang, L., Su, Y., & Yan, Q. (2017). The complete genome sequence of *Exiguobacterium arabatum* W-01 reveals potential probiotic functions. *MicrobiologyOpen*, 6(5). <https://doi.org/10.1002/mbo3.496>
- Cooper, S. T., & McNeil, P. L. (2015). Membrane repair: mechanisms and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 95(4), 1205-1240. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2014>
- Cowan, D. A., Ramond, J., Makhalanyane, T. P., & De Maayer, P. (2015). Metagenomics of extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.005>
- Crapart, S., Fardeau, M., Cayol, J., Thomas, P., Sery, C., Ollivier, B., & Combet-Blanc, Y. (2007). *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(2), 287-292. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64639-0>
- Cytryn, E., Sangurdekar, D., Streeter, J. G., Franck, W. L., Chang, W. S., Stacey, G., Emerich, D. W., Joshi, T., Xu, D., & Sadowsky, M. J. (2007). Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to Desiccation-Induced Stress. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6751-6762. <https://doi.org/10.1128/jb.00533-07>

IX. REFERENCIAS

- Da, Y.-Y., Liu, Z.-H., Zhu, R., & Li, Z.-J. (2021). Couitilization of glucose and acetate for the production of pyruvate by engineered *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 170, 107990. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107990>
- Dall'Agnol, H., Baraúna, R. A., De Sá, P. H. C. G., Ramos, R. T. J., Nóbrega, F., Nunes, C., Graças, D. A. D., Carneiro, A. R., Santos, D. M. D., Pimenta, A. M., Carepo, M. S. P., Azevedo, V., Pellizari, V. H., Schneider, M. P. C., & Silva, A. M. S. (2014). OMics profiles used to evaluate the gene expression of *Exiguobacterium antarcticum* B7 during cold adaptation. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-986>
- Darmon, E., & Leach, D. R. F. (2014). Bacterial genome instability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 1-39. <https://doi.org/10.1128/membr.00035-13>
- Dastager, S. G., Mawlankar, R., Sonalkar, V. V., Thorat, M. N., Mual, P., Verma, A., Krishnamurthi, S., Tang, S., & Li, W. (2015). *Exiguobacterium enclense* sp. nov., isolated from sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_5), 1611-1616. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000149>
- De Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., & Baró, A. M. (1998). Jumping mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters*, 73(22), 3300-3302. <https://doi.org/10.1063/1.122751>
- Del Peso-Santos, T., Bartolomé-Martín, D., Fernández, C., Alonso, S., García, J. L., Díaz, E., Shingler, V., & Perera, J. (2006). Coregulation by phenylacetyl-coenzyme A-responsive PaaX integrates control of the upper and lower pathways for catabolism of styrene by *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4812-4821. <https://doi.org/10.1128/jb.00176-06>
- Delegan, Y., Kocharovskaya, Y., БоруН, А. Г., Sizova, A. A., Solomentsev, V. I., Iminova, L., Lyakhovchenko, N., Zinovieva, A., Goyanov, M., & Solyanikova, I. P. (2021). Characterization and genomic analysis of *Exiguobacterium alkaliphilum* B-3531D, an efficient crude oil degrading strain. *Biotechnology Reports*, 32, e00678. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00678>
- Deng, X., Li, Z., & Zhang, W. (2012). Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*, 30(1), 311-315. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.001>
- Dhakar, K., & Pandey, A. (2016). Wide pH range tolerance in extremophiles: Towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2499-2510. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7285-2>
- Dias, L. M., Folador, A. R. C., Oliveira, A. M., Ramos, R. T. J., Silva, A., & Baraúna, R. A. (2018). Genomic architecture of the two cold-adapted genera *Exiguobacterium* and *Psychrobacter*: Evidence of Functional Reduction in the *Exiguobacterium antarcticum* B7 Genome. *Genome Biology and Evolution*, 10(3), 731-741. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy029>
- Dias, M., Huang, F., Chirgadze, D. Y., Tosin, M., Spitteller, D., Dry, E. F. V., Leadlay, P. F., Spencer, J. B., & Blundell, T. L. (2010). Structural basis for the activity and substrate specificity of fluoroacetyl-CoA thioesterase FIK. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22495-22504. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.107177>

- Dorado-Morales, P., Vilanova, C., Peretó, J., Codoñer, F. M., Ramón, D., & Porcar, M. (2016). A highly diverse, desert-like microbial biocenosis on solar panels in a Mediterranean city. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep29235>
- Drula, É., Garron, M., Doğan, S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2021). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D571-D577. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
- Dufrêne, Y. F., Viljoen, A., Mignolet, J., & Mathelié-Guinlet, M. (2021). AFM in cellular and molecular microbiology. *Cellular Microbiology*, 23(7), e13324. <https://doi.org/10.1111/cmi.13324>
- Dupuy, P., Gourion, B., Sauviac, L., & Bruand, C. (2017). DNA double-strand break repair is involved in desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti*, but is not essential for its symbiotic interaction with *Medicago truncatula*. *Microbiology*, 163(3), 333-342. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000400>
- Eijlander, R. T., Holsappel, S., De Jong, A., Ghosh, A., Christie, G., & Kuipers, O. P. (2016). SPOVT: From Fine-Tuning regulator in *Bacillus subtilis* to essential sporulation protein in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1607. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01607>
- Eliassi, A., Modarress, H., & Mansoori, G. A. (1998). Measurement of activity of water in aqueous poly(ethylene glycol) solutions (Effect of excess volume on the Flory–Huggins X-Parameter). *Journal of Chemical & Engineering Data*, 44(1), 52-55. <https://doi.org/10.1021/je980162z>
- Ensign, S. A. (2006). Revisiting the glyoxylate cycle: Alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Molecular Microbiology*, 61(2), 274-276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05247.x>
- Etemadifar, Z., Gholami, M., & Derikvand, P. (2016). UV-resistant bacteria with multiple-stress tolerance isolated from desert areas in Iran. *Geomicrobiology Journal*, 33(7), 1-7. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1063025>
- Falagán, C., & Johnson, D. B. (2016). *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 206-211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000698>
- Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Müller, R., & Märkl, H. (2001). Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp. A2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5-6), 744-750. <https://doi.org/10.1007/s002530100823>
- Filipović, A. (2021). Water plant and soil relation under stress situations. En *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93528>
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A., & Fanning, S. (2013). Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology*, 4: 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331>
- Formosa, C., Schiavone, M., Boisramé, A., Richard, M. L., Duval, R. E., & Dague, É. (2015). Multiparametric imaging of adhesive nanodomains at the surface of *Candida albicans* by atomic force microscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.07.008>

IX. REFERENCIAS

- Formstone, A., Carballido-López, R., Noirot, P., Errington, J., & Scheffers, D.-J. (2008). Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1812-1821. <https://doi.org/10.1128/JB.01394-07>
- Förster-Fromme, K., & Jendrossek, D. (2005). Malate:Quinone oxidoreductase (MQOB) is required for growth on acetate and linear terpenes in *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.034>
- França, M. B., Panek, A. D., & Eleuthério, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 621-631. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>
- Fredrickson, J. K., Li, S. W., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Zhai, M., Sulloway, H. M., Scholten, J. C. M., Brown, M. G., Balkwill, D. L., & Daly, M. J. (2008). Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *The ISME Journal*, 2(4), 393-403. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.116>
- Frühling, A., Schümann, P., Hippe, H., Sträubler, B., & Stackebrandt, E. (2002). *Exiguobacterium undae* sp. nov. and *Exiguobacterium antarcticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), 1171-1176. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-4-1171>
- Furdui, C. M., & Ragsdale, S. W. (2000). The role of pyruvate Ferredoxin oxidoreductase in pyruvate synthesis during autotrophic growth by the Wood-Ljungdahl Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28494-28499. <https://doi.org/10.1074/jbc.m003291200>
- Gallo, G., Puopolo, R., Carbonaro, M., Maresca, E., & Fiorentino, G. (2021). Extremophiles, a nifty tool to face environmental pollution: from exploitation of metabolism to genome engineering. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5228. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105228>
- Gangoiti, J., Pijning, T., & Dijkhuizen, L. (2016). The *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 GTFC enzyme represents a novel glycoside hydrolase 70 subfamily of 4,6-A-Glucanotransferase enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 756-766. <https://doi.org/10.1128/aem.03420-15>
- García, A. H. (2011). Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. *Journal of Biosciences*, 36(5), 939-950. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9107-0>
- García-Betancur, J. C., Goñi-Moreno, Á., Horger, T., Schott, M., Sharan, M., Eikmeier, J., Wohlmuth, B., Zerneck, A., Ohlsen, K., Kuttler, C., & López, D. (2017). Cell differentiation defines acute and chronic infection cell types in *Staphylococcus aureus*. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/elife.28023>
- García-Fontana, C., Narváez-Reinaldo, J. J., Castillo, F., González-López, J., Luque, I., & Manzanera, M. (2016). A new physiological role for the DNA molecule as a protector against drying stress in desiccation-tolerant microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02066>
- García-Gutierrez, C., Aparicio, T., Torres-Sánchez, L., Martínez-García, E., De Lorenzo, V., Villar, C. J., & Lombó, F. (2020). Multifunctional SEVA shuttle vectors for actinomycetes and gram-negative bacteria. *Microbiology Open*, 9(6), 1135-1149. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1024>

- Gayoso, C., Mateos, J., Méndez, J. A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., De Ilárduya, Ó. M., & Bou, G. (2013). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*, 13(2), 460-476. <https://doi.org/10.1021/pr400603f>
- Gerber, E., Bernard, R., Castang, S., Chabot, N., Coze, F., Dreux-Zigha, A., Hauser, E. A., Hivin, P., Joseph, P., Lazarelli, C., Letellier, G., Olive, J., & Léonetti, J. (2015). *Deinococcus* as new chassis for industrial biotechnology: biology, physiology and tools. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/jam.12808>
- Gerday, C., & Glansdorff, N. (2007). Physiology and Biochemistry of Extremophiles. ASM Press. https://books.google.es/books?id=k_UeSiCmyaQC
- Gilmore, M. E., Bandyopadhyay, D., Dean, A. M., Linnstaedt, S. D., & Popham, D. L. (2004). Production of muramic Δ -Lactam in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, 186(1), 80-89. <https://doi.org/10.1128/jb.186.1.80-89.2004>
- Godoy, P., Mourenza, Á., Hernández-Romero, S., González-López, J., & Manzanera, M. (2018). Microbial production of ethanol from sludge derived from an urban wastewater treatment plant. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2634. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02634>
- Gong, G., Wu, B., Liu, L., Li, J., Zhu, Q., He, M., & Hu, G. (2022). Metabolic engineering using acetate as a promising building block for the production of bio-based chemicals. *Engineering Microbiology*, 2(4), 100036. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100036>
- González, K., Parra, B., Smith, C. T., & Martínez, M. Á. (2019). Glycine betaine effect on dormancy in *Deinococcus* sp. UDEC-P1 and *Psychrobacter* sp. UDEC-A5 exposed to hyperosmotic stress. *Current Microbiology*, 76(12), 1435-1442. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01763-z>
- Goss, J. W., & Volle, C. B. (2020). Using atomic force microscopy to illuminate the biophysical properties of microbes. *ACS Applied Bio Materials*, 3(1), 143-155. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00973>
- Gray, D. A., Dugar, G., Gamba, P., Strahl, H., Jonker, M. J., & Hamoen, L. W. (2019). Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08719-8>
- Grefte, V. R. G., & Michiels, J. (2020). Desiccation-induced cell damage in bacteria and the relevance for inoculant production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), 3757-3770. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10501-6>
- Gruzdev, N., McClelland, M., Porwollik, S., Ofaim, S., Pinto, R., & Saldinger-Sela, S. (2012). Global transcriptional analysis of dehydrated *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 7866-7875. <https://doi.org/10.1128/aem.01822-12>
- Grzyb, T., & Skłodowska, A. (2022). Introduction to bacterial anhydrobiosis: a general perspective and the mechanisms of desiccation-associated damage. *Microorganisms*, 10(2), 432. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020432>
- Guevara, G., Flores, Y. O., De Las Heras, L. F., Perera, J., & Lloréns, J. M. N. (2019). Metabolic Engineering of *Rhodococcus Ruber* CHOL-4: A cell factory for testosterone production. *PLoS One*, 14(7), e0220492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220492>

IX. REFERENCIAS

- Gutiérrez-Preciado, A., Vargas-Chávez, C., Reyes-Prieto, M., Ordoñez, O. F., Santos-García, D., Rosas-Pérez, T., Valdivia-Anistro, J., Rebollar, E. A., Saralegui, A., Moya, A., Merino, E., Farías, M. E., Latorre, A., & Souza, V. (2017). The genomic sequence of *Exiguobacterium Chiriqhucha* str. N139 reveals a species that thrives in cold waters and extreme environmental conditions. *PeerJ*, 5, e3162. <https://doi.org/10.7717/peerj.3162>
- Hadad, D. J., Geresh, S., & Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1093-1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x>
- Han, X., Qu, Y., Dong, Y., Chen, D., Liang, D., Liu, J., Zhang, J., Ren, N., & Feng, Y. (2021). Simultaneous electricity generation and eutrophic water treatment utilizing iron coagulation cell with nitrification and denitrification biocathodes. *Science of The Total Environment*, 782, 146436. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146436>
- Halverson, L. J., & Firestone, M. K. (2000). Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2414-2421. <https://doi.org/10.1128/aem.66.6.2414-2421.2000>
- Hansen, L. T., & Vogel, B. F. (2011). Desiccation of adhering and biofilm listeria monocytogenes on stainless steel: survival and transfer to salmon products. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.032>
- Harold, L. K., Jinich, A., Hards, K., Cordeiro, A., Keighley, L. M., Cross, A., McNeil, M. B., Rhee, K. Y., & Cook, G. M. (2022). Deciphering functional redundancy and energetics of malate oxidation in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 298(5), 101859. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101859>
- He, Y. (2009). High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(4), 539-546. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0524-5>
- Helalat, S. H., Jers, C., Bebahani, M., Mohabatkar, H., & Mijaković, I. (2021). Metabolic engineering of *Deinococcus radiodurans* for pinene production from glycerol. *Microbial Cell Factories*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01674-4>
- Hemsinli, A., & Gurkok, S. (2023). Evaluation of a novel purified and characterized alkaline protease from the extremophile *Exiguobacterium alkaliphilum* VLP1 as a detergent additive. *Biotechnology Journal*, e2300441. <https://doi.org/10.1002/biot.202300441>
- Hernández-Fernández, G., Galán, B., Carmona, M., Castro, L., & García, J. L. (2022). Transcriptional response of the xerotolerant *Arthrobacter* sp. Helios strain to PEG-induced drought stress. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1009068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1009068>
- Hingston, P., Piercey, M., & Hansen, L. T. (2015). Genes associated with desiccation and osmotic stress in listeria monocytogenes as revealed by insertional mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5350-5362. <https://doi.org/10.1128/aem.01134-15>
- Hoffmann, T. and Bremer, E. (2016). Management of Osmotic Stress by *Bacillus subtilis*: Genetics and Physiology. In *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression*

- and Adaptation in Bacteria*, de Bruijn, F.J. (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch63>
- Höfte, M., Seong, K. Y., Jurkevitch, E., & Verstraete, W. (1991). Pyoverdinin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2: Ecological significance in soil. *Plant and Soil*, 130(1), 249-257. <https://doi.org/10.1007/BF00011880>
- Hooppaw Anna J., McGuffey Jenna C., Di Venanzio Gisela, Ortiz-Marquez Juan C., Weber Brent S., Lightly Tasia Joy, van Opijnen Tim, Scott Nichollas E., Cardona Silvia T., & Feldman Mario F. (2022). The Phenylacetic Acid Catabolic Pathway Regulates Antibiotic and Oxidative Stress Responses in *Acinetobacter*. *mBio*, 13(3), e01863-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.01863-21>
- Huang, Q., Zhang, Z., Liu, Q., Liu, F., Liu, Y., Zhang, J., & Wang, G. (2021). SpoVG is an important regulator of sporulation and affects biofilm formation by regulating Spo0A transcription in *Bacillus cereus* 0-9. *BMC Microbiology*, 21(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02239-6>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309-D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Humann, J. L., Ziemkiewicz, H. T., Yurgel, S. N., & Kahn, M. L. (2009). Regulatory and DNA repair genes contribute to the desiccation resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 446-453. <https://doi.org/10.1128/AEM.02207-08>
- Hwang, J., Yoo, W., Shin, S. C., Kim, K. K., Kim, H.-W., Do, H., & Lee, J. H. (2023). Structural and Biochemical Insights into Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate Degrading Carboxylesterase Isolated from Psychrotrophic Bacterium *Exiguobacterium antarcticum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/ijms241512022>
- Irwin, J. A. (2020). Overview of extremophiles and their food and medical applications. En *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 65-87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00006-X>
- Islas, S., Velasco, A. A., Becerra, A., Delaye, L., & Lazcano, A. (2014). Chapter 1—Extremophiles and the origin of life. En C. Gerday & N. Glansdorff (Ed.) *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* ASM Press eBooks (pp. 1-10). <https://doi.org/10.1128/9781555815813.ch1>
- Jardine, J. L., Stoychev, S., Mavumengwana, V., & Ubomba-Jaswa, E. (2018). Screening of potential bioremediation enzymes from hot spring bacteria using conventional plate assays and liquid chromatography—Tandem mass spectrometry (Lc-Ms/Ms). *Journal of Environmental Management*, 223, 787-796. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.06.089>
- Jiao, M., He, W., Ouyang, Z., Shi, Q., & Wen, Y. (2022). Progress in structural and functional study of the bacterial phenylacetic acid catabolic pathway, its role in pathogenicity and antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 13, 964019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.964019>

IX. REFERENCIAS

- Jinendiran, S., Dahms, H.-U., Dileep Kumar, B. S., Kumar Ponnusamy, V., & Sivakumar, N. (2020). Diapolycopenedioic-acid-diglucosyl ester and keto-myxocoxanthin glucoside ester: Novel carotenoids derived from *Exiguobacterium acetylicum* S01 and evaluation of their anticancer and anti-inflammatory activities. *Bioorganic Chemistry*, 103, 104149. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104149>
- Kageyama, H., & Waditee-Sirisattha, R. (2022). Chapter 9—Osmoprotectant molecules in cyanobacteria: Their basic features, biosynthetic regulations, and potential applications. En H. Kageyama & R. Waditee-Sirisattha (Eds.), *Cyanobacterial Physiology* (pp. 113-123). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96106-6.00006-X>
- Karagulyan, M., Goebel, M.-O., Diehl, D., Abu Quba, A. A., Kästner, M., Bachmann, J., Wick, L. Y., Schaumann, G. E., & Miltner, A. (2022). Water stress-driven changes in bacterial cell surface properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(21), e00732-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00732-22>
- Kasana, R. C., & Pandey, C. B. (2018). *Exiguobacterium*: An overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), 141-156. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312273>
- Katoh, H., Asthana, R. K., & Ohmori, M. (2004). Gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 under desiccation. *Microbial Ecology*, 47(2), 164-174. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1043-6>
- Katsyv, A., Schoelmerich, M. C., Basen, M., & Müller, V. (2021). The pyruvate:ferredoxin oxidoreductase of the thermophilic acetogen, *Thermoanaerobacter kivui*. *FEBS Open Bio*, 11(5), 1332-1342. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13136>
- Kaur, A., Capalash, N., & Sharma, P. (2019). Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications. *Microbiological Research*, 221, 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.01.003>
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M., & Korkeala, H. (2016). Cold shock proteins: a minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01151>
- Kim, I.-G., Lee, M.-H., Jung, S.-Y., Song, J. J., Oh, T.-K., & Yoon, J.-H. (2005). *Exiguobacterium aestuarii* sp. nov. and *Exiguobacterium marinum* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 2), 885-889. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63308-0>
- Kim, Y., Lama, S., Agrawal, D., Kumar, V., & Park, S. (2021). Acetate as a potential feedstock for the production of value-added chemicals: Metabolism and applications. *Biotechnology Advances*, 49, 107736. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107736>
- Kochan, K., Nethercott, C., Perez-Guaita, D., Jiang, J.-H., Peleg, A. Y., Wood, B. R., & Heraud, P. (2019). Detection of Antimicrobial Resistance-Related Changes in Biochemical Composition of *Staphylococcus aureus* by Means of Atomic Force Microscopy-Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 91(24), 15397-15403. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01671>

- Köhn, B., & Kovermann, M. (2019). Macromolecular crowding tunes protein stability by manipulating solvent accessibility. *Chembiochem*, 20(6), 759-763. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800679>
- Komatsu, K., Lee, J.-Y., Miyata, M., Hyang Lim, J., Jono, H., Koga, T., Xu, H., Yan, C., Kai, H., & Li, J.-D. (2013). Inhibition of PDE4B suppresses inflammation by increasing expression of the deubiquitinase CYLD. *Nature Communications*, 4, 1684. <https://doi.org/10.1038/ncomms2674>
- Koyano, Y., Okajima, K., Mihara, M., & Yamamoto, H. (2023). Visualization of wall teichoic acid decoration in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 205(4), e0006623. <https://doi.org/10.1128/jb.00066-23>
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>
- Kruger, M. C., Bertin, P. N., Heipieper, H. J., & Arsène-Ploetze, F. (2013). Bacterial metabolism of environmental arsenic—Mechanisms and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 3827-3841. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4838-5>
- Kumar, R., Sood, U., Kaur, J., Anand, S., Gupta, V., Patil, K. S., & Lal, R. (2022). The rising dominance of microbiology: What to expect in the next 15 years? *Microbial Biotechnology*, 15(1), 110-128. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13953>
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., ... Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256. <https://doi.org/10.1038/36786>
- Kutscha, R., & Pflügl, S. (2020). Microbial upgrading of acetate into value-added products—examining microbial diversity, bioenergetic constraints and metabolic engineering approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228777>
- Lane, J. R., Tata, M., Yasmin, R., Im, H., Briles, D. E., & Orihuela, C. J. (2023). PspA-mediated aggregation protects *Streptococcus pneumoniae* against desiccation on fomites. *mBio*, e0263423. <https://doi.org/10.1128/mbio.02634-23>
- Larkin, R. P. (2020). Biological control of soilborne diseases in organic potato production using hypovirulent strains of *Rhizoctonia solani*. *Biological Agriculture & Horticulture*, 36(2), 119-129. <https://doi.org/10.1080/01448765.2019.1706636>
- Larsson, J. T., Rogstam, A., & Von Wachenfeldt, C. (2005). Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 151(10), 3323-3335. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28124-0>
- Laskowska, E., & Kuczyńska-Wiśnik, D. (2020). New insight into the mechanisms protecting bacteria during desiccation. *Current Genetics*, 66(2), 313-318. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01036-z>
- LeBlanc, J. C., Gonçalves, E. R., & Mohn, W. W. (2008). Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2627-2636. <https://doi.org/10.1128/AEM.02711-07>
- Lebre, P. H., De Maayer, P., & Cowan, D. A. (2017). Xerotolerant bacteria: Surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 285-296. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.16>

IX. REFERENCIAS

- Leibig, M., Liebeke, M., Mader, D., Lalk, M., Peschel, A., & Götz, F. (2011). Pyruvate formate lyase acts as a formate supplier for metabolic processes during anaerobiosis in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 193(4), 952-962. <https://doi.org/10.1128/JB.01161-10>
- León-Sobrino, C., Ramond, J., Coclet, C., Kapitango, R., Maggs-Kölling, G., & Cowan, D. A. (2021). Temporal dynamics of microbial transcription in wetted hyperarid desert soils. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2021.05.12.443739>
- Li, D.-B., Cheng, Y.-Y., Wu, C., Li, W.-W., Li, N., Yang, Z.-C., Tong, Z.-H., & Yu, H.-Q. (2014). Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm. *Scientific Reports*, 4(1), 3735. <https://doi.org/10.1038/srep03735>
- Li, H., Bhaskara, A., Megalis, C., & Tortorello, M. L. (2012). Transcriptomic analysis of *Salmonella* desiccation resistance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(12), 1143-1151. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1254>
- Liu, F., Li, N., & Zhang, Y. (2023). The radioresistant and survival mechanisms of *Deinococcus radiodurans*. *Radiation Medicine and Protection*, 4(2), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.radmp.2023.03.001>
- Liu, F., Li, Y., He, W., Wang, W., Zheng, J., & Zhang, D. (2021). *Exiguobacterium* algae sp. nov. and *Exiguobacterium qingdaonense* sp. nov., two novel moderately halotolerant bacteria isolated from the coastal algae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(9), 1399-1406. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01594-8>
- Liu, S., & Wang, Y. (2010). Application of AFM in microbiology: A review. *Scanning*, 32(2), 61-73. <https://doi.org/10.1002/sca.20173>
- Lo Giudice, A., & Rizzo, C. (2022). Bacteria Associated with Benthic Invertebrates from Extreme Marine Environments: Promising but Underexplored Sources of Biotechnologically Relevant Molecules. *Marine Drugs*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/md20100617>
- López-Cortés, A., Schumann, P., Pukall, R., & Stackebrandt, E. (2006). *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov., isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(3), 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.007>
- López-Lara, L. I., Pazos-Rojas, L. A., López-Cruz, L. E., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., De La Torre, J., Van Dillewijn, P., Muñoz-Rojas, J., & Baez, A. (2020). Influence of rehydration on transcriptome during resuscitation of desiccated *Pseudomonas putida* KT2440. *Annals of Microbiology*, 70(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01596-3>
- Lopez-Rubio, A., Gavara, R., & Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: Turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 567-575. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.012>
- Luna, M., Colchero, J., Gil, A., Gómez-Herrero, J., & Baró, A. M. (2000). Application of non-contact scanning force microscopy to the study of water adsorption on graphite, gold and mica. *Applied Surface Science*, 157(4), 393-397. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(99\)00556-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(99)00556-5)

- Lv, J., Zhang, Y., Ma, M., Oh, D.-H., & Fu, X. (2022). Characterization of chitinase from *Exiguobacterium antarcticum* and its bioconversion of crayfish shell into chitin oligosaccharides. *Food Research International*, 158, 111517. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111517>
- Maestre, F. T., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T. C., Eldridge, D. J., ... Singh, B. K. (2015). Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(51), 15684-15689. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516684112>
- Magnuson, E., Mykytczuk, N. C. S., Pellerin, A., Goordial, J., Twine, S. M., Wing, B., Foote, S. J., Fulton, K., & Whyte, L. G. (2021). *Thiomicrothabodus* streamers and sulfur cycling in perennial hypersaline cold springs in the Canadian high Arctic. *Environmental Microbiology*, 23(7), 3384-3400. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14916>
- Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B., & Cowan, D. A. (2015). Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 203-221. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu011>
- Maleke, M., Valverde, A., Vermeulen, J.-G., Cason, E., Gomez-Arias, A., Moloantoa, K., Coetsee-Hugo, L., Swart, H., van Heerden, E., & Castillo, J. (2019). Biomineralization and bioaccumulation of europium by a thermophilic metal resistant bacterium. *Frontiers in Microbiology*, 10, 81. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00081>
- Mandal, R. K., & Kwon, Y. M. (2017). Global screening of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes for desiccation survival. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1723. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01723>
- Manzanera, M. (2021). Dealing with water stress and microbial preservation. *Environmental Microbiology*, 23(7), 3351-3359. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15096>
- Marfetán, J. A., Gallo, A. L., Farias, M. E., Vélez, M. L., Pescuma, M., & Ordoñez, O. F. (2023). *Exiguobacterium* sp. as a bioinoculant for plant-growth promotion and Selenium biofortification strategies in horticultural plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(5), 134. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03571-x>
- Maroof, L., Khan, I., Hassan, H., Azam, S., & Khan, W. (2022). Microbial degradation of low density polyethylene by *Exiguobacterium* sp. Strain LM-1K2 isolated from plastic dumped soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03389-z>
- Martin del Campo, M., Camacho, R. M., Mateos-Díaz, J. C., Müller-Santos, M., Córdova, J., & Rodríguez, J. A. (2015). Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea. *Extremophiles*, 19(6), 1121-1132. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0784-8>
- Martínez-García, E., Fraile, S., Algar, E., Aparicio, T., ... de Lorenzo, V. (2023). SEVA 4.0: An update of the Standard European Vector Architecture database for advanced analysis and programming of bacterial phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1558-D1567. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1059>
- Mattimore, V., & Battista, J. R. (1996). Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 633-637. <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.633-637.1996>

IX. REFERENCIAS

- McDonald, M. D., Owusu-Ansah, C., Ellenbogen, J. B., Malone, Z. D., Ricketts, M. P., Frolking, S. E., Ernakovich, J. G., Ibba, M., Bagby, S. C., & Weissman, J. L. (2023). What is microbial dormancy? *Trends in Microbiology*, 32(2):142-150. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.08.006>
- Meknaci, R., Lopes, P., Servy, C., Le Caer, J.-P., Andrieu, J.-P., Hacène, H., & Ouazzani, J. (2014). Agar-supported cultivation of *Halorubrum* sp. SSR, and production of halocin C8 on the scale-up prototype Platotex. *Extremophiles*, 18(6), 1049-1055. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0682-5>
- Meng, X., Chang, Y.-Q., Zhou, L.-Y., & Du, Z.-J. (2020). *Exiguobacterium flavidum* sp. Nov., isolated from the Red Maple Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2359-2365. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004048>
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162(1), 328-334. <https://doi.org/10.1128/jb.162.1.328-334.1985>
- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology*, 10: 780 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Milojevic, T., & Weckwerth, W. (2020). Molecular mechanisms of microbial survivability in outer space: A systems biology approach. *Frontiers in Microbiology*, 11, 923. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00923>
- Mohan Kulshreshtha, N., Kumar, R., Begum, Z., Shivaji, S., & Kumar, A. (2013). *Exiguobacterium alkaliphilum* sp. nov. Isolated from alkaline wastewater drained sludge of a beverage factory. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 12), 4374-4379. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.039123-0>
- Mohedano, M. L., García-Cayuela, T., Pérez-Ramos, A., Gaiser, R. A., Requena, T., & López, P. (2015). Construction and validation of a mCherry protein vector for promoter analysis in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(2), 247-253. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1567-4>
- Molina-Menor, E., Carlotto, N., Vidal-Verdú, À., Pérez-Ferriols, A., Pérez-Pastor, G., & Porcar, M. (2023). Ecology and resistance to UV light and antibiotics of microbial communities on UV cabins in the dermatology service of a Spanish hospital. *Scientific Reports*, 13(1), 14547. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40996-8>
- Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S.-H., Hassett, D. J., & Sauer, K. (2006). BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7335-7343. <https://doi.org/10.1128/JB.00599-06>
- Narváez-Reinaldo, J. J., Barba, I., González-López, J., Tunnacliffe, A., & Manzanera, M. (2010). Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5254-5262. <https://doi.org/10.1128/AEM.00855-10>
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., ... Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas*

- putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799-808. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548-572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Nithya, K., Muthukumar, C., Biswas, B., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., & Dhanasekaran, D. (2018). Desert actinobacteria as a source of bioactive compounds production with a special emphasis on pyridine-2,5-diacetamide a new pyridine alkaloid produced by *Streptomyces* sp. DA3-7. *Microbiological Research*, 207, 116-133. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.012>
- Ojeda, J. J., Merroun, M. L., Tugarova, A. V., Lampis, S., Kamnev, A. A., & Gardiner, P. H. E. (2020). Developments in the study and applications of bacterial transformations of selenium species. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1250-1264. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1811199>
- Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., Rojas, C., & Seeger, M. (2018). Living at the frontiers of life: Extremophiles in Chile and their potential for bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 9 :2309. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>
- Palud, A., Salem, K., Cavin, J.-F., Beney, L., & Licandro, H. (2020). Identification and transcriptional profile of *Lactobacillus paracasei* genes involved in the response to desiccation and rehydration. *Food Microbiology*, 85, 103301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103301>
- Pandey, N., & Bhatt, R. (2015). *Exiguobacterium* mediated arsenic removal and its protective effect against arsenic induced toxicity and oxidative damage in freshwater fish, *Channa striata*. *Toxicology Reports*, 2, 1367-1375. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.10.002>
- Park, S., Ryu, J.-Y., Seo, J., & Hur, H.-G. (2012). Isolation and characterization of alkaliphilic and thermotolerant bacteria that reduce insoluble indigo to soluble leuco-indigo from indigo dye vat. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(1), 83-88. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-0014-3>
- Patel, V. K., Srivastava, R., Sharma, A., Srivastava, A. K., Singh, S., Srivastava, A. K., Kashyap, P. L., Chakdar, H., Pandiyan, K., Kalra, A., & Saxena, A. K. (2018). Halotolerant *Exiguobacterium profundum* PHM11 tolerate salinity by accumulating L-proline and fine-tuning gene expression profiles of related metabolic pathways. *Frontiers in Microbiology*, 9, 423. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00423>
- Paul, D. (2013). Osmotic stress adaptations in rhizobacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 53(2), 101-110. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100288>
- Pazos-Rojas, L. A., Muñoz-Arenas, L. C., Rodríguez-Andrade, O., López-Cruz, L. E., López-Ortega, O., Lopes-Olivares, F., Luna-Suarez, S., Baez, A., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Villalobos-López, M. A., De La Torre, J., & Muñoz-Rojas, J. (2019). Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. *PLoS One*, 14(7), e0219554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>

IX. REFERENCIAS

- Ponder, M. A., Thomashow, M. F., & Tiedje, J. M. (2008). Metabolic activity of Siberian permafrost isolates, *Psychrobacter arcticus* and *Exiguobacterium sibiricum*, at low water activities. *Extremophiles*, 12(4), 481-490. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0151-0>
- Porcar, M., Louie, K. B., Kosina, S. M., Van Goethem, M. W., Bowen, B. P., Tanner, K., & Northen, T. R. (2018). Microbial ecology on solar panels in Berkeley, CA, United States. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3043. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03043>
- Potts, M., Slaughter, S., Hunneke, F.-U., Garst, J., & Helm, R. (2005). Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 800-809. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.800>
- Rachedi, R., Foglino, M., & Latifi, A. (2020). Stress signaling in cyanobacteria: A mechanistic overview. *Life*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/life10120312>
- Radeck, J., Meyer, D., Lautenschläger, N., & Mascher, T. (2017). Bacillus SEVA siblings: A Golden Gate-based toolbox to create personalized integrative vectors for *Bacillus subtilis*. *Scientific Reports*, 7(1), 14134. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14329-5>
- Raichand, R., Pareek, S., Singh, N. K., & Mayilraj, S. (2012). *Exiguobacterium aquaticum* sp. nov., a member of the genus *Exiguobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 9), 2150-2155. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035790-0>
- Rajeev, L., da Rocha, U. N., Klitgord, N., Luning, E. G., Fortney, J., Axen, S. D., Shih, P. M., Bouskill, N. J., Bowen, B. P., Kerfeld, C. A., Garcia-Pichel, F., Brodie, E. L., Northen, T. R., & Mukhopadhyay, A. (2013). Dynamic cyanobacterial response to hydration and dehydration in a desert biological soil crust. *The ISME Journal*, 7(11), 2178-2191. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.83>
- Rajendran, G., Patel, M. H., & Joshi, S. J. (2012). Isolation and characterization of nodule-associated *Exiguobacterium* sp. from the root nodules of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) and their possible role in plant growth promotion. *International Journal of Microbiology*, 2012, 693982. <https://doi.org/10.1155/2012/693982>
- Rampelotto, P. H. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life*, 3(3), 482-485. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Rateb, M. E., Houssen, W. E., Arnold, M., Abdelrahman, M. H., Deng, H., Harrison, W. T. A., Okoro, C. K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Ferguson, G., Bull, A. T., Goodfellow, M., Ebel, R., & Jaspars, M. (2011). Chaxamycins A-D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 74(6), 1491-1499. <https://doi.org/10.1021/np200320u>
- Rath, S., & Das, S. (2023). Oxidative stress-induced DNA damage and DNA repair mechanisms in mangrove bacteria exposed to climatic and heavy metal stressors. *Environmental Pollution*, 339, 122722. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122722>
- Rekadwad, B. N., Li, W.-J., Gonzalez, J. M., Punchappady Devasya, R., Ananthapadmanabha Bhagwath, A., Urana, R., & Parwez, K. (2023). Extremophiles: the species that evolve and survive under hostile conditions. *3 Biotech*, 13(9), 316. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03733-6>

- Resnekov, O., Driks, A., & Losick, R. (1995). Identification and characterization of sporulation gene *spoVS* from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 177(19), 5628-5635. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5628-5635.1995>
- Risso, C., Van Dien, S. J., Orloff, A., Lovley, D. R., & Coppi, M. V. (2008). Elucidation of an alternate isoleucine biosynthesis pathway in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2266-2274. <https://doi.org/10.1128/JB.01841-07>
- Rodrigues, D. F., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M. F., & Tiedje, J. M. (2006). Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 10(4), 285-294. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0497-5>
- Rodrigues, D. F., Ivanova, N., He, Z., Huebner, M., Zhou, J., & Tiedje, J. M. (2008). Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3-million-year-old permafrost: A genome and transcriptome approach. *BMC Genomics*, 9(1), 547. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-547>
- Rodriguez Ayala, F., Bartolini, M., & Grau, R. (2020). The stress-responsive alternative sigma factor SigB of *Bacillus subtilis* and its relatives: an old friend with new functions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1761. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01761>
- Rodriguez-R, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2014). Bypassing cultivation to Identify bacterial species: Culture-independent genomic approaches identify credibly distinct clusters, avoid cultivation bias, and provide true insights into microbial species. *Microbe Magazine*, 9(3), 111-118. <https://doi.org/10.1128/microbe.9.111.1>
- Rodriguez-R, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2016). The enveomics collection: A toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Preprints*, 4, e1900v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1>
- Saeed, M. U., Hussain, N., Shahbaz, A., Hameed, T., Iqbal, H. M. N., & Bilal, M. (2022). Bioprospecting microalgae and cyanobacteria for biopharmaceutical applications. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1110-1124. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100445>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. N.Y. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SantaCruz-Calvo, L., González-López, J., & Manzanera, M. (2013). *Arthrobacter siccitolerans* sp. nov., a highly desiccation-tolerant, xeroprotectant-producing strain isolated from dry soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 11), 4174-4180. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052902-0>
- Santos, S. P., Yang, Y., Rosa, M. T. G., Rodrigues, M. A. A., De La Tour, C. B., Sommer, S., Teixeira, M., Carrondo, M. A., Cloetens, P., Abreu, I. A., & Romão, C. V. (2019). The interplay between Mn and Fe in *Deinococcus radiodurans* triggers cellular protection during paraquat-induced oxidative stress. *Scientific Reports*, 9(1), 17217. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53140-2>
- Satari, L., Iglesias, A., & Porcar, M. (2023). The microbiome of things: appliances, machines, and devices hosting artificial niche-adapted microbial communities. *Microorganisms*, 11(6): 1507. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061507>
- Schäfer, A., Tauch, A., Jsger, W., Kalinowski, J., Thierbachb, G., & Piihler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of

IX. REFERENCIAS

- Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1):69-73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
- Schimo, S., Wittig, I., Pos, K. M., & Ludwig, B. (2017). Cytochrome C oxidase biogenesis and metallochaperone interactions: steps in the assembly pathway of a bacterial complex. *PloS One*, 12(1), e0170037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170037>
- Schulz, D., Beese, P., Ohlendorf, B., Erhard, A., Zinecker, H., Dorador, C., & Imhoff, J. F. (2011). Abenquines A–D: aminoquinone derivatives produced by *Streptomyces* sp. strain DB634. *The Journal of Antibiotics*, 64(12), 763-768. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.87>
- Seckbach, J., Oren, A., & Stan-Lotter, H. (Eds.). (2013). Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress (Vol. 27). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0>
- Seixas, A. F., Quendera, A. P., Sousa, J. P., Silva, A. F. Q., Arraiano, C. M., & Andrade, J. M. (2022). Bacterial response to oxidative stress and RNA oxidation. *Frontiers in Genetics*, 12:821535. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535>
- Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P. K., Kundu, S., & Gupta, H. S. (2009). *Exiguobacterium acetylicum* strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the Northwestern Indian Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 131-137. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9874-4>
- Sheng, M. M., Jia, H. K., Zhang, G. Y., Zeng, L. N., Zhang, T. T., Long, Y. H., Lan, J., Hu, Z. Q., Zeng, Z., Wang, B., & Liu, H. M. (2020). Siderophore production by rhizosphere biological control bacteria *Brevibacillus brevis* gzd3 of *Pinellia ternata* and its antifungal effects on *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 689-699. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10066>
- Shingarova, L. N., Petrovskaya, L. E., Kryukova, E. A., Gapizov, S. S., Dolgikh, D. A., & Kirpichnikov, M. P. (2023). Display of oligo- α -1,6-glycosidase from *Exiguobacterium sibiricum* on the surface of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*, 88(5), 716-722. <https://doi.org/10.1134/S0006297923050140>
- Shukla, A. K., & Singh, A. K. (2020). Exploitation of potential extremophiles for bioremediation of xenobiotics compounds: a biotechnological approach. *Current Genomics*, 21(3), 161-167. <https://doi.org/10.2174/1389202921999200422122253>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P. I., Platero, R., & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D666-D675. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Singh, N. K., Raichand, R., Kaur, I., Kaur, C., Pareek, S., & Mayilraj, S. (2013). *Exiguobacterium himgiriensis* sp. nov. A novel member of the genus *Exiguobacterium*, isolated from the Indian Himalayas. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(4), 789-796. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9861-5>

- Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021). Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: Role in antimicrobial resistance and treatments. *Genetic Engineering & Biotechnology*, 19(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00242-y>
- Song, D., Li, X., Cheng, Y., Xiao, X., Lu, Z., Wang, Y., & Wang, F. (2017). Aerobic biogenesis of selenium nanoparticles by *Enterobacter cloacae* Z0206 as a consequence of fumarate reductase mediated selenite reduction. *Scientific Reports*, 7(1), 3239. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03558-3>
- Srikumar, S., Cao, Y., Yan, Q., Van Hoorde, K., Nguyen, S., Cooney, S., Gopinath, G. R., Tall, B. D., Sivasankaran, S. K., Lehner, A., Stephan, R., & Fanning, S. (2019). RNA sequencing-based transcriptional overview of xerotolerance in *Cronobacter sakazakii* SP291. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3):e01993-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01993-18>
- Staicu, L. C., Ackerson, C. J., Cornelis, P., Ye, L., Berendsen, R. L., Hunter, W. J., Noblitt, S. D., Henry, C. S., Cappa, J. J., Monteneri, R. L., Wong, A. O., Musilova, L., Sura-de Jong, M., Van Hullebusch, E. D., Lens, P. N. L., Reynolds, R. J. B., & Pilon-Smits, E. A. H. (2015). *Pseudomonas moraviensis* subsp. *stanleyae*, a bacterial endophyte of hyperaccumulator *Stanleya pinnata*, is capable of efficient selenite reduction to elemental selenium under aerobic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 400-410. <https://doi.org/10.1111/jam.12842>
- Stevenson, A., Cray, J. A., Williams, J. P., Santos, R., ... Hallsworth, J. E. (2015). Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *The ISME Journal*, 9(6), 1333-1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.219>
- Stirk, W. A., & van Staden, J. (2022). Bioprospecting for bioactive compounds in microalgae: Antimicrobial compounds. *Biotechnology Advances*, 59, 107977. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107977>
- Su, H.-N., Chen, Z.-H., Song, X.-Y., Chen, X.-L., Shi, M., Zhou, B.-C., Zhao, X., & Zhang, Y.-Z. (2012). Antimicrobial Peptide Trichokonin VI-Induced Alterations in the Morphological and Nanomechanical Properties of *Bacillus subtilis*. *PLOS ONE*, 7(9), e45818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045818>
- Sun, Y., Zhang, Y., Hao, X., Zhang, X., Ma, Y., & Niu, Z. (2023). A novel marine bacterium *Exiguobacterium marinum* a-1 isolated from *in situ* plastisphere for degradation of additive-free polypropylene. *Environmental Pollution*, 336, 122390. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122390>
- Suntharalingam, P., Senadheera, M. D., Mair, R. W., Lévesque, C. M., & Cvitkovitch, D. G. (2009). The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus* mutants. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 2973-2984. <https://doi.org/10.1128/JB.01563-08>
- Suzina, N. E., Mulyukin, A. L., Dmitriev, V. V., Nikolaev, Y. A., Shorokhova, A. P., Bobkova, Y. S., Barinova, E. S., Plakunov, V. K., El-Registan, G. I., & Duda, V. I. (2006). The structural bases of long-term anabiosis in non-spore-forming bacteria. *Space life sciences*, 38(6), 1209-1219. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2005.09.020>
- Suzina, N. E., Sorokin, V. V., Polivtseva, V. N., Klyueva, V. V., Emelyanova, E. V., & Solyanikova, I. P. (2022). From rest to growth: life collisions of *Gordonia polyisoprenivorans* 135. *Microorganisms*, 10(2): 465. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020465>

IX. REFERENCIAS

- Tabibi, M., Aghaei, S., Amoozegar, M. A., Nazari, R., & Zolfaghari, M. R. (2023). Characterization of green synthesized selenium nanoparticles (SeNPs) in two different indigenous halophilic bacteria. *BMC Chemistry*, 17(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s13065-023-01034-w>
- Tanner, K., Martí, J. M., Belliure, J., Fernández-Méndez, M., Molina-Menor, E., Peretó, J., & Porcar, M. (2018). Polar solar panels: Arctic and Antarctic microbiomes display similar taxonomic profiles. *Environmental Microbiology Reports*, 10(1), 75-79. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12608>
- Tanner, K., Martorell, P., Genovés, S., Ramón, D., Zacarías, L., Rodrigo, M. J., Peretó, J., & Porcar, M. (2019). Bioprospecting the solar panel microbiome: high-throughput screening for antioxidant bacteria in a *Caenorhabditis elegans* Model. *Frontiers in Microbiology*, 10, 986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00986>
- Thombre, R. S., Vaishampayan, P. A., & Gomez, F. (2020). Chapter 7—Applications of extremophiles in astrobiology. En R. Salwan & V. Sharma (Eds.), *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 89-104). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00007-1>
- Thurotte, A., Brüser, T., Mascher, T., & Schneider, D. (2017). Membrane chaperoning by members of the PspA/IM30 protein family. *Communicative & Integrative Biology*, 10(1), e1264546. <https://doi.org/10.1080/19420889.2016.1264546>
- Tian, Y., Kong, B. H., Liu, S. L., Li, C. L., Yu, R., Liu, L., & Li, Y. H. (2013). *Burkholderia grimmiae* sp. nov., isolated from a xerophilous moss (*Grimmia montana*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 6), 2108-2113. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045492-0>
- Torrents, E. (2014). Ribonucleotide reductases: Essential enzymes for bacterial life. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4: 52. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2014.00052>
- Troitzsch, D., Zhang, H., Dittmann, S., Düsterhöft, D., Möller, T. A., Michel, A.-M., Jänsch, L., Riedel, K., Borrero-de Acuña, J. M., Jahn, D., & Sievers, S. (2021). A point mutation in the transcriptional repressor PerR results in a constitutive oxidative stress response in *Clostridioides difficile* 630Δerm. *mSphere*, 6(2): e00091-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00091-21>
- Turner, R. D., Ratcliffe, E. C., Wheeler, R., Golestanian, R., Hobbs, J. K., & Foster, S. J. (2010). Peptidoglycan architecture can specify division planes in *Staphylococcus aureus*. *Nature Communications*, 1(1), 26. <https://doi.org/10.1038/ncomms1025>
- Ul Hussain Shah, A. M., Zhao, Y., Wang, Y., Yan, G., Zhang, Q., Wang, L., Tian, B., Chen, H., & Hua, Y. (2014). A Mur regulator protein in the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans*. *PloS One*, 9(9), e106341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106341>
- Vahdati, M., & Tohidi Moghadam, T. (2020). Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles-Lysozyme Nanohybrid System with Synergistic Antibacterial Properties. *Scientific Reports*, 10(1), 510. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57333-7>
- Valderrama, J. A., Durante-Rodríguez, G., Blázquez, B., García, J. L., Carmona, M., & Díaz, E. (2012). Bacterial degradation of benzoate: Cross-regulation between aerobic and

- anaerobic pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10494-10508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309005>
- Vanderlinde, E. M., Muszyński, A., Harrison, J. J., Koval, S. F., Foreman, D. L., Ceri, H., Kannenberg, E. L., Carlson, R. W., & Yost, C. K. (2009). *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility. *Microbiology*, 155(Pt 9), 3055-3069. <https://doi.org/10.1099/mic.0.025031-0>
- Varrella, S., Tangherlini, M., & Corinaldesi, C. (2020). Deep Hypersaline Anoxic Basins as Untapped Reservoir of Polyextremophilic Prokaryotes of Biotechnological Interest. *Marine Drugs*, 18(2) :91. <https://doi.org/10.3390/md18020091>
- Veeravalli, K., Schindler, T., Dong, E., Yamada, M., Hamilton, R., & Laird, M. W. (2018). Strain engineering to reduce acetate accumulation during microaerobic growth conditions in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 34(2), 303-314. <https://doi.org/10.1002/btpr.2592>
- Vijayalaxmi, S., Anu Appaiah, K. A., Jayalakshmi, S. K., Mulimani, V. H., & Sreeramulu, K. (2013). Production of bioethanol from fermented sugars of sugarcane bagasse produced by lignocellulolytic enzymes of *Exiguobacterium* sp. VSG-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(1), 246-260. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0366-0>
- Vílchez, J. I., Niehaus, K., Dowling, D. N., González-López, J., & Manzanera, M. (2018). Protection of pepper plants from drought by *Microbacterium* sp. 3J1 by modulation of the plant's glutamine and α -ketoglutarate Content: a comparative metabolomics approach. *Frontiers in Microbiology*, 9: 284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00284>
- Vishnivetskaya, T. A., Chauhan, A., Layton, A. C., Piffner, S. M., ... ,Woyke, T. (2014). Draft genome sequences of 10 strains of the genus *Exiguobacterium*. *Genome Announcements*, 2(5), e01058-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01058-14>
- Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., & Tiedje, J. M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: Biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13(3), 541-555. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0243-5>
- Vishnivetskaya, T. A., Petrova, M. A., Urbance, J., Ponder, M., Moyer, C. L., Gilichinsky, D. A., & Tiedje, J. M. (2006). Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods. *Astrobiology*, 6(3), 400-414. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.6.400>
- Vlašić, I., Mertens, R., Seco, E. M., Carrasco, B., Ayora, S., Reitz, G., Commichau, F. M., Alonso, J. C., & Moeller, R. (2014). *Bacillus subtilis* RecA and its accessory factors, RecF, RecO, RecR and RecX, are required for spore resistance to DNA double-strand break. *Nucleic Acids Research*, 42(4), 2295-2307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1194>
- Vojcic, L., Despotovic, D., Martinez, R., Maurer, K.-H., & Schwaneberg, U. (2012). An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 487-493. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3987-2>
- Vriezen, J. A. C., Bruijn, F. J. de, & Nüsslein, K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3451-3459. <https://doi.org/10.1128/AEM.02991-06>

IX. REFERENCIAS

- Vriezen, J. A., de Bruijn, F. J., & Nüsslein, K. R. (2012). Desiccation induces viable but non-culturable cells in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *AMB Express*, 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-6>
- Wang, D., Xia, X., Wu, S., Zheng, S., & Wang, G. (2019). The essentialness of glutathione reductase GorA for biosynthesis of Se(0)-nanoparticles and GSH for CdSe quantum dot formation in *Pseudomonas stutzeri* TS44. *Journal of Hazardous Materials*, 366, 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.092>
- Wang, F., Wang, P., Chen, M., & Xiao, X. (2004). Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strain in deep-sea sediments from the west Pacific. *Extremophiles*, 8, 165-168. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0365-0>
- Wang, H., An, J., Fan, C., Zhai, Z., Zhang, H., & Hao, Y. (2022). Transcriptome analysis revealed growth phase-associated changes of a centenarian-originated probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis A6. *BMC Microbiology*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02474-5>
- Wang, Q., Sha, C., Wang, H., Ma, K., Wiegler, J., Abomohra, A. E.-F., & Shao, W. (2021). A novel bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase catalyzing reduction of acetyl-CoA to ethanol at temperatures up to 95 °C. *Scientific Reports*, 11(1), 1050. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80159-7>
- Wang, Y., Le, L. T. H. L., Yoo, W., Lee, C. W., Kim, K. K., Lee, J. H., & Kim, T. D. (2019). Characterization, immobilization, and mutagenesis of a novel cold-active acetyltransferase (EaAcE) from *Exiguobacterium antarcticum* B7. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1042-1051. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.108>
- Weisenhorn, A. L., Hansma, P. K., Albrecht, T. R., & Quate, C. F. (1989). Forces in atomic force microscopy in air and water. *Applied Physics Letters*, 54(26), 2651-2653. <https://doi.org/10.1063/1.101024>
- Weiss, T. L., Young, E. J., & Ducat, D. C. (2017). A synthetic, light-driven consortium of cyanobacteria and heterotrophic bacteria enables stable polyhydroxybutyrate production. *Metabolic Engineering*, 44, 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.10.009>
- White, A. P., Gibson, D. L., Kim, W., Kay, W. W., & Surette, M. G. (2006). Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3219-3227. <https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3219-3227.2006>
- White, R. A. 3rd, Grassa, C. J., & Suttle, C. A. (2013). Draft genome sequence of *Exiguobacterium pavilionensis* strain RW-2, with wide thermal, salinity, and pH tolerance, isolated from modern freshwater microbialites. *Genome Announcements*, 1(4): e00597-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00597-13>
- White, R. A. 3rd, Soles, S. A., Gavelis, G., Gosselin, E., Slater, G. F., Lim, D. S. S., Leander, B., & Suttle, C. A. (2019). The complete genome and physiological analysis of the eurythermal firmicute *Exiguobacterium chiriquicha* strain rw2 isolated from a freshwater microbialite, widely adaptable to broad thermal, ph, and salinity ranges. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3189. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03189>
- Wichner, D., Idris, H., Houssen, W. E., McEwan, A. R., Bull, A. T., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., Jaspars, M., Ebel, R., & Rateb, M. E. (2017). Isolation and anti-HIV-1 integrase activity

- of lentzeosides A-F from extremotolerant *Lentzea* sp. H45, a strain isolated from a high-altitude Atacama Desert soil. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 448-453. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.78>
- Willenbacher, J., Mohr, T., Henkel, M., Gebhard, S., Mascher, T., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2016). Substitution of the native *srfA* promoter by constitutive *Pveg* in two *B. subtilis* strains and evaluation of the effect on Surfactin production. *Journal of Biotechnology*, 224, 14-17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.002>
- Williams, S. J., Senaratne, R. H., Mougous, J. D., Riley, L. W., & Bertozzi, C. R. (2002). 5'-Adenosinephosphosulfate lies at a metabolic branch point in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 32606-32615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204613200>
- Wright, O., Delmans, M., Stan, G.-B., & Ellis, T. (2015). GeneGuard: a modular plasmid system designed for biosafety. *ACS Synthetic Biology*, 4(3), 307-316. <https://doi.org/10.1021/sb500234s>
- Wu, B., Zhang, B., Feng, X., Rubens, J. R., Huang, R., Hicks, L. M., Pakrasi, H. B., & Tang, Y. J. (2010). Alternative isoleucine synthesis pathway in cyanobacterial species. *Microbiology*, 156(2), 596-602. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031799-0>
- Xia, I. F., Kong, H.-K., Wu, M. M. H., Lu, Y., Wong, K.-H., & Kwok, K. W. H. (2022). Selenium Nanoparticles (SeNPs) Immunomodulation Is More Than Redox Improvement: Serum Proteomics and Transcriptomic Analyses. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/antiox11050964>
- Xu, H., Zhang, Y., Guo, X., Ren, S., Staempfli, A. A., Chiao, J., Jiang, W., & Zhao, G. (2004). Isoleucine biosynthesis in *Leptospira interrogans* serotype lai strain 56601 proceeds via a threonine-independent pathway. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5400-5409. <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5400-5409.2004>
- Xue, D., Liu, W., Chen, Y., Liu, Y., Han, J., Geng, X., Li, J., Jiang, S., Zhou, Z., Zhang, W., Chen, M., Lin, M., Ongena, M., & Wang, J. (2019). RNA-Seq-Based Comparative transcriptome analysis highlights new features of the heat-stress response in the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5603. <https://doi.org/10.3390/ijms20225603>
- Yan, Z., Maruyama, A., Arakawa, T., Fushinobu, S., & Wakagi, T. (2016). Crystal structures of archaeal 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Sulfolobus tokodaii*. *Scientific Reports*, 6(1), 33061. <https://doi.org/10.1038/srep33061>
- Yarberry, A., Lansing, S., Luckarift, H., Diltz, R., Mulbry, W., & Yarwood, S. (2019). Effect of anaerobic digester inoculum preservation via lyophilization on methane recovery. *Waste Management*, 87, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.01.033>
- Yasir, M., Zhang, Y., Xu, Z., Luo, M., & Wang, G. (2020). NAD(P)H-dependent thioredoxin-disulfide reductase TrxR is essential for tellurite and selenite reduction and resistance in *Bacillus* sp. Y3. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9), fiae126. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae126>
- Yumoto, I., Hishinuma-Narisawa, M., Hirota, K., Shingyo, T., Takebe, F., Nodasaka, Y., Matsuyama, H., & Hara, I. (2004). *Exiguobacterium oxidotolerans* sp. Nov., a novel alkaliphile exhibiting high catalase activity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2013-2017. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63129-0>

IX. REFERENCIAS

- Zannier, F., Portero, L. R., Douki, T., Gärtner, W., Farías, M. E., & Albarracín, V. H. (2022). Proteomic signatures of microbial adaptation to the highest ultraviolet-irradiation on earth: lessons from a soil actinobacterium. *Frontiers in Microbiology*, *13*: 791714. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.791714>
- Zeytuni, N., Flanagan, K. A., Worrall, L. J., Massoni, S. C., Camp, A. H., & Strynadka, N. C. J. (2018). Structural characterization of SpoIIIAB sporulation-essential protein in *Bacillus subtilis*. *Journal of Structural Biology*, *202*(2), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.12.009>
- Zeytuni, N., Flanagan, K. A., Worrall, L. J., Massoni, S. C., Camp, A. H., & Strynadka, N. C. J. (2018). Structural characterization of SpoIIIAB sporulation-essential protein in *Bacillus subtilis*. *Journal of Structural Biology*, *202*(2), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.12.009>
- Zgonik, V., Mulec, J., Eleršek, T., Ogrinc, N., Jamnik, P., & Ulrih, N. P. (2021). Extremophilic microorganisms in central Europe. *Microorganisms*, *9*(11): 2326. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112326>
- Zhang, D., Zhu, Z., Li, Y., Li, X., Guan, Z., & Zheng, J. (2021). Comparative Genomics of *Exiguobacterium* reveals what makes a cosmopolitan bacterium. *mSystems*, *6*(4), e00383-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00383-21>
- Zhang, H., Li, Z., Dai, C., Wang, P., Fan, S., Yu, B., & Qu, Y. (2021). Antibacterial properties and mechanism of selenium nanoparticles synthesized by *Providencia* sp. DCX. *Environmental Research*, *194*, 110630. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110630>
- Zhang, Z., Ding, Z.-T., Shu, D., Luo, D., & Tan, H. (2015). Development of an efficient electroporation method for iturin A-producing *Bacillus subtilis* ZK. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(4), 7334-7351. <https://doi.org/10.3390/ijms16047334>
- Zhao, W., You, J., Yin, S., Yang, H., He, S., Feng, L., Li, J., Zhao, Q., & Wei, L. (2023). Extracellular polymeric substances-antibiotics interaction in activated sludge: A review. *Environmental Science and Ecotechnology*, *13*, 100212. <https://doi.org/10.1016/j.esec.2022.100212>
- Zheng, C., He, J., Wang, Y., Wang, M., & Huang, Z. (2011). Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains. *Bioresource Technology*, *102*(19), 9155-9161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.074>
- Zheng, S., Su, J., Wang, L., Yao, R., Wang, D., Deng, Y., Wang, R., Wang, G., & Rensing, C. (2014). Selenite reduction by the obligate aerobic bacterium *Comamonas testosteroni* S44 isolated from a metal-contaminated soil. *BMC Microbiology*, *14*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0204-8>
- Zhou, Z., Zhu, L., Dong, Y., You, L., Zheng, S., Wang, G., & Xia, X. (2022). Identification of a novel chromate and selenite reductase FesR in *Alishewanella* sp. WH16-1. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 834293. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.834293>
- Zhu, S., & Gao, B. (2020). Bacterial flagella loss under starvation. *Trends in Microbiology*, *28*(10), 785-788. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.002>
- Zhuang, X.-Y., & Lo, C.-J. (2020). Construction and loss of bacterial flagellar filaments. *Biomolecules*, *10*(11):1528. <https://doi.org/10.3390/biom10111528>

X. Anexos

Anexo 1 Genes de *Exiguobacterium* sp. Helios que no están presentes en *E. sibiricum*

Locus	Descripción
HNY42_RS00240	phosphotransferase
HNY42_RS01115	hypothetical protein
HNY42_RS01120	hypothetical protein
HNY42_RS01125	VOC family protein
HNY42_RS01140	DUF4230 domain-containing protein
HNY42_RS01145	hypothetical protein
HNY42_RS02265	phosphotransferase
HNY42_RS02920	hypothetical protein
HNY42_RS02930	copper resistance protein CopC
HNY42_RS03025	DUF4352 domain-containing protein
HNY42_RS03030	hypothetical protein
HNY42_RS03035	hypothetical protein
HNY42_RS03040	hypothetical protein
HNY42_RS03045	dynamamin family protein
HNY42_RS03065	DEAD/DEAH box helicase family protein
HNY42_RS03070	TIR domain-containing protein
HNY42_RS03080	DUF3006 family protein
HNY42_RS03090	DUF262 domain-containing protein
HNY42_RS03095	hypothetical protein
HNY42_RS03100	hypothetical protein
HNY42_RS03115	extracellular solute-binding protein
HNY42_RS03155	excalibur calcium-binding domain-containing protein
HNY42_RS03175	class I SAM-dependent methyltransferase
HNY42_RS03970	IS3 family transposase
HNY42_RS06980	hypothetical protein
HNY42_RS07210	helix-turn-helix domain-containing protein
HNY42_RS07235	hypothetical protein
HNY42_RS07240	MepB family protein
HNY42_RS07245	RNA polymerase sigma-70 factor
HNY42_RS07255	MarR family transcriptional regulator
HNY42_RS07260	NtaA/DmoA family FMN-dependent monooxygenase
HNY42_RS07270	NAD(P)-binding domain-containing protein
HNY42_RS07465	antibiotic biosynthesis monooxygenase
HNY42_RS07490	hypothetical protein
HNY42_RS07495	hypothetical protein
HNY42_RS07505	hypothetical protein
HNY42_RS07510	Petrobactin biosynthesis protein AsbE
HNY42_RS07515	TIM barrel protein
HNY42_RS07545	hypothetical protein
HNY42_RS07680	spore coat protein
HNY42_RS07685	spore coat protein
HNY42_RS07695	DUF2817 domain-containing protein
HNY42_RS07740	hypothetical protein
HNY42_RS07820	GNAT family N-acetyltransferase
HNY42_RS07825	SMI1/KNR4 family protein
HNY42_RS07830	hypothetical protein
HNY42_RS07845	hypothetical protein
HNY42_RS07950	hypothetical protein
HNY42_RS07975	PTS sugar transporter subunit IIB

X. ANEXOS

Locus	Descripción
<i>HNY42_RS07980</i>	PTS lactose/cellobiose transporter subunit IIA
<i>HNY42_RS07985</i>	PTS cellobiose transporter subunit IIC
<i>HNY42_RS08000</i>	DUF624 domain-containing protein
<i>HNY42_RS08010</i>	sugar ABC transporter substrate-binding protein
<i>HNY42_RS08025</i>	family 43 glycosylhydrolase
<i>HNY42_RS08035</i>	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase
<i>HNY42_RS08040</i>	L-arabinose isomerase
<i>HNY42_RS08045</i>	alpha-N-arabinofuranosidase
<i>HNY42_RS08055</i>	iron-containing alcohol dehydrogenase
<i>HNY42_RS08060</i>	family 43 glycosylhydrolase
<i>HNY42_RS08065</i>	family 43 glycosylhydrolase
<i>HNY42_RS08070</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS08080</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS08120</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS08165</i>	helix-turn-helix domain-containing protein
<i>HNY42_RS08190</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS08200</i>	barstar family protein
<i>HNY42_RS08215</i>	cupin
<i>HNY42_RS08230</i>	WYL domain-containing protein
<i>HNY42_RS08300</i>	DUF4304 domain-containing protein
<i>HNY42_RS08305</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS08410</i>	class I SAM-dependent methyltransferase
<i>HNY42_RS08415</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS08440</i>	acetoacetate decarboxylase family protein
<i>HNY42_RS08715</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS08720</i>	GNAT family N-acetyltransferase
<i>HNY42_RS08735</i>	DUF1048 domain-containing protein
<i>HNY42_RS08740</i>	helix-turn-helix transcriptional regulator
<i>HNY42_RS08745</i>	CPBP family intramembrane metalloprotease
<i>HNY42_RS08810</i>	chitin disaccharide deacetylase
<i>HNY42_RS08820</i>	6-phospho-beta-glucosidase
<i>HNY42_RS08825</i>	PTS transporter subunit EIIC
<i>HNY42_RS08830</i>	PTS lactose/cellobiose transporter subunit IIA
<i>HNY42_RS08835</i>	PTS sugar transporter subunit IIB
<i>HNY42_RS09120</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS09125</i>	ABC transporter permease subunit
<i>HNY42_RS09185</i>	MarR family transcriptional regulator
<i>HNY42_RS09190</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS09230</i>	DUF3169 family protein
<i>HNY42_RS09275</i>	ABC transporter permease
<i>HNY42_RS09280</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS09305</i>	IS3 family transposase
<i>HNY42_RS09340</i>	MarR family transcriptional regulator
<i>HNY42_RS09450</i>	phosphotransferase
<i>HNY42_RS09455</i>	phosphotransferase
<i>HNY42_RS09530</i>	group-specific protein
<i>HNY42_RS09570</i>	serine hydrolase
<i>HNY42_RS12045</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS13520</i>	DUF2785 domain-containing protein
<i>HNY42_RS13615</i>	AAA family ATPase
<i>HNY42_RS13700</i>	TIR domain-containing protein
<i>HNY42_RS13705</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS13710</i>	hypothetical protein

Locus	Descripción
<i>HNY42_RS13720</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS13725</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS14690</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS14745</i>	DUF4163 domain-containing protein
<i>HNY42_RS14755</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS14785</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS14790</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS14795</i>	DUF3267 domain-containing protein
<i>HNY42_RS14800</i>	oligosaccharide repeat unit polymerase
<i>HNY42_RS14810</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS14815</i>	glycosyltransferase family 4 protein
<i>HNY42_RS14830</i>	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein
<i>HNY42_RS15485</i>	alpha/beta fold hydrolase
<i>HNY42_RS15490</i>	TetR family transcriptional regulator
<i>HNY42_RS15510</i>	hypothetical protein
<i>HNY42_RS15515</i>	AAA family ATPase
<i>HNY42_RS15540</i>	DUF2089 family protein
<i>HNY42_RS15545</i>	hypothetical protein

Anexo 2. Genes de *E. sibiricum* que no están presentes en *Exiguobacterium* sp. Helios

Locus	Descripción
<i>EXIG_RS00960</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS00985</i>	CRISPR-associated helicase/endonuclease Cas3
<i>EXIG_RS00990</i>	type I-C CRISPR-associated protein Cas5
<i>EXIG_RS00995</i>	type I-C CRISPR-associated protein Cas8c/Csd1
<i>EXIG_RS01000</i>	type I-C CRISPR-associated protein Cas7/Csd2
<i>EXIG_RS01005</i>	CRISPR-associated protein Cas4
<i>EXIG_RS01010</i>	type I-C CRISPR-associated endonuclease Cas1
<i>EXIG_RS01015</i>	CRISPR-associated endonuclease Cas2
<i>EXIG_RS01470</i>	IS1182 family transposase
<i>EXIG_RS01520</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS01685</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS01695</i>	GHKL domain-containing protein
<i>EXIG_RS01795</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS01800</i>	DUF1819 family protein
<i>EXIG_RS01805</i>	DUF1788 domain-containing protein
<i>EXIG_RS01810</i>	BREX system P-loop protein BrxC
<i>EXIG_RS01815</i>	BREX-1 system adenine-specific DNA-methyltransferase PglX
<i>EXIG_RS01820</i>	BREX-1 system phosphatase PglZ type A
<i>EXIG_RS01825</i>	protease Lon-related BREX system protein BrxL
<i>EXIG_RS01830</i>	AAA family ATPase
<i>EXIG_RS01835</i>	HNH endonuclease
<i>EXIG_RS01875</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS01940</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS02790</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS04040</i>	IS200/IS605 family transposase
<i>EXIG_RS04535</i>	ferrous iron transport protein A
<i>EXIG_RS04540</i>	ferrous iron transport protein B
<i>EXIG_RS04545</i>	FeoB-associated Cys-rich membrane protein
<i>EXIG_RS05245</i>	IS30 family transposase

X. ANEXOS

Locus	Descripción
<i>EXIG_RS05930</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS05965</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS05970</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
<i>EXIG_RS06015</i>	nucleotidyltransferase domain-containing protein
<i>EXIG_RS06020</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06130</i>	IS200/IS605 family transposase
<i>EXIG_RS06135</i>	transposase
<i>EXIG_RS06225</i>	IS1182 family transposase
<i>EXIG_RS06595</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06600</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06605</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06610</i>	ABC transporter permease
<i>EXIG_RS06630</i>	DMT family transporter
<i>EXIG_RS06635</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06700</i>	geobacillin-26 family protein
<i>EXIG_RS06705</i>	transposase
<i>EXIG_RS06745</i>	suppressor of fused domain protein
<i>EXIG_RS06865</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06895</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06900</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06905</i>	LysE family transporter
<i>EXIG_RS06915</i>	AraC family transcriptional regulator
<i>EXIG_RS06930</i>	dihydrodipicolinate synthase family protein
<i>EXIG_RS06970</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS06980</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS07035</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS07085</i>	NAD(P)H-dependent oxidoreductase
<i>EXIG_RS07090</i>	MarR family transcriptional regulator
<i>EXIG_RS07230</i>	HNH endonuclease
<i>EXIG_RS07240</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS07310</i>	peptidase E
<i>EXIG_RS07320</i>	NUDIX domain-containing protein
<i>EXIG_RS07325</i>	Fic family protein
<i>EXIG_RS07375</i>	bacteriorhodopsin
<i>EXIG_RS07410</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS07510</i>	YnfA family protein
<i>EXIG_RS07715</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS07775</i>	IS1182 family transposase
<i>EXIG_RS07800</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS07920</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS08065</i>	alkaline shock response membrane anchor protein AmaP
<i>EXIG_RS08070</i>	DUF2273 domain-containing protein
<i>EXIG_RS08075</i>	Asp23/Gls24 family envelope stress response protein
<i>EXIG_RS08435</i>	IS200/IS605 family transposase
<i>EXIG_RS10535</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS10545</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS11140</i>	ABC transporter permease
<i>EXIG_RS11355</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS11865</i>	IS1182 family transposase
<i>EXIG_RS12100</i>	site-specific DNA-methyltransferase
<i>EXIG_RS12105</i>	helix-turn-helix transcriptional regulator
<i>EXIG_RS12110</i>	restriction endonuclease BglII
<i>EXIG_RS12115</i>	AIPR family protein

Locus	Descripción
<i>EXIG_RS12750</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS12755</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13215</i>	ImmA/IrrE family metallo-endopeptidase
<i>EXIG_RS13220</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13230</i>	hexose-6-phosphate:phosphate antiporter
<i>EXIG_RS13235</i>	extracellular solute-binding protein
<i>EXIG_RS13240</i>	DUF3919 family protein
<i>EXIG_RS13255</i>	DUF5011 domain-containing protein
<i>EXIG_RS13270</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13275</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13280</i>	zinc ribbon domain-containing protein
<i>EXIG_RS13285</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13290</i>	zinc ribbon domain-containing protein
<i>EXIG_RS13295</i>	zinc ribbon domain-containing protein
<i>EXIG_RS13305</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13330</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13345</i>	oligosaccharide flippase family protein
<i>EXIG_RS13350</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS13450</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS13715</i>	ATP-binding protein
<i>EXIG_RS13985</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS14010</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS14020</i>	HEAT repeat domain-containing protein
<i>EXIG_RS14030</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS14900</i>	FAD:protein FMN transferase
<i>EXIG_RS14905</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS14960</i>	IS1182 family transposase
<i>EXIG_RS15210</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15335</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15340</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15585</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15635</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15675</i>	IS3 family transposase
<i>EXIG_RS15685</i>	IS3 family transposase
<i>EXIG_RS15710</i>	IS30 family transposase
<i>EXIG_RS15715</i>	type II toxin-antitoxin system mRNA interferase toxin, RelE/StbE family
<i>EXIG_RS15730</i>	IS3 family transposase
<i>EXIG_RS15740</i>	transposase
<i>EXIG_RS15745</i>	IS3 family transposase
<i>EXIG_RS15775</i>	IS3 family transposase
<i>EXIG_RS15905</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15915</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15925</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15945</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15960</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15965</i>	hypothetical protein
<i>EXIG_RS15970</i>	hypothetical protein

X. ANEXOS

Anexo 3. Otras cepas aisladas por el ensayo de desecación.

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Cepa	Cepa tipo más cercana
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	<i>Caulobacteriaceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	HE24.1	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	<i>Incertae sedis</i>	<i>Bacillus</i>	HE26.4	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>
					HE19.6	<i>Bacillus pumilus</i>
					H19.15	<i>Bacillus megaterium</i>
					HE20.1	<i>Bacillus licheniformis</i>
					HE20.17	<i>Bacillus licheniformis</i>
					HE24.8	<i>Bacillus licheniformis</i>
					HE24.9	<i>Bacillus licheniformis</i>
					HE23.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i>
					HE24.11	<i>Bacillus megaterium</i>
					HE20.18	<i>Bacillus safensis</i>
					HE20.19	<i>Bacillus safensis</i>
					HE24.15	<i>Bacillus circulans</i>
					HE21.16	<i>Bacillus taxi</i>
					HE24.5	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>
					HE24.6	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>
HE24.7	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>					
HE24.13	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>					
			<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>		

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Cepa	Cepa tipo más cercana
				<i>Paenibacillus</i>	E2A	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>
				<i>Paenibacillus</i>	E2B	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>
				<i>Paenibacillus</i>	E5	<i>Paenibacillus lautus</i>
			<i>Planococcaceae</i>	<i>Planococcus</i>	HE26.1	<i>Planococcus donghaensis</i>
				<i>Planococcus</i>	HE25.5Y	<i>Planococcus donghaensis</i>
				<i>Planococcus</i>	HE21.14	<i>Planococcus donghaensis</i>
				<i>Planococcus</i>	HE26.2 (secA)	<i>Planococcus glaciei</i>
				<i>Planococcus</i>	HE26.2 (secB)	<i>Planococcus glaciei</i>
				<i>Planococcus</i>	HE25.5H	<i>Planococcus okeanoikoikes</i>
Actinobacteria	Actinomycetia	Micrococcales	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	HE24.10	<i>Arthrobacter luteolus</i>
				<i>Arthrobacter</i>	HE26.12	<i>Arthrobacter gandavensis</i>
				<i>Arthrobacter</i>	HE26.26	<i>Arthrobacter bussei</i>
				<i>Paenarthrobacter</i>	HE19.5	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>
				<i>Pseudoarthrobacter</i>	HE19.16	<i>Pseudoarthrobacter oxydans</i>
				<i>Micrococcus</i>	HE26.32A	<i>Micrococcus luteus</i>
				<i>Kokuria</i>	HE26.7A	<i>Kocuria gwangalliensis</i>
				<i>Kokuria</i>	HE26.24A	<i>Kocuria gwangalliensis</i>
				<i>Kokuria</i>	HE26.6	<i>Kocuria gwangalliensis</i>
				<i>Kokuria</i>	HE26.30B	<i>Kocuria rosea</i>

X. ANEXOS

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Cepa	Cepa tipo más cercana
Actinobacteria	Actinomycetia	Mycobacteriales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	HE24.12	<i>Rhodococcus ruber</i>
				<i>Rhodococcus</i>	HE24.14	<i>Rhodococcus coprophilus</i>
			Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>	HE24.3	<i>Gordonia terrae</i>
				<i>Gordonia</i>	HE24.4J	<i>Gordonia terrae</i>
		Cellulomonadales	Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	HE19.14	<i>Cellulosimicrobium Funkei</i>
				<i>Krasilnikoviella</i>	HE20.9	<i>Krasilnikoviella muralis</i>
		Streptosporangiales	Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>	HE24.2	<i>Nocardiopsis umidischolae</i>
		Microbacteriales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	HE21.26	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
				<i>Microbacterium</i>	HE21.24	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
				<i>Microbacterium</i>	HE21.32	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>
<i>Microbacterium</i>	HE21.37			<i>Microbacterium thalassium</i>		

X. ANEXOS

Anexo 4. Resultados de RNA-seq del análisis transcriptómico de *Exiguobacterium* sp. Helios cultivado en LB en fase exponencial temprana, exponencial tardía, estacionaria y tras desecación. Se muestran los transcritos por millón (TPM) para cada condición.

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS00015	414,50	2,72	0,24	36,44	RS00260	363,35	10,07	4,17	5,70
RS00060	11,61	6,85	2,03	16,99	RS00265	135,53	56,25	66,22	8,71
RS00065	134,93	75,09	47,86	8,90	RS00270	137,99	128,41	125,54	8,49
RS00070	356,08	109,18	77,94	22,07	RS00275	75,73	71,77	59,49	7,02
RS00075	983,20	2331,11	2228,79	1045,15	RS00280	93,01	123,59	99,09	11,92
RS00080	541,20	887,77	820,06	625,36	RS00285	1552,02	2821,51	4613,12	1311,49
RS00085	493,44	383,43	561,50	734,78	RS00290	133,46	278,41	310,49	159,36
RS00090	467,78	336,41	317,40	154,09	RS00295	72,92	242,28	368,34	113,23
RS00095	163,19	99,48	106,18	27,61	RS00300	110,82	141,81	84,19	55,05
RS00100	126,00	18,42	11,20	26,96	RS00305	14,90	20,61	16,48	16,94
RS00105	98,01	14,35	12,24	18,45	RS00310	54,08	136,28	167,57	51,60
RS00110	311,49	243,83	279,62	67,92	RS00315	111,51	71,97	125,92	16,66
RS00115	441,01	69,68	35,58	14,73	RS00320	25,49	36,56	16,99	10,22
RS00120	611,12	119,87	47,18	13,91	RS00325	133,10	88,58	47,23	35,91
RS00125	354,05	58,63	28,10	7,13	RS00330	502,62	407,95	645,15	199,23
RS00130	483,73	18,07	15,56	39,25	RS00340	76,72	147,10	71,30	21,50
RS00135	683,50	14,23	11,02	42,73	RS00345	364,87	62,79	66,52	33,79
RS00140	245,36	1161,99	1143,66	40,66	RS00350	123,41	1,96	4,34	22,35
RS00145	111,61	54,16	48,11	24,07	RS00355	21,92	47,08	13,12	1,16
RS00150	355,31	445,20	167,04	46,82	RS00360	31,10	126,65	40,48	1,67
RS00155	225,80	509,96	294,66	38,33	RS00365	169,36	73,17	62,10	197,56
RS00160	26,88	0,91	4,68	254,60	RS00370	52,77	13,94	10,06	38,43
RS00165	62,98	2,72	1,12	24,52	RS00375	1,13	8,23	2,15	1,64
RS00170	23,89	21,74	6,21	1,27	RS00380	7,12	630,63	176,83	2,14
RS00175	196,03	283,50	146,56	158,85	RS00385	46,52	41,51	30,30	7,22
RS00180	83,86	222,18	38,87	5,28	RS00390	22,93	25,74	23,10	19,01
RS00185	142,41	0,89	0,99	5,12	RS00395	3678,86	6208,59	2925,23	75,95
RS00190	104,11	56,79	27,30	13,28	RS00400	56,09	4,20	3,11	2,23
RS00195	661,96	442,46	749,50	214,62	RS00405	13,20	32,24	22,82	10,58
RS00200	115,40	11,52	20,71	18,05	RS00410	147,51	84,07	64,54	21,71
RS00205	125,92	29,09	49,68	33,72	RS00415	60,85	92,29	489,77	23,55
RS00210	53,59	12,27	19,32	20,83	RS00420	213,33	128,70	729,99	80,47
RS00215	48,62	20,80	22,76	20,13	RS00425	196,25	3,01	4,80	7,56
RS00220	43,61	13,96	13,48	15,89	RS00430	156,13	4,00	6,41	10,19
RS00225	51,57	15,37	17,07	15,82	RS00435	124,40	7,18	10,60	9,70
RS00230	136,04	43,20	49,94	35,33	RS00440	28,47	8,43	4,08	26,24
RS00235	29,96	8,47	7,48	11,29	RS00445	46,35	328,02	794,34	23,95
RS00240	63,72	17,04	11,42	11,42	RS00450	37,33	0,93	0,21	2,45
RS00245	40,05	27,41	34,10	8,05	RS00455	107,82	6,79	5,02	3,66
RS00250	47,98	577,10	420,26	73,19	RS00460	163,88	230,17	90,64	34,74
RS00255	10233,27	252,20	91,16	67,08	RS00465	288,29	374,35	141,86	57,47

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS00470	135,53	152,19	75,88	26,72	RS00700	206,26	51,98	18,10	17,39
RS00475	86,79	62,38	44,80	15,58	RS00705	41,06	66,56	10,42	16,64
RS00480	48,94	26,64	25,85	8,50	RS00710	1706,11	998,99	977,88	219,73
RS00485	37,98	18,12	16,76	9,11	RS00715	51,15	10,56	4,40	166,24
RS00490	215,59	5,50	3,34	11,55	RS00720	27,31	4,23	1,43	1,41
RS00495	43,13	61,66	29,36	7,08	RS00725	59,39	105,45	40,96	6,78
RS00500	82,89	263,57	328,56	109,50	RS00730	5,65	308,52	3,34	13,63
RS00505	120,45	51,94	32,78	112,64	RS00735	174,37	81,94	32,86	29,12
RS00510	93,71	88,60	97,29	12,57	RS00740	211,76	29,51	8,73	3,48
RS00515	23,66	4,42	4,89	3,92	RS00745	2779,42	1299,25	1881,26	204,09
RS00520	47,36	15,93	8,88	9,36	RS00750	5,66	2,24	0,85	3,04
RS00525	1,32	2,38	0,59	0,22	RS00755	91,92	78,68	15,95	4,82
RS00530	47,12	3,49	1,30	4,06	RS00760	206,35	536,05	156,37	11,94
RS00535	14,89	1,02	0,31	1,31	RS00765	13,31	81,70	41,28	2,97
RS00540	82,59	7,23	5,46	3,92	RS00770	41,85	17,09	20,72	5,50
RS00545	469,30	376,69	247,40	71,37	RS00775	25,01	31,80	15,85	4,33
RS00550	74,25	0,87	0,56	33,22	RS00780	101,15	42,88	18,45	4,69
RS00555	39,18	3,42	0,54	44,20	RS00785	227,18	87,70	35,51	8,04
RS00560	149,31	1162,06	925,14	89,75	RS00790	160,56	233,64	135,81	31,48
RS00565	76,03	89,75	69,86	34,49	RS00795	25,28	1,00	0,82	2,54
RS00570	115,85	128,56	101,16	37,32	RS00800	14,38	3,38	4,57	7,92
RS00575	82,84	2,60	8,09	11,51	RS00805	47,89	74,17	25,62	35,42
RS00580	41,14	2,27	4,99	6,06	RS00810	65,98	43,37	39,81	14,36
RS00585	81,63	9,06	15,46	8,46	RS00815	123,12	59,08	56,21	23,26
RS00590	105,88	11,67	18,91	10,40	RS00820	2766,02	1692,63	3071,11	271,26
RS00595	29,86	629,84	205,57	10,05	RS00825	277,74	264,48	401,67	114,13
RS00600	95,75	1,53	0,48	8,16	RS00830	33,13	62,98	93,86	9,34
RS00605	101,49	60,58	27,78	7,52	RS00835	42,85	219,48	78,07	8,51
RS00610	26,73	6,86	6,69	9,25	RS00840	28,22	44,94	20,28	14,72
RS00615	270,70	201,46	223,64	117,57	RS00845	19,68	19,87	10,36	9,51
RS00620	264,68	284,76	381,37	115,01	RS00850	2388,38	800,75	779,03	361,62
RS00625	29,54	3,73	1,71	3,07	RS00855	41,12	204,39	233,87	55,15
RS00630	52,66	8,12	5,63	9,26	RS00860	17,23	54,09	71,06	23,34
RS00635	540,64	1,18	1,93	7,62	RS00865	31,22	64,51	71,38	31,85
RS00640	113,07	68,26	25,37	15,57	RS00870	23,77	11,67	16,82	49,93
RS00645	847,68	206,16	138,21	65,76	RS00875	30,20	20,31	35,10	81,22
RS00650	1002,07	399,29	434,82	118,85	RS00880	42,49	28,41	60,58	88,22
RS00655	435,52	205,50	202,00	19,02	RS00885	56,41	88,74	27,00	21,19
RS00660	460,04	136,78	157,05	77,43	RS00890	45,20	29,56	84,38	40,85
RS00665	267,39	228,67	247,38	44,27	RS00895	194,16	557,25	619,45	124,18
RS00670	522,84	1188,72	1181,46	235,88	RS00900	159,70	105,67	57,95	26,41
RS00675	45,59	3,63	2,56	17,29	RS00905	168,27	93,50	41,63	15,75
RS00680	1,11	1,55	0,52	0,33	RS00910	6,59	2,28	2,97	1,68
RS00690	5,66	0,32	0,69	2,07	RS00915	986,21	362,70	333,98	38,82
RS00695	61,48	21,17	14,75	15,56	RS00920	9,92	1,94	1,20	3,50

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS00930	39,14	185,04	161,35	9,30	RS01160	109,70	491,47	388,26	924,54
RS00935	1487,70	446,84	181,63	92,73	RS01165	97,64	560,73	568,14	84,67
RS00940	13,69	28,46	17,97	1,07	RS01170	30,39	286,42	318,76	54,84
RS00945	75,86	9,76	3,99	1,35	RS01175	49,82	283,37	275,10	89,10
RS00950	1421,43	8,79	6,85	4,04	RS01180	49,11	211,39	251,60	81,90
RS00955	13,40	7,07	7,05	3,47	RS01185	93,73	175,41	202,83	62,93
RS00960	113,14	220,81	331,26	1,53	RS01190	409,86	12,20	14,58	22,05
RS00965	4,08	0,27	0,03	1,04	RS01195	358,86	235,93	110,07	117,11
RS00970	1,55	0,00	0,00	0,51	RS01200	100,94	39,42	16,93	19,40
RS00975	34,49	29,63	84,90	7,84	RS01205	168,19	87,12	34,19	86,13
RS00980	33,16	6,79	1,09	2,46	RS01210	1645,67	251,96	239,14	638,19
RS00985	15,54	1,43	0,29	1,41	RS01215	2930,02	529,00	474,78	1341,70
RS00990	273,28	81,99	79,53	27,40	RS01220	3128,50	366,50	369,36	765,04
RS00995	24,88	0,32	0,24	0,68	RS01225	374,77	33,14	37,12	83,15
RS01000	18,88	14,98	28,04	37,26	RS01230	35,53	7,45	9,87	7,33
RS01005	15,40	30,75	58,40	53,00	RS01235	137,05	39,43	54,01	34,52
RS01010	32,33	53,88	58,27	44,79	RS01240	342,34	317,40	115,26	54,96
RS01015	68,79	107,37	125,38	39,26	RS01245	25,62	4,81	2,84	27,68
RS01020	2567,22	6,36	5,20	31,58	RS01250	181,07	43,72	36,15	114,32
RS01025	2097,32	7,99	6,57	44,53	RS01255	71,01	20,74	17,12	45,25
RS01030	2403,51	274,75	82,96	40,70	RS01260	78,82	25,69	25,46	73,53
RS01035	234,28	264,51	209,70	86,68	RS01265	32,74	13,67	20,57	68,21
RS01040	11,62	53,48	24,43	2,07	RS01270	442,89	346,69	339,52	552,09
RS01045	49,58	3,11	1,31	13,12	RS01275	182,54	136,64	132,00	358,62
RS01050	49,91	0,42	0,23	0,63	RS01280	1624,68	1347,35	1565,24	307,99
RS01055	39,94	21,61	9,89	2,25	RS01285	127,40	22,44	48,93	138,01
RS01060	213,23	21,16	7,49	25,39	RS01290	381,76	51,76	108,67	216,65
RS01065	296,60	53,79	30,05	57,91	RS01295	27,12	44,56	148,24	58,46
RS01070	429,58	89,87	59,67	105,57	RS01300	140,77	296,38	729,48	259,90
RS01075	18,52	29,09	8,75	2,15	RS01305	556,37	913,25	1806,12	492,60
RS01080	83,97	115,98	84,50	23,58	RS01310	758,12	1158,98	1926,13	473,61
RS01085	22,01	14,95	8,70	3,95	RS01315	55,75	21,06	31,76	12,84
RS01090	225,59	166,37	108,62	26,68	RS01335	785,38	2602,70	1506,62	180,83
RS01095	59,56	46,02	35,84	14,30	RS01340	142,75	122,80	52,55	8,61
RS01100	107,40	5,21	8,11	11,11	RS01345	1359,17	288,14	94,93	19,88
RS01105	21,28	1,72	0,97	1,05	RS01350	3086,22	694,89	201,09	52,43
RS01110	26,77	30,11	62,11	3,64	RS01355	127,77	56,70	75,39	10,28
RS01115	12,58	1,08	0,61	0,61	RS01360	694,14	41,61	11,47	16,09
RS01120	78,39	11,22	9,54	9,44	RS01365	2,53	0,00	0,00	0,00
RS01130	6,27	0,29	0,23	0,84	RS01380	22,52	4,71	1,65	7,22
RS01135	10,87	0,29	0,05	2,06	RS01385	60,81	27,41	20,29	48,77
RS01140	39,83	6,13	2,61	4,54	RS01390	47,13	10,62	11,57	37,59
RS01145	26,27	2,32	0,63	1,87	RS01395	12,46	4,46	5,10	2,87
RS01150	109,91	11,37	10,97	9,36	RS01400	2650,38	5709,88	2177,81	12684,93
RS01155	9,70	1,12	0,56	0,15	RS01405	55,06	155,23	167,13	43,90

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS01410	138,05	414,84	406,02	26,86	RS01725	47,16	37,68	36,43	24,58
RS01415	337,53	1401,90	1288,10	120,06	RS01730	51,09	71,59	58,62	26,07
RS01420	109,56	541,94	536,00	48,41	RS01735	322,90	61,42	61,67	78,45
RS01440	43,54	0,69	1,39	106,34	RS01740	0,33	0,00	0,00	0,00
RS01485	103,70	1,58	0,24	10,16	RS01765	44,08	0,79	1,28	12,35
RS01515	23,18	5,65	3,63	22,30	RS01780	365,49	2,87	2,53	10,31
RS01520	277,95	285,72	153,84	46,78	RS01800	267,56	279,76	187,40	214,57
RS01525	122,00	166,05	81,79	19,10	RS01805	285,17	314,33	191,41	182,71
RS01530	108,37	85,15	83,35	31,61	RS01810	466,77	480,67	268,50	233,64
RS01535	323,80	713,13	1145,41	289,92	RS01815	3065,10	1788,85	970,07	579,78
RS01540	14,82	32,09	44,67	10,44	RS01820	155,50	26,27	14,27	48,38
RS01545	80,01	40,37	60,02	108,22	RS01825	140,89	140,47	326,59	143,60
RS01550	17,95	6,17	7,78	18,16	RS01830	36,80	16,21	10,35	9,32
RS01555	59,57	34,45	32,26	46,50	RS01835	49,41	21,81	19,24	8,48
RS01560	472,93	30,02	53,57	233,25	RS01840	656,82	344,32	265,61	94,34
RS01565	575,20	25,93	22,56	57,75	RS01845	85,50	81,61	78,72	13,66
RS01570	94,60	40,89	49,72	40,23	RS01850	200,65	315,51	201,90	26,32
RS01580	59,48	43,99	50,83	31,74	RS01855	197,97	405,22	231,54	29,86
RS01585	109,03	66,11	80,49	52,08	RS01860	267,68	647,80	314,10	40,66
RS01590	1777,68	4524,37	12542,89	1973,37	RS01865	135,77	420,94	192,57	16,42
RS01595	114,12	19,93	19,45	36,37	RS01870	129,97	282,11	200,41	140,73
RS01600	220,26	64,72	47,34	44,61	RS01875	252,70	15,20	24,65	290,32
RS01605	67,78	173,42	162,89	12,75	RS01880	109,88	9,58	8,93	162,13
RS01610	141,66	168,24	228,86	71,65	RS01885	496,86	101,56	133,32	633,39
RS01615	492,22	297,23	302,22	124,97	RS01890	2209,78	448,17	680,62	1520,29
RS01620	105,38	235,41	101,21	31,20	RS01895	728,37	107,44	149,31	1117,52
RS01625	71,99	195,69	116,50	18,62	RS01900	893,44	32,77	37,39	178,80
RS01630	48,47	129,66	75,85	15,63	RS01905	1001,11	48,90	44,00	157,30
RS01635	219,03	423,25	296,00	120,51	RS01910	147,66	1,94	1,72	32,01
RS01640	106,21	420,43	267,24	18,68	RS01915	1839,86	1404,92	1358,15	406,47
RS01645	1065,21	1473,42	1052,43	122,33	RS01920	3725,01	2408,66	2826,92	464,72
RS01650	1262,39	4986,41	3979,73	403,27	RS01925	544,41	442,98	695,43	548,05
RS01655	6,48	0,34	0,48	7,39	RS01930	1205,37	494,71	363,95	878,26
RS01665	66,12	2,94	2,45	24,88	RS01935	1885,41	621,93	372,54	715,70
RS01670	526,80	40,08	88,27	82,60	RS01940	4498,88	564,64	221,52	811,54
RS01675	1913,18	2148,51	1491,92	440,45	RS01945	11715,54	1426,85	903,92	1420,81
RS01680	101,12	62,13	54,65	47,71	RS01950	1006,15	50,50	21,81	554,93
RS01685	87,69	140,25	103,33	88,90	RS01955	754,45	155,10	58,63	722,01
RS01690	178,99	367,35	180,24	96,26	RS01960	794,36	204,86	76,24	839,19
RS01695	496,84	2173,50	1002,29	243,53	RS01965	782,00	112,70	45,25	392,63
RS01700	104,78	48,12	38,39	23,47	RS01970	3280,17	376,15	157,78	1394,11
RS01705	111,65	54,36	42,39	29,78	RS01975	1026,02	145,96	65,75	514,38
RS01710	110,19	55,75	43,71	28,73	RS01980	975,76	135,46	65,10	419,39
RS01715	106,66	61,88	50,87	29,36	RS01985	2197,99	214,91	102,01	847,51
RS01720	36,47	30,28	23,22	14,43	RS01990	1828,24	138,26	62,72	487,01

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS01995	337,88	35,99	12,08	88,20	RS02275	8,74	3,17	2,48	3,63
RS02000	726,50	47,73	21,61	159,37	RS02280	59,98	30,57	18,30	10,31
RS02005	1139,70	88,21	45,69	390,03	RS02285	133,13	106,86	91,73	14,09
RS02010	657,94	75,98	35,40	374,30	RS02290	51,84	4,31	4,55	1,03
RS02015	1052,91	194,08	61,11	537,65	RS02295	29,85	52,89	53,08	28,56
RS02020	1252,98	193,69	63,00	528,92	RS02300	121,72	122,33	106,58	135,14
RS02025	1576,65	310,18	89,83	827,55	RS02305	116,89	82,84	59,23	57,07
RS02030	875,62	270,36	78,71	459,31	RS02310	167,25	130,23	96,09	50,79
RS02035	859,79	165,72	45,16	336,49	RS02315	156,70	117,56	73,64	43,97
RS02040	1768,88	304,61	77,05	481,31	RS02320	8,02	3,68	0,34	0,39
RS02045	1581,61	197,81	45,10	247,27	RS02325	36,52	26,37	3,30	2,59
RS02050	4259,67	411,86	125,05	555,41	RS02330	171,62	79,02	22,79	5,79
RS02055	5305,98	621,98	178,26	787,46	RS02335	29,96	1,47	3,56	1,02
RS02060	1205,76	86,77	26,62	286,23	RS02340	30,14	116,96	47,41	5,51
RS02065	1689,96	177,51	164,81	503,61	RS02345	101,58	302,61	124,58	23,59
RS02070	2142,35	193,64	227,43	681,75	RS02350	98,38	0,98	0,98	5,53
RS02075	22,40	1,90	2,53	8,07	RS02355	0,87	0,48	0,18	1,13
RS02080	2169,27	176,05	212,70	419,50	RS02360	238,10	217,95	117,40	6,78
RS02085	832,79	215,92	218,34	505,76	RS02365	26,27	7,45	29,27	54,09
RS02090	1403,49	306,24	275,85	641,60	RS02370	15,97	5,41	16,54	41,07
RS02095	1506,19	207,12	143,09	323,13	RS02375	772,39	70,87	72,24	20,70
RS02100	310,96	50,39	41,29	131,32	RS02380	1062,96	113,40	130,02	22,99
RS02105	44,65	8,10	15,79	30,72	RS02385	32,18	10,32	2,82	2,01
RS02110	29,91	11,15	15,31	23,18	RS02390	264,08	258,73	175,91	34,75
RS02115	77,82	21,55	34,65	50,31	RS02395	255,33	266,19	223,49	33,29
RS02120	2032,87	180,78	875,31	522,16	RS02400	138,94	172,19	133,99	26,51
RS02125	1168,26	363,04	1131,66	421,54	RS02405	61,00	152,07	138,83	19,80
RS02130	2,25	0,18	0,06	0,27	RS02410	9,20	3,59	2,68	0,84
RS02135	114,25	700,61	625,57	22,00	RS02415	135,38	34,98	9,65	7,82
RS02140	316,78	607,36	395,22	61,05	RS02420	149,25	148,44	66,10	11,23
RS02145	416,65	947,47	621,48	93,73	RS02425	46,59	7,90	5,59	16,56
RS02150	0,26	0,00	0,00	0,01	RS02430	44,67	6,59	3,27	4,43
RS02205	11,01	0,00	0,29	16,82	RS02435	76,42	2,41	1,26	4,03
RS02210	288,39	1929,92	3581,03	86,78	RS02440	150,05	46,35	35,99	16,10
RS02215	889,36	533,99	948,24	156,57	RS02445	198,82	65,17	34,10	22,87
RS02220	1200,38	1600,82	2538,16	252,57	RS02450	237,05	112,27	54,08	27,54
RS02225	102,09	107,96	159,67	52,18	RS02455	144,82	216,97	416,81	586,29
RS02230	176,76	150,74	196,33	81,25	RS02460	20,08	5,09	5,55	11,43
RS02235	483,78	382,72	558,56	121,33	RS02465	9,91	1,25	0,55	24,08
RS02240	529,64	1439,34	237,75	124,55	RS02470	3,27	0,16	0,00	14,45
RS02245	2,37	2,41	1,25	1,49	RS02475	41,21	19,66	6,70	37,81
RS02255	138,35	20,05	13,42	5,18	RS02480	40,00	5,83	5,02	4,39
RS02260	113,49	19,31	16,08	9,25	RS02485	299,16	1463,08	2258,52	54,32
RS02265	39,04	9,30	6,89	2,55	RS02490	76,39	3,02	0,62	13,80
RS02270	60,03	251,86	189,69	13,46	RS02495	28,35	23,13	21,06	8,46

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS02500	282,24	1422,67	3335,31	464,15	RS02725	114,56	112,72	93,80	17,71
RS02505	34,84	44,40	21,63	13,05	RS02730	21,57	17,77	22,14	6,18
RS02510	139,71	1,23	1,80	551,83	RS02735	285,74	53,60	80,94	60,48
RS02515	726,86	4457,56	3593,43	82,57	RS02740	99,29	17,29	17,76	20,17
RS02520	132,18	52,40	46,57	11,77	RS02745	41,29	124,18	255,78	137,60
RS02525	61,78	168,58	126,05	29,80	RS02750	32,02	129,12	262,45	124,39
RS02530	198,84	579,32	345,72	50,12	RS02755	11,94	10,34	7,67	2,32
RS02535	16,65	20,05	9,63	9,66	RS02760	208,06	408,84	764,08	50,03
RS02540	273,43	363,18	83,69	11,03	RS02765	72,78	37,61	34,57	11,44
RS02545	432,07	604,41	212,80	18,32	RS02770	119,36	94,67	66,38	59,21
RS02550	271,09	194,27	64,60	11,43	RS02775	59,70	22,35	22,60	13,48
RS02555	71,29	140,35	60,52	21,33	RS02780	80,72	117,25	42,94	23,70
RS02560	28,55	3,25	2,71	12,02	RS02785	103,09	757,97	149,46	15,41
RS02565	55,09	4,07	5,73	9,28	RS02790	79,72	680,46	115,67	20,04
RS02570	445,33	150,62	157,35	34,73	RS02795	52,94	732,61	179,47	22,78
RS02575	479,39	73,72	84,37	38,06	RS02800	92,91	85,07	156,58	65,03
RS02580	1107,67	433,55	182,83	78,27	RS02805	79,11	39,31	66,56	12,51
RS02585	21,54	3,19	0,79	4,07	RS02810	95,08	82,03	111,49	21,21
RS02590	21,08	4,31	0,90	4,33	RS02815	10,34	3,23	2,54	0,65
RS02595	375,31	214,22	115,43	179,45	RS02820	23,63	6,81	5,11	3,94
RS02600	48,67	89,20	86,48	11,46	RS02825	41,92	0,13	0,24	3,62
RS02605	356,94	1,50	0,94	2,59	RS02830	23,42	417,81	389,26	46,64
RS02610	537,84	101,38	47,11	98,85	RS02835	21,80	137,05	305,74	90,12
RS02615	321,43	166,24	94,25	146,13	RS02840	53,89	735,03	1079,30	241,88
RS02620	74,52	5,23	4,63	9,31	RS02845	145,11	49,06	43,12	29,67
RS02625	67,80	33,51	22,77	11,95	RS02850	67,55	363,64	61,14	9,17
RS02630	69,20	24,04	18,08	12,37	RS02855	178,31	575,78	121,68	21,82
RS02635	598,05	1846,92	1110,54	259,66	RS02860	22,15	7,16	2,16	6,01
RS02640	69,18	62,36	44,01	16,37	RS02865	15,47	8,13	2,09	6,31
RS02645	132,92	99,23	22,93	79,99	RS02870	31,96	2,65	1,25	1,79
RS02650	31,19	4,07	0,95	12,17	RS02875	164,96	124,73	53,54	7,60
RS02655	46,00	9,70	2,82	17,27	RS02880	27,73	39,85	28,22	5,90
RS02660	877,34	242,93	225,08	126,32	RS02885	40,71	157,78	130,45	16,81
RS02665	1469,14	208,58	176,79	250,69	RS02890	69,51	644,24	91,57	5,02
RS02670	2959,80	568,70	480,95	327,29	RS02900	66,95	406,02	113,13	5,73
RS02675	140,62	33,55	18,03	23,47	RS02905	11,46	0,95	0,62	128,86
RS02680	107,97	46,88	28,14	19,82	RS02910	79,58	8,39	4,21	9,86
RS02685	88,09	14,79	13,09	21,42	RS02915	43,98	15,92	7,84	10,31
RS02690	19,61	3,33	2,96	10,00	RS02920	71,20	11,88	4,39	2,40
RS02695	71,09	83,57	47,63	76,29	RS02925	10,18	4,06	3,63	627,01
RS02700	492,07	274,11	303,73	43,28	RS02930	0,44	0,05	0,13	46,96
RS02705	447,81	42,67	110,49	17,09	RS02935	0,57	0,17	0,09	46,43
RS02710	376,81	119,93	68,98	11,92	RS02940	22,64	69,40	77,77	25,51
RS02715	223,53	107,50	153,99	21,16	RS02945	33,10	72,38	65,69	23,92
RS02720	38,79	372,82	327,38	19,64	RS02950	25,53	38,15	33,44	14,77

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS02955	28,17	3,39	1,08	1,26	RS03195	72,86	29,33	10,62	257,79
RS02960	27,91	0,77	0,48	1,44	RS03200	413,13	250,42	36,00	23,04
RS02965	30,40	81,17	350,65	388,87	RS03205	64,02	2,20	1,42	46,44
RS02970	1,72	5,56	1,48	0,56	RS03210	603,61	1,49	1,74	4,22
RS02975	52,86	244,85	71,11	2,08	RS03215	36,86	200,34	137,98	25,04
RS02980	147,41	10,13	18,20	77,91	RS03220	17,60	95,20	76,48	15,04
RS02985	43,21	0,89	1,39	3,56	RS03225	118,27	152,99	55,12	17,77
RS02990	42,16	6,58	5,12	41,08	RS03230	0,59	0,20	0,07	1,36
RS02995	40,62	8,17	13,33	48,67	RS03235	8,46	5,05	3,84	1,78
RS03000	14,60	3,83	7,94	38,78	RS03240	4,49	2,78	2,37	1,23
RS03005	13,42	5,16	12,77	45,00	RS03245	2,23	0,34	0,31	1,34
RS03010	10,92	3,74	13,35	40,27	RS03250	1,54	0,45	0,56	2,27
RS03015	4,78	9,67	9,70	3,25	RS03255	2,43	0,17	0,07	1,26
RS03020	19,79	28,87	33,27	23,71	RS03260	3,13	0,37	0,18	2,10
RS03030	75,94	69,21	74,41	60,63	RS03265	3,49	0,84	0,39	3,11
RS03035	53,33	38,78	35,72	39,69	RS03270	1,17	0,34	0,72	1,96
RS03040	51,98	36,64	61,83	26,44	RS03275	4,82	6,78	3,52	2,70
RS03045	89,85	41,30	46,22	26,60	RS03280	17,33	37,48	10,84	3,99
RS03050	243,91	19,63	15,69	9,40	RS03285	22,36	155,91	134,38	481,62
RS03055	14,52	1,17	1,02	3,82	RS03290	69,95	37,99	24,33	6,63
RS03060	13,76	1,67	1,07	0,92	RS03295	43,01	42,49	9,87	30,32
RS03065	98,06	2,91	1,62	3,03	RS03300	19,03	1,77	1,09	6,09
RS03070	287,22	78,86	118,13	126,37	RS03305	194,51	590,95	70,78	28,81
RS03075	30,52	38,24	40,29	26,22	RS03310	99,31	50,90	9,36	15,11
RS03080	15,86	3,93	7,57	5,50	RS03315	39,12	79,25	18,89	9,95
RS03085	17,83	6,52	5,39	6,75	RS03320	634,07	1385,88	465,28	44,24
RS03095	9,34	1,93	2,77	2,00	RS03325	811,93	4595,60	1723,10	1893,12
RS03100	5,81	0,39	0,41	5,93	RS03330	159,05	6,14	3,54	0,94
RS03105	50,59	415,37	1289,65	360,23	RS03335	58,96	10,48	7,28	7,42
RS03110	210,71	47,82	46,12	186,26	RS03340	211,57	23,06	18,18	11,67
RS03115	113,79	3,95	2,11	16,30	RS03345	108,65	17,75	5,93	4,14
RS03120	108,29	1,50	0,86	13,53	RS03350	53,75	50,09	26,14	2,39
RS03125	134,66	0,78	0,87	10,88	RS03355	76,42	239,67	241,87	14,28
RS03130	276,77	1,32	1,25	11,41	RS03360	102,90	24,42	28,74	40,58
RS03135	24,78	1,85	0,70	0,74	RS03365	58,99	40,51	36,81	29,58
RS03140	16,99	2,11	1,62	2,18	RS03370	15,13	7,57	5,50	11,26
RS03145	2,17	0,66	0,51	0,72	RS03375	14,02	9,20	7,10	9,65
RS03150	16,17	6,29	2,34	5,38	RS03380	12,40	8,90	6,23	7,77
RS03160	73,92	43,85	26,27	34,95	RS03385	12,94	6,19	3,70	4,50
RS03165	183,95	719,94	1576,68	132,20	RS03390	13,49	7,78	5,89	3,88
RS03170	36,92	75,76	47,22	53,81	RS03395	19,05	18,51	12,93	4,82
RS03175	10,90	0,10	0,39	0,39	RS03400	22,51	23,62	15,56	5,52
RS03180	17,54	0,00	0,22	1,30	RS03405	28,70	30,08	16,90	4,57
RS03185	43,69	6,64	3,23	176,16	RS03410	18,18	47,64	30,56	17,36
RS03190	62,71	13,72	4,18	226,40	RS03415	72,52	354,25	307,90	94,93

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS03420	71,77	314,45	256,49	98,30	RS03645	19,41	0,99	0,24	2,15
RS03425	55,41	195,03	118,98	76,40	RS03650	23,12	0,30	0,08	2,59
RS03430	42,63	149,72	81,91	75,35	RS03655	5,02	0,02	0,00	0,15
RS03435	38,88	149,07	82,48	113,86	RS03660	3,79	0,25	0,07	0,48
RS03440	26,30	100,99	73,58	70,04	RS03665	4,95	0,35	0,23	0,60
RS03445	63,07	1973,57	2414,68	327,84	RS03670	4,06	0,94	0,31	1,12
RS03450	86,05	2038,56	2405,98	261,15	RS03675	2,74	1,41	0,85	1,43
RS03455	45,15	823,61	861,25	110,82	RS03680	24,99	109,53	63,22	61,20
RS03460	92,73	1232,28	1231,87	202,88	RS03685	29,05	37,23	42,09	55,20
RS03465	133,93	1332,11	1247,33	282,98	RS03690	43,73	51,42	59,29	74,94
RS03470	55,69	394,43	331,03	75,16	RS03695	310,10	340,06	263,53	41,97
RS03475	163,69	767,62	546,99	199,31	RS03700	4,83	1,22	0,63	2,35
RS03480	207,70	1560,75	1752,13	187,69	RS03705	5139,54	7053,77	2971,28	94,71
RS03485	42,23	693,84	767,49	64,21	RS03710	2,63	4,12	0,84	1,43
RS03490	44,28	790,76	785,51	64,88	RS03715	133,77	460,25	239,66	20,70
RS03495	36,13	668,87	649,84	40,41	RS03720	4,49	0,02	0,00	0,02
RS03500	63,10	757,37	712,95	62,33	RS03735	66,13	38,37	31,32	39,12
RS03505	68,19	98,11	75,50	29,51	RS03740	77,07	89,76	127,77	82,85
RS03510	11,12	31,88	40,33	14,58	RS03745	81,44	81,93	118,51	114,76
RS03515	16,52	2,86	0,76	8,31	RS03750	96,92	45,08	59,93	30,43
RS03520	72,51	12,87	2,93	16,29	RS03755	12,85	7,46	20,49	14,15
RS03525	57,96	252,68	135,50	55,06	RS03760	4,51	2,89	8,14	2,43
RS03530	23,93	2,64	1,05	2,20	RS03765	13,65	12,38	29,47	15,79
RS03535	149,62	30,38	29,24	8,84	RS03770	13,51	18,38	55,20	40,57
RS03540	57,27	4,18	1,34	3,63	RS03775	14,81	17,70	53,02	47,68
RS03545	571,46	11,59	10,85	29,96	RS03780	10,85	12,52	37,68	34,80
RS03550	1,17	1,15	0,46	0,89	RS03785	4,09	7,98	32,30	18,59
RS03555	0,22	0,00	0,39	0,41	RS03790	43,27	89,72	97,14	62,26
RS03560	165,02	940,66	549,27	20,84	RS03795	78,96	126,55	98,10	49,67
RS03565	139,39	69,29	23,23	28,83	RS03800	571,47	211,03	115,74	103,62
RS03570	75,55	31,63	9,56	10,40	RS03805	473,22	339,28	239,69	100,91
RS03575	123,58	35,08	55,74	11,81	RS03810	51,38	9,85	5,89	19,67
RS03580	856,25	284,74	249,06	116,17	RS03815	15,03	6,30	3,92	7,55
RS03585	1294,37	428,12	461,25	162,24	RS03820	26,65	54,47	41,83	19,10
RS03590	2390,61	607,21	979,38	187,35	RS03825	183,17	185,08	152,69	138,75
RS03595	148,52	10,53	6,72	37,73	RS03830	435,06	390,60	306,63	282,12
RS03600	439,42	455,13	381,66	178,62	RS03835	24,07	52,88	41,55	12,95
RS03605	108,61	118,16	45,43	15,50	RS03840	46,51	63,22	52,13	33,06
RS03610	10,59	1,49	0,62	4,85	RS03845	55,44	6,46	3,95	17,34
RS03615	3,89	1,01	0,69	6,37	RS03850	134,54	70,03	45,02	20,47
RS03620	162,67	18,89	16,52	10,61	RS03855	91,25	21,63	27,25	4,83
RS03625	67,98	121,48	53,27	33,41	RS03860	357,04	250,10	213,38	278,65
RS03630	26,48	50,09	32,03	33,09	RS03865	559,90	476,72	277,11	686,79
RS03635	35,27	2,97	2,12	2,03	RS03870	38,40	31,98	26,75	24,78
RS03640	19,33	1,08	0,79	2,43	RS03875	48,56	292,85	80,12	7,16

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS03880	118,56	47,54	26,08	20,79	RS04110	206,83	695,17	183,38	22,01
RS03885	144,23	92,26	50,84	29,42	RS04115	30,37	8,22	5,03	6,81
RS03890	42,14	104,94	298,97	17,39	RS04120	5,60	0,00	0,30	3,53
RS03895	51,38	218,00	414,53	30,81	RS04125	16,73	0,45	0,64	16,06
RS03900	20,95	8,68	18,87	13,04	RS04130	25,59	3,47	0,60	1,10
RS03905	76,33	246,81	291,93	25,78	RS04135	26,75	8,58	6,43	26,30
RS03910	72,38	7,48	8,40	7,10	RS04140	54,27	13,26	2,74	112,69
RS03915	68,46	11,50	13,21	3,80	RS04145	40,30	5,11	0,95	98,45
RS03920	6,96	0,67	0,20	2,71	RS04150	79,36	50,92	34,48	11,17
RS03925	9,60	1,80	1,74	3,37	RS04155	15,50	91,61	89,23	9,68
RS03930	33,30	8,56	2,62	6,45	RS04160	120,46	97,98	91,66	4,50
RS03935	46,67	11,10	4,77	10,49	RS04165	208,57	862,13	691,14	39,36
RS03940	59,47	15,05	4,56	9,35	RS04170	270,73	136,66	45,01	14,74
RS03945	53,06	12,34	3,92	8,43	RS04175	1145,89	560,94	279,03	127,20
RS03950	294,41	23,83	19,09	30,91	RS04180	113,80	66,45	31,73	41,62
RS03955	580,91	104,44	105,58	90,19	RS04185	156,09	16,66	14,50	14,61
RS03960	58,05	39,17	37,80	13,14	RS04190	331,30	86,90	38,19	23,66
RS03965	135,74	182,58	151,19	18,03	RS04195	263,98	102,09	41,79	24,75
RS03975	549,75	1896,93	1739,17	123,48	RS04200	34,33	17,30	16,90	12,15
RS03980	1323,35	35,07	24,94	9,30	RS04205	22,26	11,32	3,64	4,37
RS03985	1107,72	107,14	82,00	15,68	RS04210	4,91	3,00	0,78	0,65
RS03990	1037,85	14,65	15,78	8,53	RS04215	7,25	0,28	0,27	13,39
RS03995	2,46	4,57	4,34	5,58	RS04220	8,12	0,75	0,16	10,43
RS04000	140,03	147,60	30,50	42,74	RS04225	6,93	4,23	1,80	7,03
RS04005	734,94	502,01	885,07	218,79	RS04230	45,34	155,41	78,20	27,35
RS04010	198,61	43,14	49,15	236,87	RS04235	109,82	257,61	313,38	23,03
RS04015	117,28	22,80	11,80	4,13	RS04240	8,70	2,32	1,14	4,36
RS04020	22,74	43,05	19,14	11,06	RS04245	55,58	14,28	5,15	20,77
RS04025	71,47	84,36	24,60	7,00	RS04250	82,00	19,31	6,42	13,09
RS04030	1020,45	1853,62	1992,12	294,63	RS04255	1307,78	59,08	24,69	17,33
RS04035	1076,20	1205,09	1163,15	50,97	RS04260	182,96	181,55	141,52	64,41
RS04040	231,24	36,39	10,65	90,18	RS04265	356,19	342,03	282,33	89,76
RS04045	50,08	1,88	6,51	218,04	RS04270	110,20	20,55	5,80	34,31
RS04050	399,56	177,79	128,39	178,82	RS04275	13,73	16,99	4,06	3,24
RS04055	355,06	177,65	127,98	182,72	RS04280	37,60	59,74	30,99	7,99
RS04060	15,91	20,78	54,90	22,92	RS04285	76,00	88,21	48,98	24,38
RS04065	183,15	71,51	49,36	60,42	RS04290	40,01	8,82	6,50	9,08
RS04070	1,70	0,00	0,00	1,67	RS04295	5,67	0,10	0,60	0,99
RS04075	17,62	6,83	3,13	1,92	RS04300	40,26	28,33	19,36	9,11
RS04080	9,99	5,12	2,38	3,50	RS04305	90,49	303,84	150,03	22,49
RS04085	10,62	11,50	5,79	2,93	RS04310	24,30	40,29	45,58	45,87
RS04090	20,48	30,31	16,20	6,22	RS04315	32,49	185,94	197,77	186,17
RS04095	584,29	76,27	51,57	9,31	RS04320	460,07	900,01	927,70	215,80
RS04100	365,74	33,94	11,70	8,51	RS04325	77,19	19,89	34,43	6,64
RS04105	27,46	6,13	7,61	6,41	RS04330	115,32	98,03	116,71	13,27

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS04335	1687,78	4407,97	4196,38	175,07	RS04560	339,92	446,56	284,97	72,66
RS04340	17,52	7,40	7,53	37,86	RS04565	14,93	7,98	4,89	4,99
RS04345	0,73	0,10	0,21	2,64	RS04570	171,87	37,78	36,34	21,53
RS04350	2,23	0,13	0,12	2,48	RS04575	142,92	11,16	21,58	13,79
RS04355	2,15	0,58	0,24	1,56	RS04580	153,24	48,78	67,25	11,63
RS04360	2,37	0,63	0,18	0,92	RS04585	179,18	1,01	1,54	6,92
RS04365	4,40	0,58	0,51	2,03	RS04590	25,16	9,91	7,00	54,14
RS04370	4,44	1,99	1,25	1,35	RS04595	383,04	231,22	113,53	233,41
RS04375	6,61	5,64	2,51	1,28	RS04600	837,59	506,34	1068,01	784,27
RS04380	179,14	103,86	53,66	12,78	RS04605	46,01	11,70	10,28	55,09
RS04385	3,14	0,71	0,00	4,16	RS04610	102,49	38,63	32,92	54,47
RS04390	87,15	2,82	1,62	3,64	RS04615	139,78	32,08	27,58	26,42
RS04395	136,59	59,39	41,69	4,49	RS04620	88,24	122,11	94,50	20,45
RS04400	317,42	517,35	226,62	60,82	RS04625	76,22	78,35	69,08	18,04
RS04405	154,51	131,55	75,49	33,11	RS04630	648,28	637,66	1324,23	129,38
RS04410	288,21	301,23	183,55	7,52	RS04635	31,20	108,11	141,78	29,32
RS04415	364,60	424,29	196,70	11,36	RS04640	33,95	66,67	74,26	36,38
RS04420	157,79	10,36	6,22	65,22	RS04645	66,77	334,78	396,64	79,00
RS04425	140,45	652,93	543,82	134,69	RS04650	116,63	21,76	11,45	21,31
RS04430	32,21	85,44	51,79	51,41	RS04655	63,54	38,53	49,74	31,43
RS04435	13,53	51,75	74,89	5,18	RS04660	14,83	11,21	13,32	2,38
RS04440	597,62	397,13	107,95	5,50	RS04665	411,43	502,95	418,68	11,67
RS04445	12,69	0,22	0,52	1,13	RS04670	210,35	4669,74	4318,52	880,21
RS04450	43,58	47,29	33,03	33,78	RS04675	5,30	3,74	3,94	17,17
RS04455	625,25	34,56	23,97	55,57	RS04680	30,05	1038,36	770,58	224,56
RS04460	1125,99	304,11	204,58	95,87	RS04685	24,59	39,46	23,95	3,53
RS04465	325,79	310,57	293,59	59,00	RS04690	108,55	4628,19	1324,14	44,82
RS04470	298,73	382,07	331,08	75,81	RS04695	334,77	1,45	0,73	2,82
RS04475	191,74	230,09	240,08	34,70	RS04700	68,36	146,05	72,12	12,79
RS04480	93,29	33,17	34,59	24,41	RS04705	87,93	245,80	229,42	41,67
RS04485	1783,15	94,84	70,40	16,96	RS04710	39,85	31,98	25,71	26,18
RS04490	7,30	0,00	0,00	0,00	RS04715	78,02	155,37	35,19	30,51
RS04495	2037,51	0,22	0,12	0,54	RS04720	226,49	290,24	106,81	71,71
RS04500	2552,82	0,74	0,25	1,63	RS04725	205,09	170,24	78,10	61,08
RS04505	42,57	117,64	346,94	254,75	RS04730	244,95	103,27	94,56	219,62
RS04510	20,62	250,54	948,98	366,22	RS04735	286,36	384,20	195,73	88,83
RS04515	27,38	387,27	1545,32	690,21	RS04740	119,02	111,82	42,89	30,17
RS04520	63,69	1772,85	7356,24	792,76	RS04745	58,64	12,98	9,18	9,88
RS04525	45,74	1155,47	5259,55	1263,59	RS04750	75,24	50,26	52,04	1334,37
RS04530	110,07	353,22	303,30	44,75	RS04755	32,50	87,86	73,91	967,31
RS04535	179,69	45,62	52,67	84,86	RS04760	23,62	41,51	85,88	64,59
RS04540	5219,35	12,24	12,19	6,15	RS04765	24,70	52,57	59,45	43,48
RS04545	5562,63	8,77	10,35	6,21	RS04770	135,40	741,29	301,17	74,27
RS04550	118,60	56,57	44,78	14,48	RS04775	24,83	31,70	32,10	27,35
RS04555	371,84	334,13	229,22	69,96	RS04780	22,83	12,06	10,77	7,62

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS04785	207,08	150,19	83,75	18,06	RS05090	236,12	101,98	105,96	91,71
RS04790	44,90	34,30	24,58	20,19	RS05095	320,89	151,49	114,48	116,73
RS04795	268,83	7,81	12,88	6,44	RS05100	17,39	6,73	2,47	4,39
RS04800	257,92	2875,50	5182,35	282,46	RS05105	405,47	221,34	99,03	30,21
RS04805	248,64	108,20	84,43	81,28	RS05110	318,12	252,53	101,77	31,62
RS04810	169,17	39,46	57,79	19,08	RS05115	19,05	22,88	8,88	17,25
RS04815	1,08	0,00	0,00	0,00	RS05120	192,85	585,76	141,22	50,48
RS04900	2,02	0,37	0,75	4,14	RS05125	233,23	36,19	35,38	18,77
RS04905	21,52	79,46	48,49	28,39	RS05130	78,37	8,78	6,76	8,95
RS04910	15,29	89,55	41,65	20,09	RS05135	7,49	0,20	0,39	1,08
RS04915	30,10	115,27	51,71	23,15	RS05140	319,92	164,90	330,57	19,49
RS04920	34,20	22,75	22,96	3,69	RS05145	512,34	314,92	648,35	37,81
RS04925	35,31	5,31	5,62	5,54	RS05150	21,76	3,68	1,92	2,01
RS04930	1591,71	273,78	191,75	36,45	RS05155	25,91	7,66	8,30	9,14
RS04935	1500,99	277,16	161,93	36,72	RS05160	113,27	0,73	0,17	9,63
RS04940	654,18	167,54	95,29	17,14	RS05165	144,58	10,79	10,00	47,20
RS04945	486,31	104,75	65,34	6,94	RS05170	853,88	6,95	4,74	16,74
RS04950	232,00	399,10	273,95	71,52	RS05175	91,01	289,14	292,75	67,03
RS04955	579,44	648,29	476,18	13,07	RS05180	171,64	799,94	691,97	107,94
RS04960	33,82	129,00	90,83	45,92	RS05185	418,93	469,12	334,70	59,54
RS04965	57,52	44,55	75,78	266,28	RS05190	66,92	631,70	615,03	112,01
RS04970	27,89	50,50	140,62	20,86	RS05195	56,25	92,96	50,78	14,87
RS04975	157,30	56,30	203,38	35,60	RS05200	366,54	2753,44	4421,31	108,35
RS04980	228,91	1330,60	2634,67	572,49	RS05205	77,73	103,12	86,94	214,96
RS04985	26,81	5,87	10,81	18,63	RS05210	162,68	337,78	239,75	596,22
RS04990	42,80	63,97	58,04	21,56	RS05215	5,61	0,05	0,05	1,05
RS04995	110,49	261,93	349,92	50,07	RS05220	378,83	317,03	127,83	23,45
RS05000	25,99	226,80	247,20	51,63	RS05225	562,87	284,77	412,09	282,85
RS05005	30,19	71,55	111,32	55,18	RS05230	86,12	84,19	120,03	49,28
RS05010	13,63	9,05	7,44	8,22	RS05235	55,52	70,69	106,50	151,44
RS05015	76,60	78,14	82,34	73,73	RS05240	82,30	89,88	106,79	86,57
RS05020	178,97	139,03	129,00	81,60	RS05245	28,09	3,47	4,19	15,62
RS05025	89,06	204,30	363,10	453,04	RS05250	38,05	3,45	4,37	18,06
RS05030	1214,93	713,69	178,44	90,74	RS05255	287,57	24,98	17,44	22,64
RS05035	531,28	302,61	71,88	59,74	RS05260	171,22	202,15	72,02	17,36
RS05040	177,23	44,18	81,74	61,78	RS05265	34,23	11,91	8,06	9,45
RS05045	17,21	108,23	161,28	48,48	RS05270	84,95	57,17	46,57	17,55
RS05050	1775,59	648,14	124,54	66,04	RS05275	100,95	133,08	104,32	21,54
RS05055	2106,53	244,01	61,36	110,04	RS05280	141,81	157,60	74,84	26,35
RS05060	4569,60	327,46	88,34	125,07	RS05285	49,48	22,14	10,26	12,48
RS05065	78,68	23,24	17,03	18,23	RS05290	37,67	15,64	8,02	8,10
RS05070	107,95	69,14	46,63	32,59	RS05295	27,81	9,16	5,18	7,55
RS05075	10,96	0,73	1,14	14,25	RS05300	88,87	155,31	147,19	45,40
RS05080	27,99	29,18	43,23	18,09	RS05305	42,47	4,65	4,50	4,58
RS05085	346,91	50,02	55,67	82,50	RS05310	78,72	9,47	6,20	8,76

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS05315	167,86	181,44	66,49	8,96	RS05540	2,09	0,40	0,14	0,77
RS05320	121,09	81,68	27,38	4,69	RS05545	55,07	81,39	31,87	15,01
RS05325	127,70	17,65	18,46	17,33	RS05550	281,94	533,98	433,46	31,28
RS05330	1064,92	240,08	300,85	601,84	RS05555	56,22	140,71	268,67	37,58
RS05335	129,37	27,37	20,85	176,06	RS05560	87,45	357,87	812,79	49,82
RS05340	175,28	37,78	26,35	162,26	RS05565	35,14	3,28	5,13	32,58
RS05345	33,12	20,62	16,31	65,91	RS05570	152,01	64,96	46,55	45,88
RS05350	58,52	113,52	77,27	92,78	RS05575	35,08	94,54	70,94	2,82
RS05355	62,13	18,44	14,11	18,50	RS05580	0,68	0,09	0,17	0,37
RS05360	50,87	7,64	3,98	14,03	RS05585	0,85	1,13	1,47	0,44
RS05365	51,62	124,88	113,04	46,58	RS05590	2,18	7,58	8,51	1,85
RS05370	39,61	27,20	50,62	26,50	RS05595	2,78	2,02	1,59	1,21
RS05375	13,25	1,66	1,57	10,85	RS05600	6,58	6,05	7,23	3,15
RS05380	92,45	7,67	5,79	25,09	RS05605	3,54	6,16	4,71	2,33
RS05385	175,38	28,42	15,86	48,51	RS05610	3,10	5,46	4,71	1,92
RS05390	61,39	3,35	1,93	27,34	RS05615	3,66	5,89	5,70	2,49
RS05395	143,05	187,11	290,43	610,10	RS05620	2,31	6,09	4,97	0,97
RS05400	106,87	284,32	328,24	418,64	RS05625	1,54	3,95	3,06	1,01
RS05405	35,43	27,77	50,47	125,57	RS05630	2,97	8,80	7,73	2,66
RS05410	19,84	22,79	27,70	71,70	RS05635	3,78	10,33	9,57	1,00
RS05415	47,74	50,88	69,46	158,32	RS05640	37,04	9,14	4,45	6,25
RS05420	49,22	50,05	72,72	117,49	RS05645	75,09	6,90	3,12	103,90
RS05425	39,95	31,07	44,17	83,02	RS05650	5838,41	938,21	1019,55	1099,74
RS05430	104,15	89,80	100,32	155,21	RS05655	9600,36	1652,96	1641,28	2736,08
RS05435	0,40	0,06	0,42	2,03	RS05660	2944,84	3453,21	9733,07	3379,97
RS05440	0,86	1,32	1,06	1,92	RS05665	3188,79	3800,13	10829,23	3500,63
RS05445	50,12	6,51	4,17	3,09	RS05670	1675,18	1848,78	5769,99	958,33
RS05450	25,88	14,61	10,43	11,75	RS05675	58,76	208,14	125,04	96,66
RS05455	16,68	8,21	5,14	6,97	RS05680	92,37	196,09	78,79	71,32
RS05460	598,43	221,41	621,57	339,78	RS05685	34,79	84,95	41,15	10,62
RS05465	213,72	84,99	144,08	128,23	RS05690	76,82	205,24	87,40	35,73
RS05470	38,45	33,08	61,59	45,00	RS05695	231,12	293,58	152,28	96,39
RS05475	465,78	229,48	220,34	790,43	RS05700	315,30	589,73	302,79	173,19
RS05480	653,97	1016,71	1094,68	813,55	RS05705	508,21	1441,99	611,16	257,93
RS05485	1170,20	2471,13	2273,50	961,14	RS05710	511,97	4,02	2,56	14,88
RS05490	171,58	51,54	55,92	90,58	RS05715	671,85	9,22	5,08	18,34
RS05495	107,73	38,50	40,21	72,99	RS05720	332,75	6,70	4,44	13,13
RS05500	140,33	36,14	34,87	46,18	RS05725	475,76	15,35	7,78	24,68
RS05505	555,26	102,83	100,25	99,71	RS05730	123,89	203,74	174,06	39,17
RS05510	108,43	53,10	57,85	36,19	RS05735	542,60	922,29	690,83	126,04
RS05515	21,59	7,50	7,39	17,47	RS05740	1016,40	64,34	34,21	23,20
RS05520	21,88	17,07	12,42	19,37	RS05745	63,55	10,66	17,07	5,90
RS05525	459,58	739,02	529,56	407,10	RS05750	111,71	51,41	41,79	15,78
RS05530	97,91	0,09	0,08	1,09	RS05755	168,02	589,38	505,37	99,09
RS05535	97,11	6,00	6,37	0,51	RS05760	18,06	15,01	4,60	7,86

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS05765	29,63	24,84	7,00	10,31	RS06000	0,67	0,25	0,48	1,91
RS05770	118,67	52,96	18,21	44,54	RS06005	121,03	141,81	55,13	36,74
RS05775	158,09	154,00	130,78	45,29	RS06010	92,49	99,24	51,22	16,90
RS05780	152,13	346,39	260,29	65,70	RS06015	481,52	379,98	577,44	98,04
RS05785	271,21	131,92	57,23	100,82	RS06020	354,67	501,37	785,08	102,99
RS05790	145,35	122,32	73,49	12,43	RS06025	534,06	905,52	1156,97	111,98
RS05795	123,76	67,59	41,06	12,36	RS06030	51,39	29,26	51,90	10,78
RS05800	16,18	10,28	29,88	65,84	RS06035	132,61	195,79	69,20	48,27
RS05805	13,51	16,10	40,29	76,17	RS06040	238,21	147,34	49,29	20,20
RS05810	15,14	22,71	83,32	40,28	RS06045	58,39	14,85	18,54	4,80
RS05815	26,36	28,04	7,54	10,98	RS06050	318,49	2545,44	1398,23	191,85
RS05820	18,55	10,41	2,72	12,37	RS06055	106,15	748,12	617,22	199,84
RS05825	188,21	492,42	395,75	110,21	RS06060	158,78	3,05	0,73	7,35
RS05830	489,02	439,26	460,71	323,11	RS06065	338,32	200,39	186,00	125,96
RS05835	26,18	8,96	9,53	10,61	RS06070	469,85	349,37	319,87	136,38
RS05840	6,51	7,41	9,11	7,15	RS06075	476,28	95,50	84,90	41,08
RS05855	376,73	126,04	73,76	22,17	RS06080	435,55	188,09	140,16	44,93
RS05860	4702,65	5549,32	4534,53	496,31	RS06085	181,74	133,57	81,62	70,83
RS05865	57,81	69,56	57,80	97,39	RS06090	184,09	115,21	63,22	70,17
RS05870	11,97	19,80	6,20	54,73	RS06095	115,07	20,53	15,48	29,75
RS05875	5,68	16,46	3,96	44,07	RS06100	11,93	2,07	1,82	0,33
RS05880	9,91	35,31	7,91	55,96	RS06105	75,76	13,93	11,99	4,55
RS05885	7,23	36,86	10,27	41,30	RS06110	382,31	3179,51	1972,12	294,86
RS05890	6,73	45,27	11,37	30,08	RS06115	348,51	3440,30	1798,64	252,03
RS05895	632,35	14,77	5,89	10,90	RS06120	68,19	43,14	32,85	40,90
RS05900	1030,00	115,95	47,72	34,34	RS06125	134,72	63,89	37,01	44,18
RS05905	1949,70	91,42	53,19	62,41	RS06130	207,22	57,88	30,55	52,34
RS05910	17,73	1,97	0,75	3,04	RS06135	72,02	13,31	17,41	18,06
RS05915	34,74	5,75	2,32	8,67	RS06140	44,99	215,45	260,19	32,71
RS05920	4606,73	299,52	115,22	20,09	RS06145	208,81	573,61	407,19	49,19
RS05925	581,22	163,61	72,29	14,04	RS06150	451,09	1347,84	1027,35	95,39
RS05930	140,59	10,10	5,34	4,87	RS06155	249,24	542,42	342,91	48,60
RS05935	41,76	2,72	2,43	1,06	RS06160	463,67	696,03	474,93	31,50
RS05940	142,31	84,14	41,53	20,42	RS06165	650,54	1051,29	624,05	46,82
RS05945	792,26	1228,68	1090,01	626,81	RS06170	757,25	1267,77	670,96	57,70
RS05950	96,25	32,16	27,35	0,89	RS06175	1645,45	1994,64	1112,69	70,63
RS05955	36,34	19,28	23,07	29,42	RS06180	3,05	0,38	0,29	50,06
RS05960	306,13	10,15	4,65	2,70	RS06185	3,19	6,52	4,18	32,78
RS05965	513,64	3013,95	6385,23	1055,85	RS06190	6,85	17,90	14,11	43,19
RS05970	3,13	1,88	2,20	4,21	RS06195	6,88	22,66	14,13	38,77
RS05975	1,81	0,25	0,19	1,70	RS06200	5,10	23,31	14,46	37,62
RS05980	0,99	0,08	0,14	0,92	RS06205	13,79	62,26	35,51	49,57
RS05985	0,90	0,17	0,00	0,51	RS06210	23,49	93,85	40,71	48,07
RS05990	1,18	0,67	0,19	1,21	RS06215	56,88	682,64	641,00	32,85
RS05995	0,85	0,17	0,24	0,90	RS06220	33,84	42,08	50,06	0,88

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS06225	55,91	147,63	36,95	17,67	RS06450	14,96	3,92	1,97	0,98
RS06230	1,84	0,98	0,53	8,97	RS06455	350,99	115,61	103,21	105,75
RS06235	117,84	650,26	802,90	110,75	RS06460	907,65	1292,67	504,07	43,54
RS06240	127,90	239,13	528,02	379,21	RS06465	97,64	24,86	25,58	5,28
RS06245	17,88	1,22	0,58	11,89	RS06470	447,75	407,29	218,68	237,85
RS06250	3042,40	3107,44	4372,23	482,94	RS06475	144,02	4,14	1,09	15,72
RS06255	17,45	35,96	27,08	24,04	RS06480	84,83	31,23	24,03	23,63
RS06260	348,08	860,15	1133,68	93,59	RS06485	47,47	0,22	0,04	2,53
RS06265	70,21	15,35	28,29	128,16	RS06490	615,65	1354,21	821,19	90,25
RS06270	95,73	103,70	76,25	118,39	RS06495	52,32	60,64	43,21	30,77
RS06275	152,41	196,38	137,56	164,25	RS06500	54,99	106,96	96,25	35,16
RS06280	13,98	19,19	10,29	27,60	RS06505	69,12	188,51	174,00	36,69
RS06285	101,06	112,90	19,58	11,89	RS06510	45,23	107,85	79,98	48,91
RS06290	65,59	31,32	35,14	22,22	RS06515	28,26	88,71	78,82	36,79
RS06295	674,51	338,39	381,36	157,36	RS06520	21,04	46,73	41,05	23,94
RS06300	76,25	147,56	174,55	143,65	RS06525	81,81	213,69	368,34	360,47
RS06305	18,22	8,09	2,52	4,83	RS06530	83,47	302,84	640,90	367,70
RS06310	836,00	67,88	12,86	29,24	RS06535	108,96	202,24	442,40	87,99
RS06315	24,57	19,61	23,94	14,08	RS06540	12,59	12,79	35,05	39,34
RS06320	40,05	79,18	77,56	19,21	RS06545	378,02	766,92	480,42	55,41
RS06325	65,65	116,08	121,07	25,70	RS06550	89,76	79,46	52,56	32,50
RS06330	33,20	84,54	113,62	9,92	RS06555	174,33	5,43	2,81	18,43
RS06335	8,51	7,83	11,49	8,27	RS06560	357,62	1613,09	1306,94	389,38
RS06340	10,99	7,83	15,75	10,20	RS06565	204,27	304,23	218,01	358,20
RS06345	4,88	2,16	2,76	4,48	RS06570	213,78	543,62	336,16	260,36
RS06350	311,08	444,40	282,14	23,45	RS06575	269,17	736,31	452,62	287,39
RS06355	359,49	421,41	229,09	70,00	RS06580	436,97	1439,71	869,41	475,92
RS06360	29,88	17,82	17,34	10,24	RS06585	41,23	6,50	3,65	2,22
RS06365	58,14	30,43	32,59	20,05	RS06590	1098,21	274,57	404,87	202,72
RS06370	54,54	428,71	435,53	33,28	RS06595	93,22	345,16	113,24	31,56
RS06375	50,72	395,12	378,18	21,00	RS06600	38,81	24,48	23,19	72,95
RS06380	1227,76	980,15	522,99	179,70	RS06605	59,31	247,81	229,23	17,02
RS06385	16,00	31,08	16,47	20,14	RS06610	101,05	50,21	30,28	87,58
RS06390	176,76	1103,55	330,92	74,97	RS06615	63,45	43,62	21,80	37,01
RS06395	153,18	405,77	224,65	174,55	RS06620	204,48	107,31	51,81	118,45
RS06400	128,80	84,85	42,91	94,04	RS06625	694,27	28,88	27,47	87,27
RS06405	123,79	93,05	44,16	73,42	RS06630	366,59	39,10	34,83	111,55
RS06410	7,78	0,47	0,29	2,87	RS06635	433,63	71,32	46,43	126,14
RS06415	9,94	1,43	1,61	4,20	RS06640	358,93	158,87	328,75	40,79
RS06420	15,36	0,96	0,73	10,18	RS06645	377,09	257,69	432,31	47,10
RS06425	5,79	1,90	1,50	11,74	RS06650	119,28	46,44	35,54	20,33
RS06430	7,63	2,96	2,54	16,62	RS06655	217,07	74,71	61,42	17,46
RS06435	10,22	3,14	3,29	13,25	RS06660	287,33	233,59	185,64	25,37
RS06440	108,90	125,18	28,89	16,72	RS06665	76,57	42,80	36,13	9,08
RS06445	2,67	2,52	1,31	0,94	RS06670	139,50	24,74	19,49	30,11

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS06675	221,60	70,11	60,77	29,50	RS06900	253,80	2,79	0,86	1,05
RS06680	396,27	422,10	427,01	32,10	RS06905	45,62	276,37	240,81	20,74
RS06685	30,73	27,48	41,03	10,21	RS06910	139,86	482,73	314,86	18,84
RS06690	414,28	496,55	884,98	1927,98	RS06915	235,38	209,38	155,53	29,64
RS06695	528,23	397,59	255,53	217,21	RS06920	320,14	217,97	151,16	4645,59
RS06700	36,50	6,14	7,97	41,34	RS06925	94,41	9,48	7,86	30,12
RS06705	207,47	1642,19	1131,39	43,53	RS06930	106,83	416,21	667,46	96,60
RS06710	212,66	9,07	7,80	9,44	RS06935	121,65	160,15	152,01	88,14
RS06715	177,20	27,09	23,54	18,58	RS06940	169,76	306,81	220,02	90,55
RS06720	363,64	215,70	264,94	30,05	RS06945	36,97	27,46	11,35	39,54
RS06725	965,78	424,93	485,59	59,99	RS06950	303,99	611,46	658,09	76,68
RS06730	35,29	14,94	19,15	2,16	RS06955	23,07	67,55	74,51	93,99
RS06735	31,23	5,77	3,19	3,67	RS06960	112,85	104,78	184,59	127,69
RS06740	32,69	10,76	5,54	3,79	RS06965	192,73	236,80	285,67	169,39
RS06745	187,63	60,60	44,64	11,96	RS06970	105,54	15,38	21,85	369,39
RS06750	215,56	76,33	32,36	6,67	RS06975	1345,61	28,76	32,79	210,75
RS06755	239,24	308,60	131,28	16,98	RS06980	2,68	0,10	0,00	0,13
RS06760	48,92	10,70	13,47	5,70	RS06985	7,02	53,69	16,96	0,84
RS06765	350,31	423,05	685,21	179,18	RS06990	23,39	272,05	77,77	3,76
RS06770	373,42	637,90	670,84	234,36	RS06995	7,54	0,77	0,60	1,24
RS06775	239,89	357,50	605,47	138,95	RS07000	11,48	0,59	0,54	2,98
RS06780	77,66	112,78	128,12	67,09	RS07005	507,69	1017,25	283,60	9,50
RS06785	99,66	163,84	194,27	68,00	RS07010	309,22	889,61	244,16	6,50
RS06790	12,19	5,69	1,55	2,86	RS07015	488,21	1926,01	496,79	7,98
RS06795	32,12	16,17	4,26	6,26	RS07020	2714,48	2373,85	987,74	237,61
RS06800	108,21	574,66	161,56	77,52	RS07025	1515,50	743,57	318,89	220,94
RS06805	98,18	384,00	170,17	19,68	RS07030	41,38	0,79	0,67	187,37
RS06810	38,01	37,60	27,15	2,47	RS07035	766,10	908,62	2363,79	1632,99
RS06815	15,15	23,58	20,15	1,41	RS07040	41,47	5,87	3,24	544,72
RS06820	6,32	10,71	5,92	11,39	RS07045	56,22	4,97	2,84	450,60
RS06825	19,69	29,37	22,96	17,12	RS07050	24,78	147,60	203,75	7,28
RS06830	27,86	24,92	28,11	18,81	RS07055	473,52	291,32	518,01	158,51
RS06835	123,45	74,31	60,77	20,17	RS07060	137,83	16,67	34,27	41,04
RS06840	433,19	406,39	344,95	247,37	RS07065	12,15	4,98	7,35	16,38
RS06845	365,22	375,68	249,47	306,97	RS07070	7,12	12,18	17,89	10,71
RS06850	392,33	550,48	429,33	338,43	RS07075	8,39	15,82	5,39	13,09
RS06855	30,17	63,06	21,33	12,10	RS07080	40,42	56,44	64,20	118,41
RS06860	36,70	19,43	26,39	29,74	RS07085	58,55	46,70	23,58	27,25
RS06865	291,29	40,92	43,87	41,95	RS07090	100,19	77,97	38,65	24,71
RS06870	67,00	7,42	0,53	7,05	RS07095	238,95	170,58	138,34	49,26
RS06875	86,46	10,34	1,56	14,30	RS07100	13,49	16,87	56,13	9,24
RS06880	184,53	69,92	46,01	9,23	RS07105	215,63	42,57	52,48	16,09
RS06885	37,56	721,45	603,41	43,83	RS07110	192,29	129,86	85,91	72,24
RS06890	5,78	1,20	0,00	2,69	RS07115	173,81	253,98	176,51	158,93
RS06895	21,77	80,23	19,55	27,33	RS07120	83,04	20,37	15,63	60,20

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS07125	106,66	286,87	145,07	22,86	RS07355	65,73	284,63	143,98	44,84
RS07130	65,83	30,69	30,26	518,88	RS07360	342,54	1026,18	966,23	88,72
RS07135	108,17	116,79	105,54	82,89	RS07365	60,28	143,37	163,97	52,82
RS07140	172,08	43,89	28,88	3,12	RS07370	13,99	3,78	6,29	10,68
RS07145	208,10	462,26	457,88	230,02	RS07375	231,01	100,33	126,98	193,88
RS07150	39,85	0,57	0,60	53,05	RS07380	43,18	1,47	0,99	12,26
RS07155	13,35	1,22	1,10	6,69	RS07385	280,42	1153,60	732,89	112,92
RS07160	27,48	9,50	10,61	21,96	RS07390	93,67	333,00	235,86	25,82
RS07165	32,62	106,17	157,43	28,08	RS07395	175,82	13,12	10,78	9,39
RS07170	17,23	2,93	2,78	4,99	RS07400	44,33	3,07	2,28	3,23
RS07175	8,99	1,47	1,03	1,29	RS07405	73,36	1,13	0,46	2,76
RS07180	20,71	2,56	1,79	2,25	RS07410	3,10	5,42	3,52	8,23
RS07185	11,05	9,97	9,53	21,23	RS07415	6,12	8,37	3,83	9,50
RS07190	6,30	8,03	5,35	17,24	RS07420	6,06	15,55	8,19	7,29
RS07195	1,53	6,69	4,32	10,12	RS07425	4,96	20,19	14,18	7,35
RS07200	25,28	29,64	60,95	26,35	RS07430	9,09	41,79	24,56	12,12
RS07205	17,16	6,64	10,11	15,62	RS07435	35,79	2,41	1,16	8,58
RS07210	22,40	5,14	3,02	7,31	RS07440	13,39	1,12	0,68	4,50
RS07215	10,47	1,23	0,62	1,99	RS07445	54,68	2,97	1,68	5,86
RS07220	28,98	5,70	4,90	4,87	RS07450	47,41	10,23	14,61	5,27
RS07225	41,84	27,45	19,19	6,97	RS07455	10,00	1,40	1,96	1,09
RS07230	57,11	27,15	20,69	13,31	RS07460	169,67	6,42	3,61	13,29
RS07235	90,19	103,52	50,22	19,32	RS07465	169,25	162,96	204,56	29,64
RS07240	10,87	3,18	1,26	12,05	RS07470	27,32	0,42	0,49	5,45
RS07245	8,31	2,37	1,46	7,15	RS07475	13,94	0,33	0,06	5,90
RS07250	5,77	1,97	1,24	7,46	RS07480	9,34	34,34	30,11	9,67
RS07255	71,60	12,89	14,74	423,73	RS07485	296,95	3133,81	1037,07	147,22
RS07260	3,02	0,64	0,37	271,91	RS07490	75,81	405,76	220,42	122,52
RS07265	7,25	7,75	2,29	282,09	RS07495	103,42	260,90	131,98	109,55
RS07270	28,57	17,35	57,80	391,56	RS07500	84,42	225,60	138,05	76,76
RS07280	746,04	396,46	394,98	39,71	RS07505	15,97	40,95	20,84	12,29
RS07285	2703,25	1972,71	5086,29	1987,19	RS07510	158,21	329,72	175,04	100,95
RS07290	165,42	241,35	405,73	253,22	RS07515	160,95	390,79	150,78	91,38
RS07295	131,21	239,03	228,01	60,09	RS07520	924,65	869,64	335,15	89,83
RS07300	39,86	26,43	16,05	26,00	RS07525	34,90	45,27	26,67	11,11
RS07305	173,45	35,13	16,03	83,81	RS07530	6,58	1,09	0,72	0,11
RS07310	96,29	100,53	93,76	103,54	RS07535	2,46	2,73	2,22	5,13
RS07315	181,39	408,47	232,54	246,49	RS07540	2,77	0,66	0,44	0,33
RS07320	11,01	14,45	12,93	38,61	RS07545	12,18	0,12	0,20	0,97
RS07325	374,29	51,81	36,03	50,17	RS07550	460,27	85,82	18,09	6,99
RS07330	36,07	3,49	2,50	7,61	RS07555	345,81	111,82	31,56	5,70
RS07335	245,73	282,61	290,01	53,72	RS07560	426,47	83,33	62,87	237,91
RS07340	19,78	109,57	87,30	18,38	RS07565	8,82	2,01	2,15	31,32
RS07345	10,14	3,09	2,43	1,77	RS07570	23,22	3,11	3,73	77,41
RS07350	30,14	108,10	78,62	25,39	RS07575	23,84	1,78	1,86	49,28

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS07580	26,30	2,13	2,69	32,37	RS07805	8,14	1,30	3,83	5,26
RS07585	45,37	0,82	5,09	8,54	RS07810	17,29	1,79	0,57	1,06
RS07590	37,43	2,16	0,79	1,16	RS07815	14,13	1,60	0,70	2,59
RS07595	145,78	165,77	108,00	27,87	RS07820	6,73	2,09	2,08	2,44
RS07600	149,09	264,61	161,94	30,25	RS07825	18,99	5,77	5,35	4,42
RS07605	8,53	5,24	3,23	51,19	RS07830	10,19	3,77	3,64	2,99
RS07610	7,25	6,45	3,26	57,89	RS07835	7,09	6,58	8,80	3,62
RS07615	1,04	0,09	0,21	6,96	RS07840	60,15	133,73	52,47	27,45
RS07620	6,94	5,05	2,51	57,18	RS07845	3,29	0,51	0,47	0,40
RS07625	8,30	6,99	2,81	69,17	RS07850	327,21	11,65	10,03	19,19
RS07630	899,32	15795,24	5210,08	609,16	RS07855	10,70	47,27	41,90	6,55
RS07635	8,64	44,49	11,17	11,92	RS07860	13,96	62,29	59,89	14,34
RS07640	85,40	27,27	42,80	22,99	RS07865	21,37	125,19	111,76	16,33
RS07645	74,64	44,34	48,32	23,65	RS07870	1,65	0,12	0,36	26,87
RS07650	124,15	56,22	55,01	23,93	RS07875	141,74	204,20	98,98	12,60
RS07655	1120,98	1009,87	1172,87	422,48	RS07880	212,70	1121,93	913,57	121,51
RS07660	48,70	45,24	29,49	59,61	RS07885	33,87	38,64	42,39	26,05
RS07665	283,32	10,03	7,16	100,55	RS07890	50,18	25,38	28,09	31,24
RS07670	112,40	65,80	48,02	31,46	RS07895	89,25	2086,96	654,24	57,94
RS07675	164,17	505,30	198,60	36,97	RS07900	152,98	506,01	685,58	145,77
RS07680	1034,90	2139,71	813,29	86,71	RS07905	1,00	0,00	0,10	0,00
RS07685	282,63	725,39	257,87	32,08	RS07910	0,77	0,23	0,38	0,11
RS07690	894,36	2982,42	1216,69	118,50	RS07920	229,49	5,00	2,58	5,68
RS07695	183,25	805,25	434,29	86,47	RS07925	186,05	72,47	87,10	66,33
RS07700	129,09	349,16	223,44	58,57	RS07930	214,53	138,37	185,14	72,45
RS07705	78,75	215,55	123,75	33,71	RS07935	264,70	130,11	317,16	153,77
RS07710	245,15	774,32	352,42	91,06	RS07940	4112,43	1393,93	466,10	43,60
RS07715	222,68	284,30	96,73	56,79	RS07945	84,73	47,94	42,99	78,94
RS07720	66,64	56,23	51,04	23,99	RS07950	2,78	5,97	2,60	2,32
RS07725	74,34	29,58	24,13	215,35	RS07960	3,00	0,09	0,00	0,65
RS07730	68,84	17,65	9,88	6,75	RS07965	5,27	0,11	0,05	0,56
RS07735	6,35	1,25	0,79	4,12	RS07970	11,57	0,24	0,22	7,65
RS07740	5,69	1,62	1,62	2,89	RS07975	5,89	0,20	0,25	15,32
RS07745	44,62	22,20	15,49	27,64	RS07980	5,41	0,21	0,13	24,42
RS07750	2,49	0,37	0,19	7,22	RS07985	17,51	1,33	1,16	32,39
RS07755	61,43	172,38	61,91	14,14	RS07990	56,43	3,54	2,83	26,63
RS07760	56,05	16,05	8,74	47,10	RS07995	17,44	23,65	20,92	58,59
RS07765	17,58	124,12	18,38	8,30	RS08005	35,50	90,77	159,93	55,20
RS07770	13,05	95,93	15,45	5,83	RS08010	46,10	46,72	64,40	137,86
RS07775	203,10	1,02	0,35	6,21	RS08015	47,86	40,02	48,81	153,12
RS07780	46,90	11,11	7,60	34,76	RS08020	52,14	51,05	55,31	149,43
RS07785	77,87	11,41	5,14	41,33	RS08025	1,27	1,29	2,98	7,26
RS07790	20,11	1,18	0,48	3,69	RS08030	47,46	72,43	142,31	146,71
RS07795	51,30	155,92	466,22	74,69	RS08035	24,56	64,53	115,37	117,39
RS07800	9547,03	3,84	2,73	14,77	RS08040	30,72	68,40	149,68	103,94

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS08045	20,93	18,82	48,52	61,33	RS08275	21,89	3,42	7,37	3,08
RS08050	10,69	9,35	23,84	33,91	RS08280	25,88	6,97	14,92	2,65
RS08055	12,40	10,37	31,15	34,14	RS08290	24,05	8,38	20,09	3,16
RS08060	9,63	7,80	20,89	17,78	RS08295	13,32	4,16	11,05	1,62
RS08065	12,37	5,05	8,26	10,35	RS08300	22,13	1,48	1,73	1,08
RS08070	8,23	1,40	2,49	16,29	RS08305	36,24	18,54	37,35	2,62
RS08075	15,98	15,69	4,48	145,94	RS08310	24,45	5,79	11,89	10,98
RS08080	38,44	38,70	28,59	6,56	RS08315	17,16	4,36	8,38	6,91
RS08085	134,41	576,01	325,04	30,45	RS08320	11,02	2,33	4,20	3,10
RS08090	0,77	0,09	0,22	2,30	RS08325	20,06	3,50	7,40	7,47
RS08095	27,00	2,73	2,32	9,70	RS08330	14,84	3,45	7,46	3,73
RS08100	10,88	0,21	0,13	0,79	RS08335	11,75	3,77	5,05	3,08
RS08110	16,80	20,88	36,50	4,87	RS08340	12,11	1,85	3,86	4,62
RS08115	7,22	3,64	8,16	2,94	RS08345	9,03	2,27	2,86	1,26
RS08120	4,88	1,93	0,71	2,36	RS08350	9,41	0,93	1,23	2,96
RS08125	161,23	181,63	157,77	36,19	RS08360	84,56	99,97	86,10	29,44
RS08130	646,26	778,43	719,08	279,43	RS08365	58,01	62,07	68,72	35,32
RS08135	15,24	12,12	4,78	6,73	RS08370	61,50	127,50	148,33	68,60
RS08140	9,93	10,97	3,07	7,72	RS08375	33,44	67,96	65,63	52,17
RS08145	198,98	87,71	108,22	20,72	RS08380	19,14	41,34	36,27	20,60
RS08150	94,07	86,16	83,73	10,72	RS08385	5,45	9,28	14,72	6,09
RS08155	127,00	94,24	76,85	8,15	RS08390	1,06	0,52	0,54	0,94
RS08160	75,95	64,53	42,72	4,26	RS08395	87,06	201,57	200,85	40,83
RS08165	18,55	1,31	2,47	4,07	RS08400	162,03	28,75	18,14	74,10
RS08170	18,62	6,23	10,87	9,44	RS08405	6,22	4,90	8,86	3,61
RS08175	14,00	22,87	23,62	2,93	RS08415	0,00	0,00	0,08	1,36
RS08180	28,81	5,02	5,89	44,05	RS08420	0,96	0,50	0,36	1,52
RS08185	10,64	23,78	21,45	6,83	RS08425	31,73	87,26	110,00	18,80
RS08190	5,87	17,46	22,99	4,97	RS08430	4,43	3,60	4,33	5,75
RS08195	7,44	11,14	15,29	7,10	RS08435	7,04	7,07	4,29	12,60
RS08200	15,87	14,88	12,93	10,91	RS08440	11,32	9,10	3,97	15,08
RS08205	14,43	16,26	17,15	5,41	RS08445	5,83	4,03	11,80	9,86
RS08210	13,24	8,37	8,56	3,71	RS08450	37,82	70,19	92,37	22,43
RS08215	5,74	0,29	0,00	0,05	RS08455	12,73	0,58	0,74	2,83
RS08220	6,82	4,22	2,32	8,91	RS08460	29,66	1,57	0,99	4,81
RS08225	2,18	0,05	0,13	0,86	RS08465	41,72	26,42	36,39	10,84
RS08230	6,88	3,03	3,47	10,89	RS08470	11,59	3,86	2,60	1,38
RS08235	21,34	26,34	14,69	3,50	RS08475	11,17	2,69	1,94	0,99
RS08240	147,78	88,24	83,37	22,62	RS08480	15,81	6,44	8,50	3,49
RS08245	98,23	82,54	148,43	11,11	RS08485	2,19	2,94	3,83	4,27
RS08250	147,20	274,89	489,71	30,84	RS08490	147,60	113,36	114,07	28,60
RS08255	162,34	269,42	405,42	41,10	RS08495	2,27	3,79	2,02	2,96
RS08260	6,27	0,18	0,36	1,94	RS08500	26,05	78,49	53,05	15,49
RS08265	22,61	12,76	29,70	3,09	RS08505	38,75	47,72	31,43	47,25
RS08270	12,76	5,62	10,55	1,17	RS08510	49,86	145,35	88,78	87,56

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
<i>RS08515</i>	37,05	130,82	73,49	57,96	<i>RS08760</i>	17,47	4,99	3,43	36,11
<i>RS08520</i>	54,33	283,07	193,05	87,84	<i>RS08765</i>	84,32	23,60	23,65	17,00
<i>RS08525</i>	46,57	313,13	218,57	75,03	<i>RS08770</i>	86,96	26,97	37,59	28,88
<i>RS08530</i>	2,17	1,22	1,27	8,13	<i>RS08775</i>	10,60	0,85	0,73	3,69
<i>RS08535</i>	2,19	4,73	4,02	14,54	<i>RS08780</i>	8,61	0,16	0,11	1,03
<i>RS08540</i>	160,97	59,36	45,73	62,30	<i>RS08785</i>	13,91	0,20	0,14	1,61
<i>RS08545</i>	203,40	34,82	32,96	109,12	<i>RS08790</i>	129,66	567,08	745,50	83,58
<i>RS08550</i>	13,82	19,59	8,89	40,96	<i>RS08795</i>	12,94	2,24	1,08	2,70
<i>RS08555</i>	33,25	29,41	20,36	153,14	<i>RS08800</i>	15,39	2,11	0,78	1,84
<i>RS08560</i>	12,87	31,70	95,49	107,10	<i>RS08805</i>	9,55	0,11	0,19	1,20
<i>RS08565</i>	11,18	36,18	74,73	75,12	<i>RS08810</i>	26,96	76,15	39,11	15,93
<i>RS08570</i>	26,82	90,32	64,23	15,67	<i>RS08815</i>	21,35	81,69	45,20	18,61
<i>RS08575</i>	6,41	0,61	0,69	2,40	<i>RS08820</i>	23,55	2,83	2,71	5,01
<i>RS08580</i>	3,49	0,87	1,17	2,26	<i>RS08825</i>	72,25	7,14	7,75	17,08
<i>RS08585</i>	9,31	18,11	57,83	60,62	<i>RS08830</i>	178,83	27,61	30,22	43,37
<i>RS08590</i>	10,77	14,94	23,84	2,26	<i>RS08835</i>	185,39	30,61	34,45	36,90
<i>RS08595</i>	12,44	10,12	7,28	11,26	<i>RS08840</i>	28,78	1,50	2,00	0,80
<i>RS08600</i>	17,64	69,30	109,99	11,02	<i>RS08850</i>	228,77	4,00	3,21	10,42
<i>RS08605</i>	2,76	16,50	19,85	3,50	<i>RS08855</i>	106,90	0,40	0,54	1,80
<i>RS08610</i>	68,10	13,97	7,81	19,70	<i>RS08860</i>	16,35	221,48	99,26	57,74
<i>RS08615</i>	64,93	10,29	7,91	29,17	<i>RS08865</i>	57,60	3,22	2,40	1,02
<i>RS08620</i>	24,02	1,28	1,15	3,49	<i>RS08870</i>	15,43	0,13	0,09	0,00
<i>RS08625</i>	10,93	0,40	0,38	0,31	<i>RS08880</i>	33,50	3,56	1,69	1,11
<i>RS08635</i>	24,59	11,75	6,85	23,02	<i>RS08885</i>	10,18	1,06	0,31	0,00
<i>RS08640</i>	22,83	19,33	18,90	1,87	<i>RS08890</i>	15,80	17,49	11,06	61,03
<i>RS08645</i>	0,55	0,12	0,08	0,18	<i>RS08895</i>	15,39	15,90	8,74	52,44
<i>RS08650</i>	0,50	0,00	0,06	0,19	<i>RS08900</i>	28,95	25,78	20,22	67,21
<i>RS08660</i>	6,24	50,07	12,28	3,87	<i>RS08905</i>	3,11	1,15	0,31	2,39
<i>RS08665</i>	169,46	417,51	110,78	14,13	<i>RS08915</i>	32,01	284,60	114,78	3,98
<i>RS08670</i>	44,97	3,54	2,65	17,80	<i>RS08920</i>	16,44	1,52	2,10	5,30
<i>RS08675</i>	105,56	148,24	51,73	8,02	<i>RS08925</i>	25,36	5,68	5,78	12,61
<i>RS08680</i>	47,66	83,91	95,93	55,51	<i>RS08930</i>	4,87	1,20	2,51	2,02
<i>RS08685</i>	159,71	532,15	218,42	17,89	<i>RS08935</i>	5,69	3,29	3,16	1,71
<i>RS08690</i>	3,56	11,50	42,81	6,89	<i>RS08940</i>	8,32	7,89	4,58	3,35
<i>RS08695</i>	9,18	6,70	5,44	5,50	<i>RS08945</i>	6,56	8,37	7,65	1,91
<i>RS08700</i>	462,55	23,10	44,96	42,17	<i>RS08950</i>	18,32	29,73	24,46	5,98
<i>RS08705</i>	17,70	0,54	1,48	1,77	<i>RS08955</i>	99,32	456,62	158,06	5,71
<i>RS08710</i>	1,95	1,57	1,34	3,30	<i>RS08960</i>	42,26	145,45	61,42	2,80
<i>RS08720</i>	2,99	3,52	2,78	2,62	<i>RS08965</i>	4,73	3,31	0,84	2,22
<i>RS08725</i>	14,15	3,34	4,17	9,89	<i>RS08970</i>	4,25	132,55	408,69	168,65
<i>RS08730</i>	14,06	2,72	3,48	8,87	<i>RS08975</i>	44,01	339,02	304,32	91,73
<i>RS08735</i>	13,75	5,80	7,88	16,48	<i>RS08980</i>	9,26	61,96	59,67	52,69
<i>RS08740</i>	6,56	4,73	8,69	8,32	<i>RS08985</i>	14,31	102,15	90,99	61,69
<i>RS08750</i>	25,52	50,12	25,37	128,93	<i>RS08990</i>	49,67	1,41	1,16	1,80
<i>RS08755</i>	29,61	47,94	20,96	176,06	<i>RS08995</i>	11,05	153,38	400,58	23,40

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS09000	20,49	3,60	3,06	2,04	RS09230	27,86	8,25	8,70	19,72
RS09005	16,32	0,64	0,23	1,15	RS09235	10,72	3,67	7,01	6,07
RS09010	10,02	1,12	0,69	2,21	RS09240	8,40	0,55	0,19	1,54
RS09015	158,57	236,59	177,16	68,47	RS09245	18,64	2,48	2,46	3,47
RS09020	202,34	742,51	576,16	81,63	RS09250	23,64	0,65	0,32	1,51
RS09025	6,71	1,09	1,02	4,92	RS09255	113,67	426,59	272,64	20,02
RS09030	6,72	1,89	2,30	5,48	RS09260	13,37	78,08	61,89	4,61
RS09035	57,72	122,99	114,62	68,39	RS09265	23,01	136,15	99,51	5,21
RS09040	8,08	64,67	100,96	87,82	RS09270	2,79	1,45	1,22	0,65
RS09045	17,37	21,22	10,54	9,14	RS09275	6,33	9,24	6,49	3,35
RS09050	13,86	53,81	99,32	144,76	RS09280	158,88	580,56	304,75	127,34
RS09055	33,46	54,64	52,68	194,60	RS09285	82,25	12,40	11,07	5,88
RS09060	7,02	0,24	0,00	0,24	RS09290	173,49	775,39	686,72	126,61
RS09065	81,96	3,08	5,77	5,45	RS09295	47,42	5,99	8,75	3,72
RS09070	51,61	10,14	8,75	6,36	RS09300	147,97	91,07	80,55	41,73
RS09075	119,39	19,19	19,79	21,05	RS09310	5,16	17,12	13,35	4,43
RS09080	167,28	77,06	62,06	47,56	RS09315	76,76	49,98	58,73	29,95
RS09085	7,56	8,21	7,36	13,75	RS09320	81,07	82,42	87,94	38,38
RS09090	53,44	74,21	48,90	23,84	RS09325	92,49	108,03	114,03	28,75
RS09095	2,71	0,73	0,95	1,77	RS09330	47,66	4,62	2,65	9,43
RS09100	77,34	96,36	27,82	16,31	RS09335	81,84	0,62	0,58	1,82
RS09105	5,64	1,87	1,13	0,98	RS09340	3,29	0,38	0,21	1,87
RS09110	1,71	0,17	0,23	2,48	RS09345	10,94	1,12	0,77	11,10
RS09115	3,34	0,85	0,50	1,59	RS09350	19,22	1,83	0,60	16,46
RS09120	2,29	0,67	0,59	0,54	RS09355	20,61	87,88	77,97	5,33
RS09125	2,46	3,20	4,14	1,40	RS09360	41,99	324,64	248,27	11,85
RS09130	2,95	1,16	2,86	3,31	RS09370	11,21	20,97	17,75	3,15
RS09135	42,53	11,64	7,20	40,94	RS09375	9,68	94,36	116,66	5,43
RS09145	19,02	113,81	45,64	147,89	RS09380	3,36	1,15	0,61	0,71
RS09150	11,29	21,66	6,08	18,12	RS09385	3,91	0,00	0,27	0,00
RS09155	250,41	322,10	286,43	248,52	RS09395	4,71	3,78	1,99	0,93
RS09160	336,89	437,86	461,60	336,88	RS09400	5,90	53,01	19,42	14,02
RS09165	149,92	318,86	254,43	118,25	RS09405	14,62	2,36	3,18	7,70
RS09170	117,71	307,85	253,69	96,56	RS09410	17,31	2,03	0,97	10,07
RS09175	42,40	4,88	4,56	2,31	RS09415	25,27	4,81	2,91	22,21
RS09180	12,24	1,99	2,00	4,74	RS09420	90,78	3,98	4,65	2,65
RS09185	6,81	2,04	2,41	10,28	RS09425	2,25	0,07	0,08	0,23
RS09190	11,95	3,21	2,49	15,64	RS09430	24,00	113,66	101,26	14,79
RS09195	17,15	10,98	6,07	10,32	RS09435	62,02	474,66	342,23	140,80
RS09200	6,11	2,15	0,52	2,82	RS09440	3,33	5,26	6,89	1,99
RS09205	19,09	53,25	39,74	23,17	RS09445	3,80	0,99	0,50	3,16
RS09210	15,36	3,09	1,70	3,75	RS09450	1,93	0,56	0,15	1,00
RS09215	14,79	3,60	1,73	3,33	RS09455	3,60	3,87	3,79	2,25
RS09220	6,21	2,67	2,86	2,36	RS09460	0,53	0,13	0,09	0,18
RS09225	21,61	10,26	10,89	12,21	RS09465	0,86	0,59	0,18	1,49

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS09470	5,33	9,00	13,98	1,31	RS09700	195,28	103,66	148,38	66,84
RS09475	24,13	257,66	346,66	28,58	RS09705	10,82	116,65	40,04	12,52
RS09480	9,83	21,29	13,86	21,51	RS09710	37,37	35,72	22,51	6,47
RS09485	8,28	4,35	1,51	20,97	RS09715	15,09	10,11	4,90	2,33
RS09490	27,99	33,67	26,91	19,96	RS09720	52,88	269,60	181,81	26,50
RS09495	5,93	16,89	11,83	3,20	RS09725	27,45	26,41	23,15	40,18
RS09500	19,26	85,93	47,90	13,86	RS09730	63,89	431,57	272,51	128,95
RS09505	20,87	100,00	50,02	14,08	RS09735	2,28	2,47	1,09	143,66
RS09510	20,43	21,32	23,16	26,18	RS09740	2,42	1,62	1,16	111,79
RS09515	3,93	81,75	43,05	2,55	RS09745	4,41	0,52	0,26	114,85
RS09520	2,21	1,52	0,65	1,59	RS09750	5699,55	2302,20	1043,22	368,29
RS09525	1,49	0,58	0,07	3,64	RS09755	34,68	108,92	183,60	35,11
RS09530	8,50	2,13	1,43	0,78	RS09760	26,25	17,32	27,63	19,40
RS09535	2,63	7,10	2,79	3,30	RS09765	39,64	325,88	237,46	10,56
RS09540	4,42	7,30	4,34	3,65	RS09770	164,53	24,40	23,42	281,01
RS09545	8,92	1,46	1,32	3,11	RS09775	123,82	82,53	81,97	410,63
RS09550	4,71	0,55	0,11	0,97	RS09780	172,07	1976,11	1244,16	169,57
RS09555	20,69	0,48	0,96	3,55	RS09785	31,38	24,42	12,71	22,71
RS09560	26,98	0,67	1,07	5,45	RS09790	66,55	84,27	53,76	24,05
RS09565	4,73	0,61	0,58	1,50	RS09795	60,38	102,93	63,96	26,38
RS09570	2,06	1,09	0,91	0,84	RS09800	132,99	198,06	107,96	50,12
RS09580	13,90	0,40	0,95	1,91	RS09805	44,81	150,84	100,69	12,51
RS09585	10,31	0,12	0,34	1,82	RS09810	4,55	11,62	21,76	68,75
RS09590	4,44	0,11	0,18	1,04	RS09815	4,83	9,54	17,50	85,35
RS09595	3,61	0,76	0,63	0,71	RS09820	8,32	24,14	19,45	73,61
RS09600	38,31	422,64	715,59	136,88	RS09825	8,62	11,73	6,19	0,75
RS09605	53,55	179,38	353,49	145,22	RS09830	48,87	114,76	122,71	28,50
RS09610	25,45	9,62	7,79	157,58	RS09835	19,62	56,57	69,20	47,47
RS09615	38,40	6,66	5,38	110,13	RS09840	70,90	215,91	123,32	24,19
RS09620	6,00	5,06	2,96	55,99	RS09845	30,83	136,00	60,18	34,05
RS09625	11,19	1,66	1,25	15,56	RS09850	310,76	195,98	145,42	37,06
RS09630	39,81	339,86	417,57	50,68	RS09855	113,51	36,60	8,80	67,43
RS09635	84,11	34,35	40,49	5,28	RS09860	87,31	25,06	7,57	47,70
RS09640	12,17	52,25	57,38	29,91	RS09865	75,51	10,85	2,78	21,75
RS09645	1,09	0,31	0,92	4,09	RS09870	22,25	84,41	18,04	21,68
RS09650	1,58	0,50	1,21	5,02	RS09875	81,03	7,21	3,52	11,87
RS09655	1,49	0,86	1,32	5,09	RS09880	148,68	569,15	268,45	82,24
RS09660	1,73	1,17	1,49	5,20	RS09885	18,56	119,73	37,86	21,37
RS09665	19,07	7,70	5,29	14,54	RS09890	64,49	552,71	196,20	24,62
RS09670	33,46	12,48	10,09	21,28	RS09895	23,81	105,10	106,46	25,95
RS09675	15,89	2,47	1,97	51,53	RS09900	219,33	186,31	101,32	57,45
RS09680	64,12	46,59	56,85	24,65	RS09905	116,32	35,05	19,48	38,10
RS09685	60,62	4,75	1,59	12,41	RS09910	7,17	7,48	3,20	6,62
RS09690	77,38	39,74	14,61	23,05	RS09915	355,93	685,80	359,47	137,74
RS09695	100,70	63,45	21,21	36,82	RS09920	420,03	600,98	339,48	139,09

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS09925	396,34	286,25	182,97	133,88	RS10165	35,99	2,73	3,16	78,95
RS09930	264,12	182,08	129,18	95,41	RS10170	124,37	380,43	399,20	1015,80
RS09935	116,65	77,23	99,58	180,94	RS10175	48,60	54,45	38,59	61,03
RS09940	21,13	82,94	115,62	21,12	RS10180	37,74	39,81	31,08	52,75
RS09945	199,32	4,74	6,06	71,22	RS10185	30,07	17,46	11,50	5,77
RS09950	113,62	527,64	253,75	22,63	RS10190	25,52	16,53	9,50	7,49
RS09955	70,10	401,86	427,23	57,37	RS10195	123,77	71,68	96,65	12,16
RS09960	246,79	594,68	585,07	200,93	RS10200	30,12	22,60	19,67	5,45
RS09965	22,97	0,87	4,47	13,02	RS10205	400,19	886,41	1118,03	260,47
RS09970	18,43	24,30	28,19	17,80	RS10210	185,42	910,11	1164,89	197,10
RS09975	79,82	142,02	92,47	30,61	RS10215	8,60	95,42	125,06	48,80
RS09980	46,25	142,80	109,27	30,47	RS10220	20,45	6,92	5,47	285,25
RS09985	98,41	363,52	346,77	70,01	RS10225	27,46	5,62	7,61	34,47
RS09990	143,82	254,11	296,32	71,28	RS10230	43,29	10,25	15,06	51,37
RS09995	2511,10	4576,15	8551,23	3148,62	RS10235	72,51	43,85	69,55	71,92
RS10005	61,67	29,57	27,21	32,31	RS10240	56,73	32,27	6,30	3,22
RS10010	29,44	28,12	13,08	15,83	RS10245	155,39	273,77	197,28	26,72
RS10015	223,12	17,37	22,51	31,23	RS10250	91,75	478,83	503,30	21,16
RS10020	274,99	40,81	50,97	59,32	RS10255	157,56	70,04	25,99	12,59
RS10030	15,51	29,44	11,40	18,60	RS10260	57,06	50,28	97,44	19,95
RS10035	23,18	23,22	5,02	14,08	RS10265	41,50	21,05	50,59	9,95
RS10040	32,22	3,90	3,28	4,13	RS10270	36,05	32,02	63,53	8,76
RS10045	21,56	2,83	3,54	3,96	RS10275	63,20	58,32	108,04	16,05
RS10050	1,28	3,98	2,17	1,53	RS10280	58,68	47,19	86,93	10,81
RS10055	0,56	0,83	0,59	1,23	RS10285	23,63	23,80	30,17	6,38
RS10060	1,52	1,27	0,97	0,76	RS10290	82,12	68,72	105,39	12,04
RS10065	1,59	1,88	0,45	1,23	RS10295	12,67	31,15	24,32	152,91
RS10070	6,70	3,26	2,11	2,77	RS10300	6,73	2,26	0,71	1,72
RS10075	23,48	79,76	50,01	22,86	RS10305	842,64	623,27	140,88	68,79
RS10080	8,49	14,79	17,41	16,04	RS10310	418,35	336,75	82,94	54,56
RS10085	10,15	15,71	16,97	22,55	RS10315	500,69	744,93	1108,36	308,79
RS10090	13,13	13,33	14,82	19,67	RS10320	402,08	436,88	586,74	331,31
RS10095	24,37	14,52	10,90	14,07	RS10325	297,46	130,71	180,29	148,11
RS10100	2,08	0,18	0,20	4,34	RS10330	16,76	4,04	2,24	2,58
RS10105	587,62	25,34	59,09	32,89	RS10335	81,55	42,07	30,65	44,16
RS10110	18,40	0,66	0,78	0,00	RS10340	54,13	22,39	16,95	19,94
RS10115	111,44	57,64	49,58	10,51	RS10345	68,18	24,87	17,61	29,56
RS10120	5,80	5,37	6,84	5,19	RS10350	41,01	13,41	9,74	21,75
RS10130	7,31	0,85	0,27	4,32	RS10355	31,39	155,39	396,25	63,07
RS10135	8,99	2,79	0,72	5,82	RS10360	54,05	264,72	803,31	128,82
RS10140	10,47	50,87	9,93	10,47	RS10365	110,22	2809,47	901,26	12,30
RS10145	32,44	74,84	48,32	4,64	RS10370	16,33	1561,97	462,79	8,84
RS10150	72,99	151,70	76,00	9,68	RS10375	124,03	35,43	13,93	42,61
RS10155	81,59	83,21	72,88	78,60	RS10385	39,47	105,92	68,84	11,11
RS10160	64,61	18,02	15,09	93,51	RS10390	7,85	16,66	12,71	2,83

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS10395	32,33	17,02	9,30	50,73	RS10620	65,46	91,57	311,40	286,74
RS10400	11,08	5,46	3,96	34,34	RS10625	55,88	26,00	21,68	55,26
RS10405	16,93	6,66	2,75	15,70	RS10630	49,61	17,47	18,91	35,09
RS10410	32,50	12,55	3,29	20,02	RS10635	111,87	102,37	141,80	58,55
RS10415	10,37	5,99	1,99	3,32	RS10640	63,33	13,60	15,01	26,65
RS10420	191,76	1300,29	1033,88	189,94	RS10645	62,55	13,67	12,58	27,23
RS10425	28,53	13,92	15,43	4,29	RS10650	544,92	163,02	112,58	105,66
RS10430	15,53	3,51	3,14	2,40	RS10655	274,38	64,60	46,87	51,63
RS10435	3,24	0,00	0,57	0,77	RS10660	136,30	34,42	30,43	40,82
RS10440	20,97	33,59	6,33	0,77	RS10665	12,12	5,55	2,99	6,52
RS10445	123,41	181,32	202,00	34,66	RS10670	72,60	23,67	19,90	28,76
RS10450	21,26	313,41	232,94	30,49	RS10675	28,40	106,41	160,84	44,06
RS10455	62,20	69,03	50,17	14,36	RS10680	21,72	89,85	204,78	86,82
RS10460	145,42	88,83	122,59	6,82	RS10685	39,39	108,48	260,77	101,30
RS10465	132,20	164,07	129,33	30,01	RS10690	56,18	4,30	2,89	14,52
RS10470	55,95	20,03	7,42	30,62	RS10695	36,41	5,46	5,11	9,16
RS10475	100,75	32,66	12,58	33,40	RS10700	36,57	5,67	5,39	11,47
RS10480	106,35	115,94	106,43	17,17	RS10705	20,01	10,14	7,97	19,33
RS10485	107,96	89,93	29,51	11,23	RS10710	207,89	385,41	610,88	299,45
RS10490	137,57	45,68	21,96	13,47	RS10715	68,28	6,65	4,50	5,38
RS10495	187,02	132,43	69,39	18,30	RS10720	2555,50	239,79	200,50	61,60
RS10500	51,00	210,52	159,20	27,62	RS10725	1810,19	125,66	86,91	44,32
RS10505	241,59	43,85	45,35	23,22	RS10730	1414,33	143,25	89,17	34,23
RS10510	70,92	288,95	93,43	7,28	RS10735	651,77	274,71	138,45	30,89
RS10515	33,74	31,13	44,51	3,35	RS10740	253,77	1641,99	1081,83	117,30
RS10520	41,87	17,53	19,01	7,16	RS10745	195,40	1043,59	771,44	110,60
RS10525	32,06	17,74	12,55	15,28	RS10750	143,93	287,78	301,00	30,89
RS10530	217,82	1345,40	537,97	98,68	RS10755	122,16	112,74	97,22	25,22
RS10535	215,86	107,88	246,04	47,61	RS10760	175,47	162,26	142,54	47,56
RS10540	1704,00	4821,74	6579,02	709,76	RS10765	51,50	76,76	78,32	23,27
RS10545	1291,90	2698,61	3557,14	505,72	RS10770	745,98	2814,99	1518,28	522,77
RS10550	28,12	2,67	0,98	11,46	RS10775	105,02	661,88	502,05	96,29
RS10555	225,39	406,38	151,88	9,05	RS10780	147,83	362,94	233,29	82,81
RS10560	138,89	155,94	38,45	10,21	RS10785	102,39	234,57	147,31	48,23
RS10565	109,19	78,30	20,33	7,20	RS10790	11975,49	963,64	563,53	384,03
RS10570	37,04	36,14	38,62	3,57	RS10795	240,15	104,64	64,08	149,33
RS10575	40,72	143,09	104,84	34,04	RS10800	15,73	23,21	14,41	29,94
RS10580	8,10	17,82	14,32	7,15	RS10805	114,48	163,71	109,73	155,64
RS10585	141,42	582,20	147,60	31,58	RS10810	71,71	99,74	86,50	117,20
RS10590	78,12	462,88	173,70	20,23	RS10815	856,42	2061,09	2199,24	251,43
RS10595	117,67	160,58	103,72	46,35	RS10820	153,91	66,59	45,86	45,88
RS10600	73,09	119,89	93,10	41,85	RS10825	121,44	69,73	54,50	30,18
RS10605	25,95	52,54	51,88	45,30	RS10830	25,82	27,75	26,59	14,50
RS10610	39,97	64,98	72,28	58,44	RS10835	16,69	9,79	7,61	7,34
RS10615	238,26	535,83	1780,14	511,43	RS10840	318,60	12,27	6,80	15,34

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS10845	114,90	658,49	221,76	67,61	RS11070	140,77	7,93	2,32	2,68
RS10850	812,42	947,92	943,02	299,42	RS11075	257,37	16,46	5,92	3,89
RS10855	191,44	24,13	15,06	22,14	RS11080	128,33	7,81	2,73	1,66
RS10860	87,39	27,63	34,42	58,07	RS11085	114,04	4,52	1,53	4,80
RS10865	111,48	39,10	52,82	81,17	RS11090	124,46	8,21	2,19	6,25
RS10870	40,60	2,10	5,15	28,78	RS11095	99,11	3,37	1,18	4,49
RS10875	23,15	8,21	6,43	22,68	RS11100	207,66	11,24	2,32	6,14
RS10880	14,44	6,15	3,15	16,68	RS11105	81,99	3,14	0,37	2,58
RS10885	209,77	835,68	1304,97	31,15	RS11110	238,71	8,90	1,51	5,64
RS10890	597,72	1764,82	1362,50	589,18	RS11115	221,89	7,13	1,16	7,09
RS10895	448,10	830,47	506,57	462,64	RS11120	301,05	11,08	3,81	6,07
RS10900	437,05	540,74	431,38	409,82	RS11125	444,18	10,82	2,60	9,71
RS10905	2033,91	1904,53	2654,64	597,99	RS11130	446,34	13,53	2,97	8,87
RS10910	2911,36	662,88	644,71	1169,18	RS11135	228,64	7,85	1,56	5,85
RS10915	94,94	589,97	757,81	58,10	RS11140	126,45	3,54	0,55	3,65
RS10920	56,19	61,57	71,85	33,59	RS11145	405,78	13,99	3,92	8,74
RS10925	376,42	470,92	543,58	131,55	RS11150	220,78	6,79	1,21	3,98
RS10930	109,10	350,97	165,09	53,77	RS11155	210,83	2,27	0,30	5,96
RS10935	80,28	245,68	128,86	49,55	RS11160	146,15	4,26	0,48	8,41
RS10940	91,42	107,71	85,34	50,56	RS11165	92,02	3,73	0,38	4,82
RS10945	66,47	53,90	49,04	25,79	RS11170	163,73	11,84	1,50	16,95
RS10950	476,22	352,95	385,40	117,18	RS11175	128,20	11,03	1,02	10,99
RS10955	3945,58	133,84	92,36	648,15	RS11180	177,20	14,29	1,67	17,34
RS10960	75,44	30,68	22,20	82,75	RS11185	100,83	10,69	1,06	6,78
RS10965	42,22	12,12	7,99	58,51	RS11190	28,11	0,63	0,00	1,97
RS10970	290,96	267,42	210,03	127,75	RS11195	4,20	0,00	0,00	0,28
RS10975	345,64	399,44	317,11	284,53	RS11200	38,89	1,46	0,12	6,42
RS10980	38,17	41,42	39,59	41,98	RS11205	454,23	605,91	975,34	90,88
RS10985	34,50	31,82	35,60	64,91	RS11210	338,27	521,59	880,45	102,47
RS10990	215,41	72,18	88,35	248,64	RS11215	100,47	195,82	361,34	79,58
RS10995	276,89	39,22	60,34	200,23	RS11220	79,77	86,29	202,62	91,57
RS11000	44,37	208,88	105,90	99,11	RS11225	162,94	47,03	46,42	71,59
RS11005	450,10	803,68	429,43	177,68	RS11230	389,06	48,96	38,89	65,49
RS11010	259,64	451,12	243,20	163,46	RS11235	21,21	6,68	6,10	17,47
RS11015	146,33	24,85	19,76	23,87	RS11240	966,09	202,71	102,57	158,57
RS11020	111,77	23,86	24,02	28,89	RS11245	412,92	99,13	52,26	129,40
RS11025	97,48	27,67	26,08	25,71	RS11250	7,81	3,78	5,42	15,74
RS11030	1028,50	1140,72	948,80	180,58	RS11255	9,28	5,17	5,90	34,42
RS11035	501,95	766,19	683,74	129,76	RS11260	6,68	4,36	8,20	26,98
RS11040	338,93	808,12	1381,20	173,22	RS11265	87,57	52,34	138,24	113,34
RS11045	1579,87	1150,66	2355,78	625,79	RS11270	207,00	275,62	362,92	539,61
RS11050	143,24	48,37	61,17	26,15	RS11275	2293,47	104,66	52,39	192,52
RS11055	186,88	30,18	38,43	24,86	RS11280	198,99	156,32	71,29	110,19
RS11060	132,07	23,41	30,77	18,66	RS11285	65,86	32,55	19,22	32,02
RS11065	109,25	5,31	1,80	1,30	RS11290	1252,90	911,19	1294,18	510,65

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS11295	728,27	875,43	1396,59	790,67	RS11520	1,30	1,27	0,23	0,60
RS11300	520,36	237,13	180,33	506,82	RS11525	28,23	4,56	1,18	6,86
RS11305	227,90	151,82	167,82	49,94	RS11530	14,48	3,75	0,70	9,31
RS11310	171,83	160,40	185,25	44,07	RS11535	34,73	4,20	10,29	42,14
RS11315	11,93	21,09	12,35	7,20	RS11540	26,44	1,32	3,33	24,57
RS11320	182,20	35,77	61,94	47,40	RS11545	152,08	6,22	8,09	29,01
RS11325	2296,59	464,32	526,80	96,80	RS11550	411,46	175,97	229,23	62,69
RS11330	753,85	161,62	148,09	97,59	RS11555	642,14	157,67	170,13	143,57
RS11335	351,51	141,89	146,22	83,95	RS11560	165,22	73,73	72,08	71,37
RS11340	796,49	147,95	169,51	134,93	RS11565	649,24	198,53	249,62	190,67
RS11345	470,65	77,29	86,99	98,95	RS11570	232,43	85,55	52,44	56,40
RS11350	41,18	31,33	52,90	42,93	RS11575	148,70	59,61	34,64	39,17
RS11355	306,57	741,38	1047,28	220,71	RS11580	1009,45	357,45	183,34	201,75
RS11360	150,45	217,25	403,73	66,62	RS11585	414,42	76,18	40,47	112,11
RS11365	217,53	295,15	390,28	118,55	RS11590	80,01	6,92	5,83	31,11
RS11370	103,90	82,11	114,20	38,19	RS11595	70,21	27,04	20,61	82,34
RS11375	14,12	1,23	1,18	7,53	RS11600	56,39	14,64	13,69	58,64
RS11380	37,42	9,15	5,34	25,99	RS11605	92,69	12,35	7,69	82,84
RS11385	113,31	180,49	72,13	132,13	RS11610	31,18	6,56	3,78	41,63
RS11390	64,36	59,09	23,57	94,47	RS11615	290,58	266,06	114,19	54,93
RS11395	142,10	63,14	62,75	27,85	RS11620	313,74	99,50	38,58	43,77
RS11400	69,22	57,84	54,80	41,16	RS11625	308,32	53,10	22,96	41,57
RS11405	43,78	37,31	31,52	26,01	RS11630	16,76	15,25	9,30	42,49
RS11410	39,60	23,27	19,16	22,51	RS11635	8,16	1,43	1,15	13,37
RS11415	88,62	34,65	25,91	37,23	RS11640	17,96	4,43	2,46	29,57
RS11420	42,18	20,43	21,86	24,21	RS11645	1063,27	415,43	302,23	246,30
RS11425	22,26	6,95	8,91	24,47	RS11650	350,19	238,47	266,67	950,11
RS11430	14,15	7,70	13,75	29,54	RS11660	46,50	19,28	34,45	27,00
RS11435	43,63	12,12	14,64	35,48	RS11665	29,20	9,48	16,67	22,51
RS11440	102,24	27,49	42,85	95,59	RS11670	18,58	0,74	0,29	13,13
RS11445	83,42	10,65	7,93	19,83	RS11675	164,55	168,60	298,15	117,13
RS11450	109,77	191,66	341,33	266,17	RS11680	63,86	51,16	83,00	41,07
RS11455	83,14	105,65	230,76	166,46	RS11685	28,64	18,40	17,87	58,52
RS11460	53,91	52,50	220,06	22,18	RS11690	661,20	184,86	118,50	90,68
RS11465	6,70	9,79	10,97	5,15	RS11695	333,12	68,25	43,92	48,70
RS11470	30,20	92,13	38,07	5,37	RS11700	335,83	43,13	31,56	48,78
RS11475	47,04	165,11	52,41	10,87	RS11705	173,81	19,58	10,53	40,31
RS11480	43,65	4,19	3,45	3,52	RS11710	232,95	23,72	16,57	45,12
RS11485	11,46	33,03	21,20	1,62	RS11715	1758,06	769,94	511,50	37,73
RS11490	3,29	7,77	6,54	0,62	RS11720	2247,32	503,42	370,46	44,77
RS11495	3,43	6,12	3,71	1,15	RS11725	1489,30	90,08	36,46	13,24
RS11500	1,99	1,49	0,50	0,33	RS11730	956,99	52,97	21,60	6,08
RS11505	3,00	1,99	1,04	0,75	RS11735	221,71	77,76	40,52	8,14
RS11510	3,17	1,54	0,47	1,28	RS11740	115,66	23,57	9,52	26,89
RS11515	1,65	0,73	0,46	0,91	RS11745	13,44	8,31	8,10	3,39

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS11750	508,77	132,79	137,50	52,35	RS11975	63,44	168,53	85,81	22,29
RS11755	62,74	41,73	84,78	35,72	RS11980	2349,72	87,86	81,91	58,01
RS11760	378,33	446,71	646,24	189,94	RS11985	36,95	32,04	21,68	23,15
RS11765	64,88	29,46	41,34	11,64	RS11990	190,41	643,06	1041,59	112,63
RS11770	1395,88	553,96	342,23	176,22	RS11995	194,41	304,64	490,46	129,77
RS11775	1151,11	198,71	73,27	108,56	RS12000	102,61	96,60	170,60	34,84
RS11780	31,31	4,32	2,03	2,82	RS12005	31,22	91,27	31,88	12,72
RS11785	146,26	190,41	97,90	86,63	RS12010	109,59	744,87	888,22	195,54
RS11790	127,67	138,92	139,40	65,50	RS12015	539,38	135,45	147,92	17,75
RS11795	187,12	212,53	225,15	132,69	RS12020	61,56	63,66	50,57	11,88
RS11800	20,39	9,70	6,88	11,19	RS12025	114,32	105,24	89,59	27,37
RS11805	111,79	200,44	248,52	78,97	RS12030	70,15	172,65	140,94	8,23
RS11810	319,21	1200,31	985,22	505,65	RS12035	1019,58	6710,45	8650,65	2896,46
RS11815	227,33	21,16	13,11	20,34	RS12040	872,56	5461,21	6749,37	996,50
RS11820	148,04	17,01	11,00	74,35	RS12045	1678,07	6755,19	7952,88	2404,82
RS11825	72,96	464,26	175,32	13,42	RS12050	77,99	159,43	45,27	52,66
RS11830	2528,60	2881,17	1490,55	375,54	RS12055	472,95	149,29	109,52	467,49
RS11835	906,81	1138,64	676,92	238,95	RS12060	520,53	100,42	87,84	516,88
RS11840	359,75	1315,98	1464,53	436,51	RS12065	252,77	47,24	44,02	320,99
RS11845	391,65	747,16	836,32	294,46	RS12070	256,33	38,51	30,99	350,66
RS11850	757,84	479,98	380,58	255,53	RS12075	1768,25	106,16	101,64	58,88
RS11855	401,17	462,99	354,75	182,52	RS12080	108,97	398,63	124,23	94,07
RS11860	89,53	30,97	57,82	32,37	RS12085	288,34	34,39	34,94	43,03
RS11865	432,88	35,31	39,61	38,84	RS12090	601,10	247,63	619,67	2161,32
RS11870	190,40	134,44	121,26	41,61	RS12095	694,76	11,02	7,05	19,35
RS11875	1945,62	542,22	271,56	98,79	RS12100	299,65	4,60	1,97	14,44
RS11880	1490,01	292,80	198,19	57,74	RS12105	177,40	76,65	62,67	62,52
RS11885	79,79	36,50	17,48	25,51	RS12110	675,92	373,72	252,32	106,69
RS11890	28,09	21,43	15,32	12,38	RS12115	47,41	82,13	82,48	83,23
RS11895	52,11	0,50	0,10	1,74	RS12120	10,76	26,54	58,38	38,92
RS11900	53,12	584,08	144,75	20,14	RS12125	71,22	85,80	128,97	123,49
RS11905	271,19	366,06	565,76	64,08	RS12130	202,38	58,53	76,54	9,94
RS11910	225,53	256,25	375,96	44,85	RS12135	651,50	213,01	279,26	94,78
RS11915	60,22	1348,04	1013,90	15,19	RS12140	1252,52	410,22	545,56	191,16
RS11920	46,52	260,98	232,47	56,78	RS12145	1057,54	296,93	337,59	158,99
RS11925	122,42	810,33	520,97	26,29	RS12150	423,60	39,54	70,27	42,29
RS11930	116,65	415,22	317,56	39,03	RS12155	38,61	49,67	55,21	31,99
RS11935	49,83	3,41	2,32	16,23	RS12160	65,69	244,57	80,56	8,62
RS11940	205,48	182,55	263,85	979,92	RS12165	96,67	191,80	154,66	139,83
RS11945	16,69	1,63	1,11	28,56	RS12170	50,20	82,44	88,99	107,46
RS11950	162,57	257,00	144,14	107,87	RS12175	15,54	34,83	67,49	57,79
RS11955	161,31	394,22	203,36	33,50	RS12180	14,66	20,21	40,35	46,02
RS11960	125,58	165,63	62,83	24,45	RS12185	12,62	12,22	6,52	19,99
RS11965	181,68	199,29	84,09	35,59	RS12190	51,90	118,96	149,27	119,49
RS11970	1005,85	185,15	249,66	104,00	RS12195	6471,66	26337,08	28916,27	14843,76

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS12200	10,59	66,64	25,93	5,62	RS12435	153,68	10,10	5,81	5,51
RS12205	43,68	5,14	2,80	3,79	RS12440	3,21	0,20	0,09	1,95
RS12210	451,15	58,32	25,76	26,81	RS12445	359,34	14,35	6,67	26,13
RS12215	264,27	30,11	15,05	18,88	RS12450	461,02	300,96	229,58	181,74
RS12220	291,83	1195,12	1457,94	110,52	RS12455	241,18	134,70	153,03	125,26
RS12225	152,24	485,74	624,40	83,56	RS12460	143,49	49,36	76,15	74,77
RS12230	76,07	187,34	498,53	115,66	RS12465	183,31	76,44	113,30	93,47
RS12235	70,62	10,91	11,63	32,58	RS12470	295,62	125,31	87,80	60,80
RS12250	648,78	184,22	235,35	65,45	RS12475	192,20	230,18	117,46	78,10
RS12255	69,58	71,83	46,77	73,31	RS12480	174,16	54,62	31,26	15,14
RS12260	129,72	85,56	56,94	71,80	RS12485	140,69	24,83	16,01	13,06
RS12265	106,41	109,27	69,06	69,62	RS12490	138,88	41,16	29,55	14,70
RS12270	33,62	31,42	19,47	15,56	RS12495	133,91	36,26	29,26	11,78
RS12275	6,98	1,68	0,56	0,62	RS12500	120,59	315,02	148,00	71,70
RS12280	4,90	0,17	0,02	0,48	RS12505	234,86	593,74	293,80	209,15
RS12285	3,12	0,05	0,07	0,35	RS12510	923,01	1413,14	860,76	813,46
RS12290	12,69	32,17	38,15	4,72	RS12515	1261,55	329,15	847,96	552,48
RS12295	57,99	135,29	150,48	17,12	RS12520	55,01	86,03	230,84	121,86
RS12300	121,37	105,41	69,14	135,11	RS12525	69,01	98,41	252,23	110,74
RS12305	85,06	47,24	36,29	112,97	RS12535	161,19	286,08	299,56	23,89
RS12310	60,86	38,48	30,13	129,90	RS12540	119,41	127,48	83,70	16,73
RS12315	6506,18	1885,40	1281,27	881,20	RS12545	28,35	48,18	49,20	10,85
RS12320	6826,58	1007,99	610,74	1034,94	RS12550	15,24	27,16	41,87	14,67
RS12325	6817,00	858,63	447,28	848,50	RS12555	4258,69	198,34	232,61	312,76
RS12330	58,50	166,85	91,77	22,74	RS12560	225,75	56,13	68,48	80,97
RS12335	370,39	107,13	72,22	94,21	RS12565	1411,34	850,82	741,19	427,70
RS12340	259,97	49,22	32,13	101,25	RS12570	1204,21	568,97	565,56	410,38
RS12345	58,76	8,22	6,16	32,80	RS12575	807,52	111,53	167,73	195,14
RS12350	148,81	50,34	34,92	123,43	RS12580	113,79	1,56	1,44	7,49
RS12355	125,43	30,43	27,15	131,09	RS12585	7921,16	2187,91	1908,47	583,79
RS12360	23,30	5,14	3,26	3,63	RS12590	31,20	63,46	72,90	31,62
RS12365	25,71	5,74	5,64	4,89	RS12595	171,78	362,58	172,74	10,48
RS12370	115,93	149,73	103,02	21,53	RS12600	197,64	610,44	273,60	11,85
RS12375	51,31	35,66	28,28	13,18	RS12605	476,08	2008,20	3554,92	361,82
RS12380	11,41	0,48	0,18	3,30	RS12610	103,24	554,89	597,98	99,68
RS12385	322,62	4,22	5,26	2,54	RS12615	84,15	457,73	605,33	99,72
RS12390	56,91	31,17	43,63	4,61	RS12620	202,83	454,13	537,19	104,61
RS12395	37,64	14,91	15,27	4,20	RS12625	57,99	200,05	176,62	40,89
RS12400	45,36	19,68	19,65	6,26	RS12630	76,22	53,58	39,26	22,51
RS12405	20,09	8,78	13,64	4,32	RS12635	284,03	131,94	54,68	101,18
RS12410	58,94	17,97	17,75	8,85	RS12640	298,08	169,74	89,18	120,86
RS12415	27,03	11,20	12,85	8,49	RS12645	48,81	86,56	58,37	33,48
RS12420	16,44	14,75	11,45	9,61	RS12650	157,63	354,40	317,97	88,51
RS12425	43,78	29,11	31,94	17,45	RS12655	108,37	223,67	165,36	61,26
RS12430	116,93	43,26	21,35	5,17	RS12660	37,81	6,36	7,43	10,25

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS12665	37,35	126,70	36,06	7,24	RS12890	669,93	660,28	421,27	89,15
RS12670	2,01	0,12	0,00	0,55	RS12895	56,39	97,76	84,46	23,28
RS12675	1,33	0,84	0,55	1,77	RS12900	344,03	9,77	7,90	11,55
RS12680	341,31	9,29	5,46	11,04	RS12905	783,27	143,72	201,11	228,45
RS12685	185,04	3,13	1,93	6,96	RS12910	226,46	185,14	78,69	14,22
RS12690	738,11	322,52	205,66	134,94	RS12915	399,55	32,59	23,41	36,35
RS12695	199,15	54,54	37,17	29,14	RS12920	272,91	452,69	377,61	103,27
RS12700	131,10	2,89	0,74	56,34	RS12925	2169,92	568,36	510,29	462,88
RS12705	413,00	130,35	192,52	943,63	RS12930	41,97	19,42	12,06	16,69
RS12710	900,99	63,76	91,25	502,98	RS12935	394,45	3,17	1,40	15,88
RS12715	2410,96	104,10	144,10	1063,19	RS12940	184,10	101,99	101,33	85,83
RS12720	554,63	3084,84	2965,23	1092,83	RS12945	457,44	431,32	288,54	132,88
RS12725	32,11	1,01	0,51	2,01	RS12950	114,14	17,14	11,99	29,52
RS12730	445,89	43,01	31,05	38,32	RS12955	81,33	10,17	5,75	20,00
RS12735	106,25	260,88	163,97	51,20	RS12960	89,82	10,93	5,96	14,34
RS12740	68,22	139,76	98,79	33,56	RS12965	226,06	4,96	2,91	60,45
RS12745	140,58	78,49	75,27	28,19	RS12970	247,33	295,37	286,17	80,77
RS12750	18,86	13,07	10,61	4,19	RS12975	286,89	166,30	217,51	95,05
RS12755	104,20	11,28	7,15	230,82	RS12980	1604,63	298,30	138,12	66,10
RS12760	325,22	236,26	307,87	99,21	RS12985	695,68	85,21	39,66	26,79
RS12765	141,88	122,73	84,00	63,79	RS12990	127,99	72,15	88,60	18,81
RS12770	172,62	126,77	84,27	71,84	RS12995	1373,60	106,44	64,12	36,71
RS12775	135,94	79,51	62,29	59,46	RS13000	84,67	23,69	8,08	51,22
RS12780	19,67	41,77	31,68	12,22	RS13005	579,29	139,49	49,96	127,29
RS12785	19,63	28,05	25,99	9,17	RS13010	222,88	45,25	15,84	61,18
RS12790	80,21	121,63	33,60	9,16	RS13015	250,02	145,37	88,35	54,62
RS12795	648,64	518,05	160,01	18,80	RS13020	31,69	67,99	39,43	22,33
RS12800	982,94	1123,96	909,09	428,78	RS13025	28,37	59,32	36,68	12,26
RS12805	542,92	214,91	171,85	257,37	RS13030	20,69	23,03	5,90	10,21
RS12810	634,15	1357,97	1256,93	807,41	RS13035	13,05	10,72	7,71	5,55
RS12815	62,89	12,32	12,84	15,44	RS13040	330,73	115,63	99,54	56,92
RS12820	2359,62	1648,44	2235,38	289,93	RS13045	2411,25	3306,00	4181,58	615,32
RS12825	1265,25	994,86	1396,53	162,92	RS13050	335,83	38,85	13,31	88,50
RS12830	183,78	474,11	669,78	79,57	RS13055	2131,98	166,74	123,12	34,40
RS12835	79,61	313,07	622,85	91,95	RS13060	138,74	1,29	1,03	19,92
RS12840	50,91	168,84	386,20	69,39	RS13065	248,22	2,90	2,15	4,52
RS12845	56,95	56,23	31,91	21,82	RS13070	542,49	20,65	13,21	7,19
RS12850	802,64	758,46	776,39	73,71	RS13075	64,85	156,35	58,87	22,47
RS12855	160,49	75,40	54,09	49,13	RS13080	77,82	116,30	39,55	11,29
RS12860	24,62	39,48	30,43	24,04	RS13085	93,15	82,27	32,30	11,55
RS12865	229,19	98,18	54,39	62,25	RS13090	81,78	54,06	23,29	10,53
RS12870	88,44	70,56	47,52	36,98	RS13095	52,24	3,58	4,59	4,32
RS12875	46,58	5,34	5,22	17,91	RS13100	441,38	274,93	231,51	45,55
RS12880	2420,90	1150,49	1226,21	408,09	RS13105	3517,78	785,76	670,35	170,22
RS12885	12,72	24,28	11,91	23,17	RS13110	835,82	1380,81	834,32	40,98

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS13115	64,02	37,39	32,87	36,32	RS13340	187,63	1252,80	2133,24	411,62
RS13120	16,31	14,43	15,00	37,89	RS13345	17,13	7,46	14,64	3,59
RS13125	41,52	35,72	41,45	23,68	RS13350	437,56	31,29	50,16	57,45
RS13130	26,71	42,62	33,25	36,46	RS13355	10,73	12,51	8,26	4,66
RS13135	308,76	32,90	17,11	36,11	RS13360	184,17	331,05	838,18	150,81
RS13140	91,46	121,77	84,59	26,74	RS13365	94,46	185,99	280,97	34,80
RS13145	14,61	133,69	34,21	9,03	RS13370	90,38	67,61	115,39	20,65
RS13150	13,78	3,48	5,14	10,04	RS13375	97,49	80,19	153,18	15,72
RS13155	143,35	163,05	319,13	67,13	RS13380	65,29	36,95	56,58	9,79
RS13160	1211,17	1820,24	4314,87	454,71	RS13385	951,23	10507,62	13448,00	382,77
RS13165	537,73	90,55	52,65	21,05	RS13390	167,98	606,33	988,07	93,50
RS13170	290,29	128,21	100,30	165,46	RS13395	481,37	685,07	368,04	64,95
RS13175	1341,83	1727,44	1510,22	245,74	RS13400	43,37	242,74	141,84	36,46
RS13180	57,89	11,83	9,27	3,14	RS13405	42,51	111,86	81,98	25,64
RS13185	87,00	332,19	223,58	30,74	RS13410	50,34	132,93	83,51	24,96
RS13190	59,10	195,58	124,49	16,86	RS13415	1320,72	6044,36	5094,22	631,23
RS13195	1661,08	50,12	21,29	33,73	RS13420	470,31	2949,93	2464,78	351,39
RS13200	126,13	280,76	157,83	42,07	RS13425	525,55	3724,78	2847,39	488,81
RS13205	543,04	267,03	601,58	185,18	RS13430	263,64	2013,01	2003,30	359,95
RS13210	1113,98	996,60	1663,61	99,33	RS13435	309,08	1143,23	1464,78	283,46
RS13215	430,87	209,91	361,04	19,31	RS13440	18,11	9,21	4,57	11,05
RS13220	926,86	259,92	335,84	57,35	RS13445	180,82	6,75	1,52	11,39
RS13225	16,19	5,82	9,62	27,07	RS13450	36,76	1,91	0,37	12,07
RS13230	232,05	62,14	106,42	37,34	RS13455	60,10	1,53	0,21	13,59
RS13235	80,64	22,96	20,89	47,32	RS13460	47,06	23,79	6,98	134,34
RS13240	92,83	35,32	24,26	36,35	RS13465	30,82	9,51	3,29	103,87
RS13245	151,73	87,13	55,59	67,09	RS13470	35,52	7,98	1,46	89,99
RS13250	138,22	880,72	498,39	38,48	RS13475	26,72	4,68	1,51	44,70
RS13255	17,51	30,00	17,89	6,07	RS13480	13,99	5,47	5,30	7,37
RS13260	209,29	92,11	60,46	21,74	RS13485	981,10	288,96	140,01	108,99
RS13265	162,13	319,65	164,68	56,44	RS13490	600,28	312,96	186,50	110,54
RS13270	0,13	1,60	0,00	0,00	RS13495	707,06	1192,85	326,62	2368,38
RS13275	209,41	109,57	71,17	34,62	RS13500	107,72	9619,03	10452,08	405,48
RS13280	1450,72	560,83	380,73	74,33	RS13505	47,29	4526,50	4996,54	244,79
RS13285	63,32	2,15	0,69	15,44	RS13510	30,92	3265,94	4480,60	151,28
RS13290	22,76	1280,03	302,32	21,85	RS13515	41,86	88,29	72,03	19,62
RS13295	257,03	25,39	11,93	34,87	RS13520	15,66	3,53	3,74	5,50
RS13300	63,86	32,63	38,36	64,48	RS13525	216,64	702,35	801,02	147,92
RS13305	237,79	80,49	41,14	69,74	RS13530	55,46	21,60	10,53	9,03
RS13310	195,69	873,87	1750,22	221,12	RS13535	173,51	92,94	27,78	67,16
RS13315	265,18	526,27	785,60	1059,00	RS13545	43,63	180,46	62,05	9,80
RS13320	537,54	36,31	39,41	200,65	RS13550	29,80	59,22	19,73	6,56
RS13325	356,25	13,61	19,78	90,31	RS13555	19,94	24,39	8,14	4,07
RS13330	176,59	4,86	7,95	28,20	RS13560	34,99	62,42	21,73	9,92
RS13335	259,40	1281,50	1614,51	182,19	RS13565	37,54	63,63	24,53	10,48

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS13570	31,00	81,39	32,71	9,95	RS13810	18,62	25,14	17,68	42,96
RS13575	16,97	40,89	11,99	8,11	RS13815	83,11	94,86	68,69	18,48
RS13580	15,45	53,39	18,69	10,20	RS13820	134,64	133,76	98,49	32,33
RS13585	100,04	10,93	5,47	5,51	RS13825	61,92	54,10	37,90	13,48
RS13590	18,28	38,53	16,44	12,96	RS13830	99,01	73,76	32,69	35,55
RS13595	11,23	0,91	0,69	4,93	RS13835	73,77	54,81	39,01	29,91
RS13600	13,63	0,92	0,69	7,59	RS13840	22,54	4,86	1,35	0,72
RS13605	35,16	69,82	49,52	20,55	RS13845	4544,03	9979,43	11847,06	1286,50
RS13610	22,17	23,69	8,70	10,36	RS13850	245,71	317,10	230,62	379,53
RS13615	17,23	6,77	3,06	11,83	RS13855	152,44	232,34	212,15	324,11
RS13620	108584,4	178277,3	211414,9	696038,9	RS13860	340,40	307,67	124,29	58,79
RS13625	497,09	139,25	103,84	127,86	RS13870	62,66	255,06	218,22	40,90
RS13630	681,71	156,71	122,12	170,36	RS13875	59,88	43,12	42,92	82,85
RS13635	388,41	81,11	56,06	110,53	RS13880	38,53	14,79	21,40	26,90
RS13640	253,36	45,41	28,86	148,81	RS13885	584,94	1365,07	411,74	70,63
RS13645	185,31	18,20	7,00	197,98	RS13890	46,93	50,03	29,09	46,12
RS13650	128,71	6,72	3,14	210,36	RS13895	8,37	23,58	19,64	22,96
RS13655	77,04	8,79	3,72	194,12	RS13900	89,77	184,36	221,77	123,34
RS13660	40,95	5,51	4,53	137,42	RS13905	561,26	1075,71	783,92	366,97
RS13665	39,16	13,40	5,96	135,17	RS13910	9059,47	1032,72	680,82	461,07
RS13670	34,20	16,56	6,46	101,63	RS13915	1781,23	783,20	2163,72	2350,12
RS13675	36,20	16,00	8,93	4,01	RS13920	144,27	9,84	6,30	84,56
RS13680	43,33	143,65	145,02	8,27	RS13925	118,45	4,65	1,80	11,35
RS13685	257,45	74,75	47,04	26,33	RS13930	64,06	2,10	0,33	5,20
RS13690	548,81	29,92	31,35	65,03	RS13935	100,75	1,76	0,41	4,82
RS13700	12,38	0,93	1,33	1,62	RS13940	144,28	8,46	4,27	6,09
RS13705	39,65	8,03	7,02	14,80	RS13945	104,10	10,98	4,50	7,68
RS13710	16,07	4,40	3,59	4,70	RS13950	159,24	27,26	13,81	12,10
RS13715	6,87	13,06	16,37	32,09	RS13955	205,07	3,86	5,97	8,33
RS13720	44,48	2,99	0,53	11,28	RS13960	63,00	426,72	355,05	43,51
RS13725	12,42	0,52	0,25	3,77	RS13965	145,71	39,63	49,74	17,06
RS13735	5797,15	1407,15	953,68	63,52	RS13970	104,66	21,88	26,91	14,94
RS13740	7385,93	1094,59	636,50	57,69	RS13975	147,03	7,49	3,68	17,23
RS13745	5314,80	509,67	283,83	28,52	RS13980	46,65	2,71	0,89	10,87
RS13750	7102,11	326,38	167,10	20,92	RS13985	3909,68	18,08	10,09	157,44
RS13755	19197,56	1792,73	1308,50	100,40	RS13990	103,76	1,91	1,36	8,60
RS13760	2396,17	464,98	204,31	58,85	RS13995	29,03	16,57	8,00	132,48
RS13765	103,38	265,08	122,90	16,95	RS14000	2138,05	5851,53	7106,82	707,77
RS13770	223,89	305,75	132,20	19,33	RS14005	338,51	206,72	223,28	52,25
RS13780	2293,80	1650,03	983,98	185,86	RS14010	2202,71	327,89	322,98	38,52
RS13785	317,92	167,49	135,42	37,15	RS14015	213,54	119,58	244,23	44,10
RS13790	154,63	149,68	54,43	29,47	RS14020	15,34	19,12	14,46	6,15
RS13795	168,47	129,69	46,97	34,43	RS14025	11,10	11,23	10,61	4,55
RS13800	144,48	113,34	35,45	28,20	RS14030	308,85	90,33	142,91	67,22
RS13805	388,63	1698,19	1856,86	276,84	RS14035	36,48	16,30	16,45	5,08

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS14040	57,50	78,62	31,61	14,48	RS14270	29,13	1,81	0,83	1,41
RS14045	86,52	150,45	58,70	19,27	RS14275	19,44	43,55	18,34	16,61
RS14050	168,01	137,60	127,80	30,67	RS14280	19,26	57,74	20,06	18,46
RS14055	41,30	34,13	19,25	2,42	RS14285	194,50	142,76	158,58	62,03
RS14060	7,97	9,09	5,22	1,93	RS14290	83,17	57,68	79,57	27,72
RS14065	47,13	55,12	31,84	7,81	RS14295	391,42	43,83	28,98	23,07
RS14070	52,71	41,10	24,90	8,36	RS14300	176,92	11,97	8,62	16,97
RS14075	45,50	22,21	14,13	6,37	RS14305	94,24	6,43	8,28	10,20
RS14080	21,37	0,53	0,18	2,15	RS14310	408,51	2335,18	712,16	32,10
RS14085	1164,60	797,22	511,77	299,80	RS14315	118,38	7,85	5,06	19,90
RS14095	2,53	0,17	0,14	1,03	RS14320	793,08	315,81	189,86	208,87
RS14100	155,12	1,95	1,72	22,07	RS14325	95,86	298,60	176,53	17,91
RS14105	144,82	157,93	99,71	68,76	RS14330	72,01	206,66	298,06	33,50
RS14110	182,61	83,68	45,01	37,57	RS14335	134,84	329,61	390,90	42,52
RS14115	24,00	4,20	8,80	2,68	RS14340	43,57	2,10	2,11	112,25
RS14120	68,86	44,78	108,16	91,25	RS14345	143,84	7,13	1,72	8,30
RS14125	35,40	25,15	64,75	41,34	RS14350	42,05	23,77	19,89	5,45
RS14130	94,12	22,93	11,64	19,86	RS14355	87,01	115,92	168,67	48,81
RS14135	10,56	6,53	4,48	12,68	RS14360	818,48	136,43	85,25	15,00
RS14140	62,91	107,81	86,47	80,13	RS14365	131,77	10,17	3,56	22,21
RS14145	88,10	0,32	0,67	5,42	RS14370	67,91	5,97	1,89	17,60
RS14150	48,94	2,26	1,53	6,05	RS14375	53,16	4,60	1,80	14,39
RS14155	1093,63	436,60	245,01	242,89	RS14380	43,19	4,44	1,23	11,45
RS14160	23,16	27,31	20,36	5,56	RS14385	23,88	2,25	0,56	6,56
RS14165	37,49	66,63	54,97	5,54	RS14390	297,63	76,08	46,18	19,50
RS14170	298,27	892,93	1264,98	46,66	RS14395	151,95	371,08	135,87	12,97
RS14175	70,68	146,60	59,38	12,49	RS14400	181,53	703,09	1164,82	163,03
RS14180	76,95	6,37	9,74	13,92	RS14405	26,99	3,27	1,75	29,51
RS14185	845,56	153,20	113,24	256,62	RS14410	183,18	342,71	287,52	767,62
RS14190	16,82	159,39	138,57	129,63	RS14415	75,60	51,37	48,85	351,96
RS14195	9,80	141,61	118,15	80,64	RS14420	21,31	83,42	175,18	19,03
RS14200	1196,47	195,11	192,83	31,86	RS14425	73,73	36,66	12,64	14,72
RS14205	1757,00	779,28	870,91	97,90	RS14430	127,13	220,96	68,59	20,68
RS14210	1438,47	682,10	723,48	110,36	RS14435	44,38	72,91	32,40	15,26
RS14215	172,00	1392,62	917,50	98,98	RS14440	58,03	53,89	22,13	10,50
RS14220	28,49	48,24	48,98	12,53	RS14445	102,20	3,87	2,57	17,84
RS14225	22,92	32,83	22,41	9,76	RS14450	7,59	0,53	0,03	2,28
RS14230	24,74	43,59	46,02	12,35	RS14455	9,61	0,73	0,17	1,65
RS14235	34,03	27,57	34,49	9,56	RS14460	24,63	3,31	0,71	2,56
RS14240	47,56	8,36	19,64	3,61	RS14465	2,37	2,89	0,93	4,15
RS14245	14,56	5,25	21,63	2,14	RS14470	85,10	361,36	252,79	95,64
RS14250	2852,67	1713,55	1359,71	57,70	RS14475	2,32	0,05	0,00	1,35
RS14255	291,42	83,93	69,46	23,79	RS14480	153,38	10,26	5,13	27,84
RS14260	40,16	24,44	19,10	9,01	RS14485	23,33	46,60	48,77	9,73
RS14265	287,08	193,14	194,87	180,93	RS14490	323,08	3,80	2,66	8,78

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS14495	174,86	1373,67	347,01	425,57	RS14725	61,94	51,68	73,29	27,63
RS14500	5,08	1,57	0,53	329,47	RS14730	4,81	6,38	4,68	3,41
RS14505	6,34	2,08	0,73	473,71	RS14735	8,82	16,45	63,60	35,00
RS14510	7,09	1,82	0,45	521,10	RS14740	133,85	27,34	63,90	57,99
RS14520	98,66	5,36	2,31	4,58	RS14745	86,37	5,68	4,63	7,42
RS14525	172,99	1161,90	2278,48	98,87	RS14750	232,08	133,20	66,26	6,20
RS14530	845,71	171,55	78,57	20,35	RS14755	5,86	4,56	1,55	2,29
RS14535	12,80	2,23	1,72	3,01	RS14760	0,40	0,00	0,13	0,04
RS14540	107,95	13,36	22,30	43,04	RS14770	32,43	57,70	15,73	8,94
RS14545	5,96	0,40	0,45	8,79	RS14775	22,83	2,00	2,52	8,76
RS14550	16,26	7,71	10,20	15,32	RS14780	10,09	0,32	0,17	0,69
RS14555	79,56	59,06	23,84	8,24	RS14785	6,79	0,84	0,43	0,72
RS14560	166,50	0,89	0,63	3,42	RS14790	5,16	1,09	0,37	0,32
RS14565	43,43	450,27	425,62	66,75	RS14795	3,55	1,44	0,55	0,49
RS14570	13,64	1,89	1,20	1,51	RS14800	10,21	0,97	0,74	3,36
RS14575	1,29	0,60	0,16	0,76	RS14805	78,21	12,85	11,73	18,98
RS14580	1,03	0,65	0,44	0,68	RS14810	3,56	0,29	0,19	1,32
RS14585	1,27	0,67	0,37	0,99	RS14815	18,87	0,29	0,36	0,30
RS14590	0,64	0,10	0,22	0,31	RS14820	34,86	0,93	1,01	0,26
RS14595	0,58	0,22	0,16	0,47	RS14825	76,26	1,71	1,58	0,68
RS14600	0,30	0,13	0,38	0,72	RS14830	102,14	2,37	1,41	1,42
RS14605	0,53	0,17	0,09	0,73	RS14835	125,18	8,66	7,99	4,38
RS14610	0,55	0,43	0,39	0,56	RS14840	62,88	5,24	4,06	1,26
RS14615	0,80	0,52	0,47	0,43	RS14845	26,30	0,92	0,75	0,34
RS14620	0,93	0,40	0,57	0,73	RS14850	58,75	4,89	4,44	1,23
RS14625	1,10	0,64	0,77	0,66	RS14855	48,08	9,59	10,07	3,59
RS14630	0,70	1,50	1,04	1,37	RS14860	44,66	5,19	4,81	1,86
RS14635	169,54	361,50	363,51	84,25	RS14865	176,68	6,90	10,34	13,72
RS14640	45,78	428,35	768,23	61,97	RS14870	87,69	2,86	4,26	6,00
RS14645	98,83	19,19	10,11	23,90	RS14875	54,52	0,76	1,99	4,20
RS14650	13,23	10,76	5,92	13,56	RS14880	120,41	4,56	3,42	25,31
RS14655	53,79	6,90	6,28	22,59	RS14885	58,73	7,88	6,39	40,39
RS14660	97,25	16,07	3,17	10,82	RS14890	112,50	36,44	32,54	7,50
RS14665	67,50	4567,68	6832,49	4,16	RS14895	98,62	30,77	25,65	9,15
RS14670	160,58	5659,11	5468,01	14,64	RS14900	50,75	6,33	5,41	3,94
RS14675	759,94	29030,62	34778,69	46,35	RS14905	52,58	6,53	6,46	6,04
RS14680	17,40	40,38	49,77	17,03	RS14910	5,06	21,18	11,71	0,84
RS14685	153,87	2542,80	2389,78	5,77	RS14915	1,94	3,67	4,26	0,77
RS14690	19,54	9,88	7,57	2,32	RS14920	9,75	12,31	14,77	16,81
RS14695	161,97	176,19	198,58	18,02	RS14925	1,49	0,00	0,05	0,41
RS14700	38,86	28,45	14,70	5,01	RS14930	39,27	304,26	188,78	32,55
RS14705	194,41	222,70	177,23	69,30	RS14935	171,53	41,18	51,62	24,97
RS14710	125,88	88,70	51,39	59,54	RS14940	75,93	229,96	326,43	51,83
RS14715	1,88	0,36	0,20	1,50	RS14945	590,86	560,95	2276,84	864,07
RS14720	198,96	137,03	161,48	88,71	RS14950	59,31	86,33	90,69	18,43

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS14955	164,30	547,05	260,79	7,96	RS15185	103,67	38,87	68,67	6,19
RS14960	198,10	101,06	91,76	86,15	RS15190	120,27	178,05	210,48	16,71
RS14965	268,28	164,25	171,24	123,64	RS15195	115,64	7,22	3,25	10,18
RS14970	87,02	52,73	50,46	32,86	RS15200	1202,81	30,72	70,23	123,09
RS14975	14,12	1,16	1,14	578,60	RS15205	2115,79	80,31	145,02	197,39
RS14980	61,37	77,77	67,09	152,03	RS15210	27,32	8,84	5,26	53,98
RS14985	25,07	14,10	11,16	15,40	RS15215	586,04	1792,14	2158,07	201,67
RS14990	665,89	341,82	704,96	51,20	RS15220	0,28	0,21	0,09	0,16
RS14995	434,69	130,41	85,29	13,52	RS15225	0,35	0,36	0,00	0,04
RS15000	115,06	34,89	13,05	30,37	RS15230	118,14	13,76	6,17	6,18
RS15005	54,22	400,19	241,04	17,12	RS15235	64,52	67,08	107,48	10,75
RS15010	245,04	24,24	8,71	16,29	RS15240	58,73	51,84	92,50	12,30
RS15015	129,69	15,55	6,54	9,02	RS15245	49,35	33,86	60,73	12,71
RS15025	21,63	135,64	161,16	129,22	RS15250	47,08	24,48	61,52	11,48
RS15030	84,95	226,19	98,36	16,60	RS15255	16,04	4,13	0,74	1,07
RS15035	78,23	14,79	31,13	9,02	RS15260	8,22	0,59	0,03	0,24
RS15040	548,25	362,37	93,88	208,31	RS15265	4,02	0,30	0,04	0,50
RS15045	498,73	299,06	95,24	126,11	RS15270	4,02	0,14	0,09	0,39
RS15050	1242,15	57,39	39,30	39,92	RS15275	5,79	1,76	0,05	3,74
RS15055	1757,28	106,79	69,31	84,18	RS15280	28,65	6,26	7,70	12,20
RS15060	767,26	74,06	54,32	66,37	RS15285	61,97	2,63	2,74	5,36
RS15065	504,02	52,15	39,76	57,78	RS15290	2147,55	95,73	142,40	126,70
RS15070	355,79	28,91	20,73	47,16	RS15295	77,94	17,26	25,53	41,08
RS15075	117,80	9,19	5,88	17,94	RS15300	11,18	10,49	17,47	2,85
RS15080	231,98	2,73	1,90	24,02	RS15310	1055,67	652,22	448,16	126,50
RS15085	900,14	11,66	5,36	53,59	RS15315	1099,07	607,91	407,25	178,31
RS15090	157,72	4,92	3,24	19,19	RS15320	910,29	325,46	245,40	121,19
RS15095	242,89	3,25	0,68	15,48	RS15325	4785,89	1981,57	1083,19	270,45
RS15100	253,65	262,75	110,01	29,26	RS15330	251,72	646,93	232,64	47,61
RS15105	88,47	7,40	4,86	5,87	RS15335	119,53	13,85	18,53	11,20
RS15110	114,33	331,87	225,27	70,87	RS15340	125,67	6,16	7,37	21,16
RS15115	40,10	113,38	96,06	16,93	RS15345	383,78	472,41	431,89	79,47
RS15120	28,41	16,78	6,14	5,40	RS15350	158,78	232,96	54,98	14,19
RS15125	12,88	5,76	2,45	3,82	RS15355	124,15	242,65	45,76	22,97
RS15130	6,14	1,66	1,18	5,15	RS15360	5,29	0,60	0,20	7,42
RS15135	3,18	1,09	1,61	2,86	RS15365	6,48	3,16	1,27	10,64
RS15140	288,99	292,43	493,88	90,03	RS15370	129,23	50,76	37,86	35,48
RS15145	1055,82	3100,78	2021,97	202,72	RS15375	146,84	62,03	47,79	50,98
RS15150	953,18	2137,17	1117,30	143,81	RS15380	43,27	27,39	20,42	18,05
RS15155	683,58	1344,06	863,58	121,62	RS15385	74,39	156,88	87,52	12,65
RS15160	927,45	1341,81	978,32	153,24	RS15395	108,97	123,89	60,87	16,94
RS15165	304,72	62,68	41,32	29,10	RS15400	93,89	125,75	82,16	11,98
RS15170	73,81	49,54	24,90	14,48	RS15405	252,80	92,56	59,24	22,82
RS15175	59,07	8,41	21,52	10,00	RS15410	116,10	14,68	4,01	13,80
RS15180	99,69	9,10	19,88	10,05	RS15415	1844,11	3049,40	793,75	15,20

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
RS15420	1659,69	2060,04	507,30	20,69	RS15645	135,71	344,88	202,14	38,44
RS15425	1952,54	3913,52	1386,58	28,40	RS15650	7,83	4,66	13,40	12,61
RS15430	1809,21	5391,21	1943,77	23,30	RS15655	82,60	205,86	340,46	76,77
RS15435	6,22	1,61	0,23	1,13	RS15660	15,75	81,92	167,21	75,72
RS15440	201,60	662,29	264,68	22,39	RS15665	136,36	200,47	136,20	23,00
RS15445	1,00	5,37	0,59	0,29	RS15670	41,67	149,28	102,27	40,45
RS15450	33,72	53,57	41,82	26,65	RS15675	145,54	331,97	355,41	42,10
RS15455	183,09	63,59	52,53	10,51	RS15680	90,18	124,90	84,76	33,34
RS15460	20,49	2,29	1,17	0,85	RS15685	67,78	59,20	38,13	34,08
RS15465	24,74	3,55	2,69	7,90	RS15690	79,13	84,55	58,78	43,20
RS15470	16,46	135,41	94,07	4,12	RS15695	58,74	57,37	43,05	24,04
RS15475	8,76	3,71	1,39	2,33	RS15705	25,43	0,34	0,52	35,91
RS15480	7,81	1,93	0,67	2,33	RS15715	28,19	4,06	3,14	7,14
RS15485	6,72	1,25	0,65	1,86	RS15720	14,44	4,54	1,82	3,75
RS15490	17,91	22,79	26,52	14,79	RS15725	272,46	9,92	5,71	3,70
RS15495	13,18	2,39	3,73	6,32	RS15730	159,17	5,40	3,22	1,02
RS15500	5,12	10,04	4,46	7,61	RS15735	65,89	0,91	0,72	1,37
RS15505	10,42	6,02	1,69	6,78	RS15740	3,31	3,61	2,97	0,09
RS15510	127,84	9,51	7,80	25,14	RS15745	56,09	70,48	70,38	28,19
RS15515	100,20	11,89	8,84	18,11	RS15750	50,53	44,49	35,15	21,06
RS15520	985,50	1267,00	449,01	256,79	RS15755	90,61	66,04	49,25	29,95
RS15525	354,49	93,85	33,58	26,60	RS15760	7,76	0,48	0,40	0,00
RS15530	76,89	307,08	205,12	40,54	RS15765	10,17	0,37	0,12	0,32
RS15535	57,56	134,35	92,00	15,64	RS15770	4,29	4,14	1,55	1,12
RS15540	14,63	11,45	14,19	17,91	RS15775	0,50	1,77	0,16	0,09
RS15545	2,36	0,09	0,08	0,83	RS15780	1,39	2,01	1,23	0,30
RS15550	19,62	6,13	9,74	15,32	RS15785	1,65	3,27	1,73	0,35
RS15555	89,85	686,84	704,49	165,71	RS15790	0,98	3,23	1,69	0,84
RS15560	59,41	437,63	758,81	285,06	RS15795	1,08	0,00	0,30	0,00
RS15565	114,28	1221,26	1458,08	380,01	RS15800	1,86	5,22	3,06	0,59
RS15570	29,90	56,07	37,86	52,90	RS15805	0,41	2,72	1,10	0,28
RS15575	46,60	112,15	100,17	53,44	RS15810	0,97	5,92	2,64	0,52
RS15580	314,07	429,25	275,65	84,32	RS15815	1,06	4,93	3,40	0,65
RS15585	223,73	222,77	115,39	51,72	RS15820	0,88	0,75	0,39	0,30
RS15590	74,30	61,79	27,83	12,98	RS15825	0,40	0,28	0,72	0,14
RS15595	206,76	74,99	31,63	36,75	RS15830	1,16	1,28	0,87	0,25
RS15600	242,39	147,67	54,38	51,24	RS15835	19,17	11,30	2,76	0,92
RS15605	19,16	54,02	37,86	1,27	RS15840	0,42	0,20	0,31	0,00
RS15610	39,36	11,78	3,42	41,18	RS15845	1,11	0,44	0,26	1,88
RS15615	6,56	0,00	0,55	2,91	RS15850	0,35	0,16	0,23	0,86
RS15620	448,40	425,84	362,48	119,08	RS15855	3,68	0,35	0,98	1,82
RS15625	145,53	79,74	67,56	36,69	RS15860	9,80	1,37	0,25	4,84
RS15630	516,49	140,68	167,40	58,84	RS15865	39,11	6,40	4,68	22,38
RS15635	120,21	307,36	295,48	60,17	RS15870	34,92	25,43	29,11	20,77
RS15640	92,40	257,29	224,88	45,65	RS15875	47,06	10,59	5,15	42,84

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.	Locus (HNY42_)	Exp. temprana	Exp. tardía	Estac.	Desec.
<i>RS15880</i>	87,71	19,52	19,84	24,49	<i>RS16035</i>	0,82	0,13	0,12	0,35
<i>RS15885</i>	45,09	11,08	7,13	11,21	<i>RS16040</i>	1,52	0,08	0,10	0,18
<i>RS15890</i>	77,96	12,40	38,98	44,78	<i>RS16045</i>	3,16	1,05	0,56	0,48
<i>RS15895</i>	338,90	203,09	233,60	964,08	<i>RS16050</i>	5,23	3,18	1,73	0,74
<i>RS15900</i>	122,47	73,17	45,73	355,63	<i>RS16055</i>	14,20	6,47	2,50	1,54
<i>RS15905</i>	16,73	0,60	0,22	0,78	<i>RS16060</i>	3,34	0,36	0,22	0,14
<i>RS15910</i>	103,77	3,53	1,95	9,65	<i>RS16065</i>	3,90	0,34	0,64	0,33
<i>RS15915</i>	62,05	98,77	50,94	31,71	<i>RS16070</i>	5,18	1,36	1,52	0,89
<i>RS15920</i>	57,44	65,04	112,71	11,37	<i>RS16075</i>	5,42	1,90	1,15	1,16
<i>RS15925</i>	61,04	55,23	58,40	14,60	<i>RS16080</i>	6,84	2,20	1,82	0,96
<i>RS15930</i>	108,58	107,94	116,26	33,26	<i>RS16085</i>	39,26	5,34	3,43	4,31
<i>RS15935</i>	105,48	116,15	129,13	33,07	<i>RS16090</i>	71,94	11,08	6,34	6,45
<i>RS15940</i>	185,34	38,45	21,34	24,80	<i>RS16095</i>	16,53	0,47	0,31	0,28
<i>RS15945</i>	93,84	42,66	53,44	20,29	<i>RS16100</i>	18,88	0,32	0,31	0,61
<i>RS15950</i>	103,50	81,75	75,64	28,51	<i>RS16105</i>	27,75	2,00	2,22	1,65
<i>RS15955</i>	118,17	112,63	113,17	27,15	<i>RS16110</i>	39,07	3,15	2,29	1,67
<i>RS15960</i>	82,38	58,53	102,17	8,33	<i>RS16115</i>	35,47	3,67	1,74	1,28
<i>RS15970</i>	21,56	12,97	21,20	3,86	<i>RS16120</i>	119,78	0,76	0,50	6,64
<i>RS15975</i>	48,61	24,37	45,13	4,62	<i>RS16125</i>	24,95	1,45	0,85	1,17
<i>RS15980</i>	154,76	100,20	135,99	116,99	<i>RS16130</i>	18,99	4,72	3,15	1,43
<i>RS15985</i>	11,70	11,59	4,43	1,66	<i>RS16135</i>	6,60	3,65	3,69	2,57
<i>RS15990</i>	45,12	17,00	16,67	3,01	<i>RS16140</i>	25,92	31,30	22,21	15,10
<i>RS15995</i>	60,15	12,17	11,10	98,79	<i>RS16145</i>	66,38	203,86	118,10	223,98
<i>RS16000</i>	60,08	10,77	7,99	122,51	<i>RS16150</i>	67,20	195,87	114,88	261,80
<i>RS16005</i>	47,22	10,24	9,40	108,82	<i>RS16155</i>	16,77	23,16	3,41	2,75
<i>RS16010</i>	39,89	1,26	5,01	2,11	<i>RS16160</i>	9,74	0,90	1,09	2,56
<i>RS16015</i>	24,78	2,29	5,10	4,67	<i>RS16165</i>	21,17	8,55	6,88	3,81
<i>RS16020</i>	11,51	10,04	2,56	0,27	<i>RS16175</i>	139,10	3,15	2,82	5,49
<i>RS16025</i>	31,09	24,02	23,89	33,65	<i>RS16180</i>	12,79	2,21	1,57	8,73
<i>RS16030</i>	0,50	0,07	0,07	0,15					

X. ANEXOS

Anexo 5. Resultados de RNA-seq del análisis transcriptómico de *Exiguobacterium* sp. Helios cultivado en presencia de acetato o de glucosa. Se muestran los transcritos por millón (TPM) para cada condición.

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS00065	7,17	16,61	RS00275	4,55	70,14	RS00485	4,23	29,58
RS00070	10,99	31,17	RS00280	11,72	53,08	RS00490	210,84	397,66
RS00075	228,81	708,36	RS00285	443,59	191,21	RS00495	5,14	38,12
RS00080	36,47	97,19	RS00290	22,20	33,86	RS00500	78,63	130,81
RS00085	101,99	154,03	RS00295	25,64	27,18	RS00505	3,92	7,37
RS00090	288,15	135,96	RS00300	7,91	80,31	RS00510	10,95	35,04
RS00095	273,28	156,54	RS00305	28,20	160,76	RS00515	765,91	1008,77
RS00100	9,72	52,28	RS00310	9,96	21,86	RS00520	397,40	441,66
RS00105	13,12	71,97	RS00315	489,84	2305,07	RS00525	37,56	73,17
RS00110	64,86	138,53	RS00320	46,46	224,61	RS00530	96,83	214,68
RS00115	147,84	204,84	RS00325	8,12	33,86	RS00535	11,66	42,40
RS00120	321,49	447,58	RS00330	29,09	16,91	RS00540	5,48	17,40
RS00125	82,54	262,91	RS00335	27,64	271,54	RS00545	31,40	61,59
RS00130	204,06	749,81	RS00340	59,02	108,85	RS00550	35,12	203,62
RS00135	117,18	356,15	RS00345	8,44	17,78	RS00555	80,53	608,37
RS00140	50,59	99,01	RS00350	23,07	25,94	RS00560	112,48	550,11
RS00145	10780,94	15595,07	RS00355	77,12	241,69	RS00565	37,75	367,93
RS00150	506,71	511,58	RS00360	46,17	155,56	RS00570	132,26	750,48
RS00155	241,50	456,54	RS00365	21,75	101,36	RS00575	628,53	3231,72
RS00160	148,41	538,28	RS00370	415,90	797,38	RS00580	64,61	387,22
RS00165	826,30	2599,21	RS00375	51,14	81,15	RS00585	224,84	1007,08
RS00170	48,50	1384,20	RS00380	62,35	191,33	RS00590	206,17	881,91
RS00175	410,58	434,12	RS00385	72,33	318,85	RS00595	26,96	60,95
RS00180	78,79	52,49	RS00390	41,17	159,50	RS00600	32,58	129,33
RS00185	12,20	82,89	RS00395	346,44	1351,81	RS00605	43,16	102,46
RS00190	15,59	84,90	RS00400	434,16	1434,88	RS00610	115,49	433,46
RS00195	82,09	191,97	RS00405	80,13	755,88	RS00615	125,30	178,49
RS00200	8,92	121,39	RS00410	484,19	722,79	RS00620	153,58	154,42
RS00205	70,61	421,99	RS00415	11,24	43,74	RS00625	11,73	27,95
RS00210	45,20	168,35	RS00420	95,98	37,19	RS00630	71,57	296,20
RS00215	74,97	334,70	RS00425	73,74	168,28	RS00635	11,17	90,17
RS00220	205,50	514,78	RS00430	26,66	91,76	RS00640	28,54	122,67
RS00225	77,81	190,87	RS00435	12,72	51,52	RS00645	468,85	225,96
RS00230	28,95	123,66	RS00440	18,58	169,44	RS00650	970,17	338,01
RS00235	165,21	410,94	RS00445	64,24	135,40	RS00655	581,18	177,22
RS00240	91,55	136,84	RS00450	47,08	110,06	RS00660	236,43	70,31
RS00245	4,94	58,88	RS00455	74,14	84,10	RS00665	317,18	64,61
RS00250	41,00	80,01	RS00460	51,31	153,26	RS00670	122,83	55,00
RS00255	506,90	2787,44	RS00465	47,93	95,24	RS00675	3,95	37,34
RS00260	34,36	74,96	RS00470	26,00	70,70	RS00680	34,02	153,31
RS00265	9,81	35,97	RS00475	42,40	184,31	RS00685	9,72	22,79
RS00270	12,07	39,04	RS00480	16,34	48,28	RS00690	3,94	50,15

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS00695	0,50	6,37	RS00920	6,85	19,68	RS01150	4,90	43,05
RS00700	12,98	37,34	RS00930	42,59	48,22	RS01155	16,20	79,91
RS00705	15,70	45,86	RS00935	43,09	22,19	RS01160	190,59	227,70
RS00710	25,22	48,44	RS00940	7,49	14,75	RS01165	0,00	20,93
RS00715	301,41	257,79	RS00945	16,75	36,43	RS01170	12,20	72,46
RS00720	27,95	266,33	RS00950	66,54	116,00	RS01175	33,39	155,14
RS00725	26,36	67,94	RS00955	1,75	107,22	RS01180	26,67	98,09
RS00730	26,59	1044,25	RS00960	208,19	198,18	RS01185	38,34	115,44
RS00735	13,87	111,01	RS00965	106,68	387,25	RS01190	53,86	150,69
RS00740	28,26	62,25	RS00970	6,30	37,66	RS01195	18,78	66,17
RS00745	889,66	194,62	RS00975	92,30	382,87	RS01200	18,33	51,86
RS00750	12,66	15,74	RS00980	5,06	29,11	RS01205	9,64	40,86
RS00755	103,82	297,01	RS00985	11,30	83,67	RS01210	54,64	196,47
RS00760	34,37	90,61	RS00990	13,71	26,59	RS01215	229,51	650,28
RS00765	17,92	31,75	RS00995	4,83	37,22	RS01220	102,47	272,86
RS00770	17,90	43,05	RS01000	10,52	49,95	RS01225	17,34	62,98
RS00775	23,25	134,64	RS01005	24,26	190,58	RS01230	6,65	0,00
RS00780	43,87	220,20	RS01010	61,71	354,03	RS01235	1,33	27,69
RS00785	49,84	162,56	RS01015	25,47	106,31	RS01240	62,57	264,63
RS00790	75,69	213,97	RS01020	16,18	49,87	RS01245	210,47	934,24
RS00795	36,97	159,82	RS01025	29,58	128,68	RS01250	53,08	238,74
RS00800	163,43	1739,31	RS01030	67,71	45,67	RS01255	30,92	287,63
RS00805	679,00	749,43	RS01035	78,29	49,30	RS01260	36,93	184,30
RS00810	123,15	216,36	RS01040	17,32	199,45	RS01265	56,05	290,95
RS00815	1122,46	1019,63	RS01045	287,53	339,72	RS01270	554,95	1089,98
RS00820	1353,73	202,30	RS01050	257,47	640,31	RS01275	209,00	400,68
RS00825	37,36	82,71	RS01055	4833,78	9035,26	RS01280	62,65	100,74
RS00830	59,61	158,88	RS01060	102,79	83,64	RS01285	62,95	62,21
RS00835	365,52	254,93	RS01065	455,79	229,39	RS01290	35,83	62,15
RS00840	44,85	64,80	RS01070	654,28	278,42	RS01295	5,64	27,23
RS00845	11,95	59,49	RS01075	4779,06	2455,86	RS01300	22,22	46,16
RS00850	461,19	222,52	RS01080	8,43	15,65	RS01305	30,68	71,65
RS00855	32,09	101,11	RS01085	6,12	95,40	RS01310	31,28	105,59
RS00860	44,98	282,60	RS01090	21,36	69,53	RS01315	0,59	24,93
RS00865	63,02	99,35	RS01095	9,85	76,90	RS01335	39,17	182,15
RS00870	17,74	13,81	RS01100	2,79	8,80	RS01340	56,14	389,36
RS00875	32,71	38,64	RS01105	51,51	214,57	RS01345	69,62	39,75
RS00880	23,32	27,57	RS01110	62,46	153,73	RS01350	32,04	12,54
RS00885	19,73	29,00	RS01115	16,05	60,61	RS01355	27,54	49,72
RS00890	66,93	182,55	RS01120	176,74	669,40	RS01360	20,70	87,90
RS00895	33,54	95,64	RS01125	14,66	78,87	RS01380	10,63	0,00
RS00900	229,72	818,74	RS01130	117,15	401,46	RS01385	33,68	165,58
RS00905	70,99	243,40	RS01135	99,30	426,12	RS01390	135,87	407,07
RS00910	21,90	227,89	RS01140	7,33	16,24	RS01395	2,45	45,47
RS00915	26,80	55,99	RS01145	7,24	9,93	RS01405	9,97	22,30

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS01410	162,18	167,80	RS01730	18,45	91,87	RS02015	125,68	252,90
RS01415	70,18	86,75	RS01735	13,26	32,17	RS02020	108,79	528,68
RS01420	12,86	52,82	RS01800	61,32	16,16	RS02025	47,58	193,36
RS01515	17,48	32,50	RS01805	43,44	16,74	RS02030	35,49	153,06
RS01520	152,57	392,75	RS01810	42,88	34,43	RS02035	58,49	100,73
RS01525	25,46	66,03	RS01815	114,91	126,21	RS02040	50,70	141,00
RS01530	23,33	68,69	RS01820	34,56	90,74	RS02045	73,28	336,81
RS01535	80,40	135,71	RS01825	27,28	44,47	RS02050	25,40	55,42
RS01540	28,16	43,86	RS01830	21,44	39,30	RS02055	56,97	327,14
RS01545	60,97	158,47	RS01835	11,11	4,64	RS02060	30,62	159,94
RS01550	2,82	17,02	RS01840	31,26	37,68	RS02065	23,46	145,00
RS01555	19,48	125,56	RS01845	64,52	101,36	RS02070	102,85	258,94
RS01560	19,89	147,24	RS01850	16,53	52,04	RS02075	257,53	564,27
RS01565	10,23	36,70	RS01855	28,15	52,86	RS02080	129,00	521,45
RS01570	6,65	20,30	RS01860	7,87	39,07	RS02085	54,13	100,63
RS16190	24,22	86,39	RS01865	51,27	115,72	RS02090	31,34	95,21
RS16195	9,18	27,61	RS01870	61,79	76,65	RS02095	19,85	82,20
RS01580	2,65	23,81	RS01875	71,02	56,21	RS02100	35,63	64,06
RS01585	16,73	100,66	RS01880	44,18	76,88	RS02105	44,58	58,46
RS01590	60,83	101,12	RS01885	12,83	48,45	RS02110	29,05	113,96
RS01595	17,75	64,70	RS01890	120,26	281,16	RS02115	28,08	81,87
RS01600	47,46	169,75	RS01895	24,55	68,34	RS02120	14,86	46,37
RS01605	26,02	30,83	RS01900	23,88	314,86	RS02125	55,60	69,38
RS01610	33,90	48,45	RS01905	1,70	51,26	RS02130	27,40	223,88
RS01615	24,49	93,87	RS01910	359,60	1233,28	RS02135	17,35	105,53
RS01620	13,70	39,94	RS01915	475,36	783,54	RS02140	58,72	236,41
RS01625	19,97	75,68	RS01920	62,83	117,16	RS02145	63,03	242,24
RS01630	61,15	305,74	RS01925	42,24	138,43	RS02210	185,66	39,21
RS01635	84,00	157,50	RS01930	114,36	305,15	RS02215	2302,45	744,59
RS01640	120,50	217,67	RS01935	144,35	288,52	RS02220	461,35	109,31
RS01645	89,56	74,67	RS01940	130,48	281,05	RS02225	19,01	82,08
RS01650	138,82	65,07	RS01945	117,15	178,69	RS02230	27,01	125,05
RS01665	15,47	66,07	RS01950	13,37	232,05	RS02235	11,14	134,98
RS01670	38,71	67,56	RS01955	26,81	189,80	RS02240	152,86	1034,51
RS01675	74,10	84,83	RS01960	11,03	85,44	RS02245	406,88	4085,00
RS01680	14,80	73,74	RS01965	46,02	344,69	RS02250	1183,41	3252,50
RS01685	15,54	146,68	RS01970	56,14	237,74	RS02255	15,36	42,36
RS01690	104,94	376,68	RS01975	124,40	522,25	RS02260	14,77	68,83
RS01695	173,76	784,54	RS01980	107,94	309,82	RS02265	29,48	63,23
RS01700	45,64	155,61	RS01985	57,96	187,63	RS02270	52,45	158,59
RS01705	11,41	67,11	RS01990	252,11	1452,65	RS02275	110,87	237,37
RS01710	24,21	115,90	RS01995	31,70	202,57	RS02280	45,06	58,96
RS01715	31,24	131,67	RS02000	40,86	96,32	RS02285	16,57	33,37
RS01720	8,24	69,74	RS02005	51,34	120,99	RS02290	6,36	38,35
RS01725	19,25	129,30	RS02010	92,54	102,56	RS02295	4,72	51,19

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS02300</i>	10,94	64,26	<i>RS02525</i>	53,68	113,14	<i>RS02750</i>	136,19	36,49
<i>RS02305</i>	6,60	38,07	<i>RS02530</i>	45,41	158,54	<i>RS02755</i>	4,70	10,24
<i>RS02310</i>	2,14	44,17	<i>RS02535</i>	35,08	177,51	<i>RS02760</i>	37,76	17,79
<i>RS02315</i>	3,37	27,24	<i>RS02540</i>	48,52	109,14	<i>RS02765</i>	0,00	41,42
<i>RS02320</i>	12,76	176,52	<i>RS02545</i>	61,76	124,36	<i>RS02770</i>	22,53	52,43
<i>RS02325</i>	39,03	115,35	<i>RS02550</i>	84,50	146,95	<i>RS02775</i>	9,38	14,53
<i>RS02330</i>	124,60	289,28	<i>RS02555</i>	33,68	123,71	<i>RS02780</i>	35,96	70,43
<i>RS02335</i>	200,11	819,77	<i>RS02560</i>	26,15	428,36	<i>RS02785</i>	152,22	107,43
<i>RS02340</i>	92,92	155,39	<i>RS02565</i>	14,42	303,21	<i>RS02790</i>	162,97	199,62
<i>RS02345</i>	735,33	951,35	<i>RS02570</i>	0,00	37,17	<i>RS02795</i>	168,21	340,97
<i>RS02350</i>	1209,38	3142,43	<i>RS02575</i>	34,84	117,93	<i>RS02800</i>	26,62	258,91
<i>RS02355</i>	3,71	83,05	<i>RS02580</i>	38,27	66,96	<i>RS02805</i>	18,00	37,36
<i>RS02360</i>	206,87	423,23	<i>RS02585</i>	15,95	120,88	<i>RS02810</i>	17,57	28,92
<i>RS02365</i>	86,76	573,10	<i>RS02590</i>	27,51	151,90	<i>RS02815</i>	50,62	79,16
<i>RS02370</i>	180,63	935,62	<i>RS02595</i>	74,14	72,34	<i>RS02820</i>	12,44	66,38
<i>RS02375</i>	19,01	82,22	<i>RS02600</i>	15,72	33,71	<i>RS02825</i>	17,51	12,73
<i>RS02380</i>	31,71	131,47	<i>RS02605</i>	19,01	40,54	<i>RS02830</i>	576,32	58,76
<i>RS02385</i>	2,35	23,59	<i>RS02610</i>	136,76	150,54	<i>RS02835</i>	43,36	175,35
<i>RS02390</i>	9,64	33,95	<i>RS02615</i>	149,38	93,17	<i>RS02840</i>	13,64	46,17
<i>RS02395</i>	15,51	30,58	<i>RS02620</i>	396,30	1042,58	<i>RS02845</i>	91,62	128,71
<i>RS02400</i>	66,90	147,92	<i>RS02625</i>	169,69	248,05	<i>RS02850</i>	172,19	182,97
<i>RS02405</i>	17,69	44,54	<i>RS02630</i>	78,53	167,56	<i>RS02855</i>	71,75	115,25
<i>RS02410</i>	5,75	58,31	<i>RS02635</i>	37,74	62,85	<i>RS02860</i>	84,44	549,37
<i>RS02415</i>	34,45	65,62	<i>RS02640</i>	69,64	89,90	<i>RS02865</i>	14,67	194,14
<i>RS02420</i>	19,61	115,37	<i>RS02645</i>	29,46	39,46	<i>RS02870</i>	54,45	59,34
<i>RS02425</i>	71,33	213,93	<i>RS02650</i>	27,04	63,10	<i>RS02875</i>	85,04	153,93
<i>RS02430</i>	96,40	266,81	<i>RS02655</i>	15,78	64,50	<i>RS02880</i>	36,62	111,24
<i>RS02435</i>	664,64	1310,48	<i>RS02660</i>	5416,11	1219,81	<i>RS02885</i>	18,96	85,99
<i>RS02440</i>	52,18	291,11	<i>RS02665</i>	3127,14	936,59	<i>RS02890</i>	36,97	102,17
<i>RS02445</i>	73,46	291,91	<i>RS02670</i>	1340,99	352,01	<i>RS16200</i>	151,10	165,54
<i>RS02450</i>	94,18	661,53	<i>RS02675</i>	1359,21	3068,09	<i>RS16205</i>	625,83	512,64
<i>RS02455</i>	40,04	124,00	<i>RS02680</i>	1116,35	4182,27	<i>RS02900</i>	26,77	38,35
<i>RS02460</i>	50,98	103,53	<i>RS02685</i>	37,61	122,34	<i>RS02905</i>	40,75	165,73
<i>RS02465</i>	116,57	687,96	<i>RS02690</i>	3,41	23,11	<i>RS02910</i>	6,46	15,82
<i>RS02470</i>	135,50	798,63	<i>RS02695</i>	17,70	45,03	<i>RS02915</i>	0,00	9,51
<i>RS02475</i>	15,86	36,77	<i>RS02700</i>	10,09	54,54	<i>RS02920</i>	14,12	61,59
<i>RS02480</i>	326,15	1321,81	<i>RS02705</i>	11,69	128,10	<i>RS02925</i>	12,43	31,66
<i>RS02485</i>	155,31	797,72	<i>RS02710</i>	50,47	76,30	<i>RS02930</i>	3,09	37,58
<i>RS02490</i>	13,28	65,34	<i>RS02715</i>	85,61	151,22	<i>RS02935</i>	11,65	110,35
<i>RS02495</i>	260,21	148,76	<i>RS02720</i>	57,66	195,15	<i>RS02940</i>	12,79	68,12
<i>RS02500</i>	63,19	103,46	<i>RS02725</i>	112,33	375,19	<i>RS02945</i>	30,73	158,69
<i>RS02505</i>	15,23	48,79	<i>RS02730</i>	12,75	38,02	<i>RS02950</i>	26,18	235,96
<i>RS02510</i>	286,45	418,77	<i>RS02735</i>	7,11	61,29	<i>RS02955</i>	130,93	302,88
<i>RS02515</i>	148,50	236,98	<i>RS02740</i>	0,71	34,50	<i>RS02960</i>	57,48	218,52
<i>RS02520</i>	226,72	498,51	<i>RS02745</i>	31,50	27,19	<i>RS02965</i>	1,46	24,00

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS02970</i>	14,22	106,71	<i>RS03200</i>	103,93	87,97	<i>RS03420</i>	63,71	44,67
<i>RS02975</i>	61,89	268,09	<i>RS03205</i>	37,35	69,07	<i>RS03425</i>	71,92	66,95
<i>RS02980</i>	55,69	83,63	<i>RS03210</i>	10,22	24,82	<i>RS03430</i>	130,99	90,69
<i>RS02985</i>	31,65	31,27	<i>RS03215</i>	819,21	449,79	<i>RS03435</i>	59,93	52,03
<i>RS02990</i>	83,12	95,71	<i>RS03220</i>	1646,00	1351,88	<i>RS03440</i>	154,71	26,09
<i>RS02995</i>	15,00	72,55	<i>RS03225</i>	35,92	56,69	<i>RS03445</i>	244,17	6,29
<i>RS03000</i>	9,65	54,61	<i>RS03230</i>	21,20	76,76	<i>RS03450</i>	240,38	8,89
<i>RS03005</i>	4,46	20,21	<i>RS03235</i>	3,65	18,83	<i>RS03455</i>	133,00	7,16
<i>RS03010</i>	0,00	9,70	<i>RS03240</i>	4,74	13,91	<i>RS03460</i>	295,63	19,09
<i>RS03015</i>	13,65	100,84	<i>RS03245</i>	8,29	12,50	<i>RS03465</i>	320,49	13,01
<i>RS03020</i>	59,63	407,23	<i>RS03250</i>	11,16	15,33	<i>RS03470</i>	468,33	9,24
<i>RS03030</i>	92,44	411,49	<i>RS03255</i>	29,81	62,89	<i>RS03475</i>	176,87	17,16
<i>RS03035</i>	46,90	110,49	<i>RS03260</i>	2,19	27,22	<i>RS03480</i>	126,12	6,99
<i>RS03040</i>	4,21	10,42	<i>RS03265</i>	13,02	37,57	<i>RS03485</i>	96,96	17,97
<i>RS03045</i>	39,41	102,12	<i>RS03270</i>	3,82	8,90	<i>RS03490</i>	54,54	19,99
<i>RS03050</i>	86,03	385,59	<i>RS03275</i>	9,71	35,40	<i>RS03495</i>	74,25	13,42
<i>RS03055</i>	5,04	40,03	<i>RS03280</i>	8,69	13,05	<i>RS03500</i>	83,26	49,06
<i>RS03060</i>	46,09	134,99	<i>RS03285</i>	20,31	58,21	<i>RS03505</i>	453,90	209,89
<i>RS03065</i>	96,29	228,71	<i>RS03290</i>	14,36	87,82	<i>RS03510</i>	8,51	43,69
<i>RS03070</i>	36,62	40,26	<i>RS03295</i>	49,85	107,84	<i>RS03515</i>	2,02	60,11
<i>RS16210</i>	0,00	17,25	<i>RS03300</i>	506,29	1119,56	<i>RS03520</i>	32,55	166,95
<i>RS03075</i>	18,55	18,61	<i>RS03305</i>	171,89	190,21	<i>RS03525</i>	5,22	25,35
<i>RS03080</i>	8,35	23,46	<i>RS03310</i>	24,75	52,30	<i>RS03530</i>	22,78	29,19
<i>RS03085</i>	6,91	9,25	<i>RS03315</i>	111,52	40,45	<i>RS03535</i>	67,45	365,52
<i>RS03095</i>	193,00	1465,04	<i>RS03320</i>	1322,24	1624,61	<i>RS03540</i>	27,19	162,27
<i>RS03100</i>	100,42	87,32	<i>RS03325</i>	162,39	253,53	<i>RS03545</i>	40,62	128,63
<i>RS03105</i>	27,63	25,06	<i>RS03330</i>	76,30	608,61	<i>RS03550</i>	4,65	16,02
<i>RS03110</i>	98,37	128,08	<i>RS03335</i>	13,27	196,81	<i>RS03555</i>	23,59	51,59
<i>RS03115</i>	86,49	214,80	<i>RS03340</i>	33,74	161,95	<i>RS03560</i>	238,87	453,86
<i>RS03120</i>	78,54	172,18	<i>RS03345</i>	11,05	54,76	<i>RS03565</i>	10,93	55,93
<i>RS03125</i>	18,38	59,73	<i>RS16220</i>	20,44	18,55	<i>RS03570</i>	60,25	294,23
<i>RS03130</i>	2,51	8,03	<i>RS03350</i>	6,78	42,95	<i>RS03575</i>	260,76	1573,94
<i>RS03135</i>	7,18	16,64	<i>RS03355</i>	16,01	11,82	<i>RS03580</i>	91,39	50,15
<i>RS03140</i>	32,94	59,66	<i>RS03360</i>	2,58	31,84	<i>RS03585</i>	250,54	96,06
<i>RS03145</i>	146,64	421,26	<i>RS03365</i>	7,63	36,12	<i>RS03590</i>	710,43	228,41
<i>RS03150</i>	10,16	40,11	<i>RS03370</i>	45,69	103,89	<i>RS03595</i>	26,40	205,47
<i>RS16215</i>	72,97	22,93	<i>RS03375</i>	106,92	195,65	<i>RS03600</i>	24,83	188,00
<i>RS03160</i>	15,85	4,12	<i>RS03380</i>	28,39	68,27	<i>RS03605</i>	14,09	231,43
<i>RS03165</i>	1997,46	429,91	<i>RS03385</i>	21,18	33,40	<i>RS03610</i>	1,89	76,43
<i>RS03170</i>	37,72	48,37	<i>RS03390</i>	38,48	43,95	<i>RS03615</i>	7,47	141,25
<i>RS03175</i>	3,16	9,59	<i>RS03395</i>	31,51	31,22	<i>RS03620</i>	14,81	123,57
<i>RS03180</i>	2,53	4,43	<i>RS03400</i>	42,01	11,06	<i>RS03625</i>	37,38	49,55
<i>RS03185</i>	4,69	20,77	<i>RS03405</i>	46,61	29,83	<i>RS03630</i>	49,79	37,73
<i>RS03190</i>	11,41	36,35	<i>RS03410</i>	12,99	81,14	<i>RS03635</i>	6,65	54,70
<i>RS03195</i>	16,93	36,86	<i>RS03415</i>	49,85	30,78	<i>RS03640</i>	4,69	22,45

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS03645	3,19	53,25	RS03885	60,03	46,81	RS04115	41,07	92,49
RS03650	4,08	50,66	RS03890	59,33	39,82	RS04125	20,56	39,70
RS03655	12,96	71,03	RS03895	22,28	14,40	RS04130	23,29	46,84
RS03660	18,01	159,47	RS03900	15,57	23,33	RS04135	632,55	1061,74
RS03665	9,00	70,93	RS03905	110,40	77,13	RS04140	17,90	48,79
RS03670	39,91	197,62	RS03910	6,21	8,90	RS04145	26,33	80,01
RS03675	71,65	204,94	RS03915	0,00	6,14	RS04150	21,32	62,77
RS03680	64,56	88,99	RS03920	17,62	28,79	RS04155	176,47	1490,65
RS03685	12,96	31,88	RS03925	46,64	59,86	RS04160	405,29	496,41
RS03690	34,39	49,08	RS03930	48,07	107,18	RS04165	143,42	232,26
RS03695	5,77	50,70	RS03935	19,40	75,48	RS04170	73,85	158,08
RS03700	17,58	28,64	RS03940	23,66	75,42	RS04175	308,57	75,47
RS03705	1441,19	795,77	RS03945	12,67	54,12	RS04180	13,69	24,62
RS03710	32,93	126,62	RS03950	33,25	102,73	RS04185	62,39	273,53
RS03715	26,79	38,75	RS03955	24,70	127,54	RS04190	166,09	632,65
RS03735	40,29	63,82	RS03960	135,93	332,27	RS04195	71,85	192,01
RS03740	13,91	39,20	RS03965	27,82	67,06	RS04200	36,84	100,46
RS03745	27,83	87,92	RS03970	291,95	348,27	RS04205	35,05	52,39
RS03750	5,33	22,72	RS03975	602,58	373,43	RS04210	26,31	13,71
RS03755	14,63	41,18	RS03980	19,33	97,38	RS04215	501,84	1049,96
RS03760	0,00	48,51	RS03985	29,16	116,27	RS04220	63,97	146,47
RS03765	6,35	45,66	RS03990	14,86	13,98	RS04225	60,92	127,38
RS03770	8,53	48,70	RS03995	43,84	73,37	RS04230	103,48	258,19
RS03775	9,60	44,27	RS04000	40,30	53,74	RS04235	26,62	108,84
RS03780	1,80	29,36	RS04005	113,45	117,93	RS04240	16,23	40,26
RS03785	4,31	37,58	RS04010	229,23	372,78	RS04245	8234,85	8249,02
RS03790	14,51	21,95	RS04015	181,86	628,19	RS04250	70,82	154,84
RS03795	16,46	50,92	RS04020	1413,14	2599,39	RS04255	89,88	401,75
RS03800	378,16	70,11	RS04025	342,23	423,14	RS04260	18,13	44,08
RS03805	386,25	148,62	RS04030	148,33	36,20	RS04265	28,25	66,88
RS03810	111,88	305,29	RS04035	181,51	746,17	RS04270	28,25	139,41
RS03815	12,22	26,44	RS04040	114,23	148,14	RS04275	16,43	62,37
RS03820	8,53	84,79	RS04045	139,78	208,49	RS04280	36,54	125,87
RS03825	51,66	81,09	RS04050	144,22	155,88	RS04285	150,02	195,16
RS03830	21,66	57,36	RS04055	391,91	368,22	RS04290	64,26	157,82
RS03835	577,69	280,14	RS04060	368,21	844,81	RS04295	1459,02	2053,93
RS03840	263,45	245,27	RS04065	31,84	22,36	RS04300	0,00	184,33
RS03845	9,56	33,64	RS04075	151,36	426,60	RS04305	68,57	121,01
RS03850	21,33	75,38	RS04080	11,63	38,01	RS04310	88,60	253,16
RS03855	0,00	13,30	RS04085	13,49	73,62	RS04315	49,69	112,93
RS03860	364,39	120,28	RS04090	0,00	35,86	RS04320	115,72	301,29
RS03865	193,28	100,28	RS04095	75,98	167,88	RS04325	94,13	373,71
RS03870	2911,35	3651,99	RS04100	110,12	220,24	RS04330	519,27	1934,58
RS03875	726,58	1101,09	RS04105	1,06	14,59	RS04335	343,76	435,24
RS03880	1261,94	2849,29	RS04110	332,53	70,59	RS04340	143,26	306,30

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS04345	6,75	21,30	RS04575	112,84	398,66	RS04800	79,16	154,30
RS04350	3,86	24,07	RS04580	4318,38	7566,28	RS04805	256,45	421,07
RS04355	21,85	201,11	RS04585	2266,79	4305,21	RS04810	49,81	155,28
RS04360	9,69	54,06	RS04590	2919,10	5322,86	RS04905	29,43	278,76
RS04365	24,22	127,71	RS04595	52,24	79,13	RS04910	72,52	438,34
RS04370	28,86	100,96	RS04600	23,40	88,72	RS04915	142,96	503,42
RS04375	49,09	170,87	RS04605	55,74	71,53	RS04920	642,61	1380,35
RS04380	75,41	91,30	RS04610	26,86	24,57	RS04925	296,28	471,19
RS04390	271,06	365,82	RS04615	26,23	42,39	RS04930	380,21	602,88
RS04395	29,65	112,17	RS04620	8,31	28,73	RS04935	142,97	299,25
RS04400	82,80	166,69	RS04625	15,39	51,40	RS04940	104,73	239,57
RS04405	102,33	238,37	RS04630	13,47	28,43	RS04945	84,85	175,82
RS04410	1469,76	60,18	RS04635	3,55	32,44	RS04950	1739,63	6098,38
RS04415	945,55	104,11	RS04640	30,60	95,00	RS04955	442,97	486,27
RS04420	46,51	178,80	RS04645	18,28	49,57	RS04960	307,43	297,32
RS04425	27,35	94,48	RS04650	14,20	50,63	RS04965	420,48	95,70
RS04430	64,49	65,24	RS04655	9,37	47,22	RS04970	10,49	25,44
RS04435	79,10	248,63	RS04660	7,64	30,05	RS04975	51,83	31,08
RS04440	5881,12	15,31	RS04665	33,75	97,38	RS04980	676,35	22,33
RS04445	977,25	2034,64	RS04670	114,46	96,96	RS04985	531,46	643,83
RS04450	35,68	38,35	RS04675	9,82	76,20	RS04990	933,34	150,87
RS04455	40,33	103,31	RS04680	21,99	41,08	RS04995	423,31	86,96
RS04460	13,28	57,57	RS04685	215,11	683,18	RS05000	40,74	78,76
RS04465	22,38	32,50	RS04690	128,05	125,74	RS05005	71,14	181,49
RS04470	14,95	22,28	RS04695	1059,69	2353,48	RS05010	1400,35	1716,80
RS04475	539,91	1018,70	RS04700	7,24	7,15	RS05015	35,32	60,52
RS04480	2,29	43,23	RS04705	28,35	85,48	RS05020	19,63	42,55
RS04485	44,78	87,69	RS04710	21,35	79,61	RS05025	45,26	45,88
RS04490	0,00	54,63	RS04715	11,65	33,81	RS05030	197,75	127,80
RS04495	10,16	86,37	RS04720	67,54	194,89	RS05035	343,63	177,14
RS04500	16,28	35,44	RS04725	44,73	176,06	RS05040	78,71	127,59
RS04505	7,35	28,99	RS04730	47,49	159,61	RS05045	183,90	582,02
RS04510	39,80	67,29	RS04735	57,37	82,21	RS05050	424,96	652,65
RS04515	108,17	146,82	RS04740	64,43	133,57	RS05055	473,30	688,73
RS04520	173,17	178,93	RS04745	154,06	187,14	RS05060	482,68	796,52
RS04525	246,00	280,22	RS04750	164,67	65,60	RS05065	13,66	34,19
RS04530	220,02	55,20	RS04755	105,42	94,37	RS05070	34,06	50,67
RS04535	50,31	104,24	RS04760	7,92	71,04	RS05075	103,05	328,02
RS04540	15,40	212,20	RS04765	15,17	162,84	RS05080	43,93	118,29
RS04545	72,11	652,80	RS04770	238,48	518,12	RS05085	37,75	161,33
RS04550	34,91	69,68	RS04775	1069,33	1673,13	RS05090	22,25	109,06
RS04555	33,00	53,29	RS04780	4,72	15,37	RS05095	36,00	104,14
RS04560	66,70	160,24	RS04785	23,33	18,68	RS05100	23,56	89,40
RS04565	112,02	601,50	RS04790	11,60	39,43	RS05105	54,10	81,67
RS04570	66,25	283,39	RS04795	7,12	50,04	RS05110	54,15	229,29

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS05115</i>	85,92	257,27	<i>RS05340</i>	49,39	69,15	<i>RS05565</i>	29,16	54,42
<i>RS05120</i>	13,04	16,72	<i>RS05345</i>	11,79	27,11	<i>RS05570</i>	45,01	132,79
<i>RS05125</i>	99,10	284,29	<i>RS05350</i>	30,96	43,68	<i>RS05575</i>	4,78	10,25
<i>RS05130</i>	16,31	60,23	<i>RS05355</i>	122,09	214,45	<i>RS05580</i>	32,74	353,90
<i>RS05135</i>	1,28	42,44	<i>RS05360</i>	17,60	33,96	<i>RS05585</i>	8,74	106,27
<i>RS05140</i>	810,39	567,42	<i>RS05365</i>	4,18	32,33	<i>RS05590</i>	119,69	328,13
<i>RS05145</i>	5599,97	3961,81	<i>RS05370</i>	3,96	83,88	<i>RS05595</i>	248,96	245,40
<i>RS05150</i>	825,31	1144,37	<i>RS05375</i>	15,45	263,09	<i>RS05600</i>	12,75	58,78
<i>RS05155</i>	7,12	25,49	<i>RS05380</i>	53,14	238,58	<i>RS05605</i>	28,64	112,56
<i>RS05160</i>	35,56	151,05	<i>RS05385</i>	52,73	126,18	<i>RS05610</i>	8,97	59,19
<i>RS05165</i>	47,99	147,40	<i>RS05390</i>	94,15	245,90	<i>RS05615</i>	10,87	25,75
<i>RS05170</i>	223,06	164,75	<i>RS05395</i>	73,90	120,30	<i>RS05620</i>	8,13	29,69
<i>RS05175</i>	23,33	18,04	<i>RS05400</i>	68,64	98,99	<i>RS05625</i>	18,85	48,45
<i>RS05180</i>	15,95	15,81	<i>RS05405</i>	4,98	50,16	<i>RS05630</i>	7,89	26,47
<i>RS05185</i>	75,49	188,93	<i>RS05410</i>	7,69	17,18	<i>RS05635</i>	14,54	46,36
<i>RS05190</i>	152,27	22,99	<i>RS05415</i>	15,76	11,44	<i>RS05640</i>	56,76	80,34
<i>RS05195</i>	20,91	99,57	<i>RS05420</i>	1,08	17,84	<i>RS05645</i>	21,84	34,94
<i>RS05200</i>	153,95	261,12	<i>RS05425</i>	6,20	57,02	<i>RS05650</i>	574,07	472,77
<i>RS05205</i>	100,26	78,17	<i>RS05430</i>	4,92	36,07	<i>RS05655</i>	305,92	382,61
<i>RS05210</i>	64,52	74,28	<i>RS05435</i>	4,02	50,98	<i>RS05660</i>	2355,99	442,96
<i>RS05215</i>	55,02	146,14	<i>RS05440</i>	66,21	325,63	<i>RS05665</i>	3553,92	871,41
<i>RS05220</i>	62,91	105,56	<i>RS05445</i>	66,97	145,44	<i>RS05670</i>	1147,59	231,51
<i>RS05225</i>	756,82	1739,63	<i>RS05450</i>	25,89	174,12	<i>RS05675</i>	35,14	25,06
<i>RS05230</i>	66,90	166,25	<i>RS05455</i>	21,42	238,46	<i>RS05680</i>	32,90	34,57
<i>RS05235</i>	25,80	63,02	<i>RS05460</i>	28,75	131,49	<i>RS05685</i>	15,16	46,94
<i>RS05240</i>	19,13	40,08	<i>RS05465</i>	13,93	35,76	<i>RS05690</i>	6,71	10,05
<i>RS05245</i>	0,00	25,01	<i>RS05470</i>	23,07	97,87	<i>RS05695</i>	17,77	26,68
<i>RS05250</i>	4,96	26,11	<i>RS05475</i>	27,41	25,72	<i>RS05700</i>	43,64	96,87
<i>RS05255</i>	40,68	80,41	<i>RS05480</i>	88,55	32,16	<i>RS05705</i>	5,15	23,43
<i>RS05260</i>	99,35	170,81	<i>RS05485</i>	58,26	74,70	<i>RS05710</i>	4,82	28,71
<i>RS05265</i>	25,06	104,79	<i>RS05490</i>	28,63	64,89	<i>RS05715</i>	20,42	174,30
<i>RS05270</i>	41,56	68,83	<i>RS05495</i>	8,90	25,18	<i>RS05720</i>	26,53	80,87
<i>RS05275</i>	31,69	41,09	<i>RS05500</i>	11,95	43,78	<i>RS05725</i>	35,17	102,46
<i>RS05280</i>	40,29	37,83	<i>RS05505</i>	23,31	71,46	<i>RS05730</i>	41,44	36,96
<i>RS05285</i>	23,50	47,29	<i>RS05510</i>	7,82	29,73	<i>RS05735</i>	99,26	130,04
<i>RS05290</i>	10,66	15,48	<i>RS05515</i>	69,69	139,01	<i>RS05740</i>	94,41	106,62
<i>RS05295</i>	23,43	84,07	<i>RS05520</i>	39,17	69,78	<i>RS05745</i>	12,47	28,05
<i>RS05300</i>	25,16	58,52	<i>RS05525</i>	29,85	62,57	<i>RS05750</i>	16,31	83,01
<i>RS05305</i>	14,82	99,50	<i>RS05530</i>	20,20	55,58	<i>RS05755</i>	14,69	52,66
<i>RS05310</i>	916,24	6496,62	<i>RS05535</i>	0,98	11,58	<i>RS05760</i>	15,80	58,29
<i>RS05315</i>	63,25	86,76	<i>RS05540</i>	22,58	48,05	<i>RS05765</i>	20,05	61,32
<i>RS05320</i>	68,71	1030,21	<i>RS05545</i>	36,07	111,89	<i>RS05770</i>	17,59	85,84
<i>RS05325</i>	27,46	347,71	<i>RS05550</i>	98,89	436,65	<i>RS05775</i>	68,56	199,07
<i>RS05330</i>	350,37	92,20	<i>RS05555</i>	22,63	79,32	<i>RS05780</i>	281,08	733,60
<i>RS05335</i>	58,69	76,70	<i>RS05560</i>	9,83	97,13	<i>RS05785</i>	58,97	143,96

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS05790	175,89	222,02	RS06025	102,21	253,82	RS06250	1583,14	426,73
RS05795	70,39	155,04	RS06030	108,20	156,03	RS06255	16644,50	1830,34
RS05800	187,69	131,26	RS06035	32,81	115,47	RS06260	55,74	73,85
RS05805	70,46	91,84	RS06040	82,37	218,85	RS06265	76,61	98,82
RS05810	19,17	40,49	RS06045	453,18	710,56	RS06270	25,44	45,43
RS05815	35,60	96,99	RS06050	167,76	154,31	RS06275	28,48	66,65
RS05820	49,07	104,09	RS06055	37,29	54,77	RS06280	36,79	133,94
RS05825	29,78	147,57	RS06060	6,13	25,27	RS06285	44,47	108,45
RS05830	11,00	43,21	RS06065	84,73	130,00	RS06290	354,45	171,05
RS05835	20,21	63,78	RS06070	24,62	34,82	RS06295	63,10	76,95
RS05840	20,16	97,26	RS06075	15,95	4,98	RS06300	28,24	53,82
RS05855	54,51	169,69	RS06080	7,30	29,79	RS06305	1248,34	1655,81
RS05860	152,85	200,49	RS06085	31,59	25,39	RS06310	27,67	99,50
RS05865	92,89	152,59	RS06090	41,66	45,02	RS06315	909,96	1440,74
RS05870	64,51	118,18	RS06095	9,45	17,41	RS06320	57,91	138,85
RS05875	66,59	78,46	RS06100	3,92	6,86	RS06325	38,70	124,69
RS05880	25,67	47,38	RS06105	3,18	21,83	RS06330	11,21	37,03
RS05885	16,37	35,45	RS06110	91,61	66,79	RS06335	156,10	261,88
RS05890	9,16	22,95	RS06115	109,23	122,53	RS06340	54,81	112,40
RS05895	45,63	104,08	RS06120	213,13	184,26	RS06345	88,52	342,32
RS05900	90,49	177,22	RS06125	40,82	50,50	RS06350	210,80	609,05
RS05905	289,49	742,79	RS06130	12,91	28,56	RS06355	178,91	393,90
RS05910	4,28	14,38	RS06135	103,69	79,18	RS06360	15,54	116,84
RS05915	4,16	10,40	RS06140	52,52	48,41	RS06365	985,65	1083,00
RS05920	51,28	715,37	RS06145	30,42	22,30	RS06370	54,62	155,73
RS05925	7,22	26,28	RS06150	47,46	21,24	RS06375	7,13	14,76
RS05930	5,42	40,03	RS06155	13,95	10,79	RS06380	1758,62	189,14
RS05935	0,00	18,54	RS06160	11,57	18,75	RS06385	32,69	342,23
RS05940	14,25	56,40	RS06165	35,98	41,74	RS06390	446,56	1952,03
RS05945	268,21	137,02	RS06170	44,25	28,70	RS06395	102,08	173,93
RS05950	83,63	614,23	RS06175	313,72	131,75	RS06400	70,86	76,71
RS05955	34,89	238,78	RS06180	3,28	69,51	RS06405	18,17	28,07
RS05960	74,72	72,64	RS06185	7,44	38,84	RS06410	6,10	6,43
RS05965	84,21	41,18	RS06190	2,30	25,60	RS06415	32,84	109,20
RS05970	5,56	33,34	RS06195	1,78	53,95	RS06420	46,93	290,20
RS05975	20,93	72,11	RS06200	8,43	56,78	RS06425	112,17	364,65
RS05980	17,67	39,42	RS06205	7,27	44,41	RS06430	38,80	123,61
RS05985	8,20	13,76	RS06210	52,02	83,20	RS06435	41,29	157,89
RS05990	38,23	80,21	RS06215	30,23	53,77	RS06440	10,71	13,12
RS05995	2,47	61,38	RS06220	36,78	44,01	RS06445	15,39	61,00
RS06000	0,00	19,78	RS06225	83,14	124,57	RS06450	15,57	95,86
RS06005	69,43	105,03	RS06230	21,39	83,16	RS06455	426,56	309,83
RS06010	89,42	84,56	RS06235	11,76	26,65	RS06460	42486,51	12699,43
RS06015	82,92	134,25	RS06240	259,64	355,96	RS06465	79768,18	38362,22
RS06020	159,77	306,04	RS06245	2058,93	1793,62	RS06470	217,01	226,47

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS06475	618,78	2572,82	RS06700	28,51	58,05	RS06925	10,49	108,61
RS06480	5,89	64,13	RS06705	40,91	54,32	RS06930	4,38	57,51
RS06485	14,82	92,28	RS06710	21,04	53,61	RS06935	47,38	112,59
RS06490	5,77	37,40	RS06715	12,06	43,57	RS06940	35,86	81,19
RS06495	23,83	63,32	RS06720	18,69	63,16	RS06945	18,15	36,57
RS06500	38,95	98,08	RS06725	23,66	81,28	RS06950	155,83	93,84
RS06505	44,95	168,14	RS06730	1,65	20,19	RS06955	14,49	46,27
RS06510	24,22	93,06	RS06735	11,49	69,20	RS06960	11,10	25,79
RS06515	24,30	65,87	RS06740	3,18	29,54	RS06965	12,01	22,61
RS06520	4,45	38,23	RS06745	1,73	5,77	RS06970	194,01	133,25
RS06525	80,57	108,66	RS06750	49,41	94,19	RS06975	50,23	25,92
RS06530	93,76	113,92	RS06755	29,58	53,17	RS06980	0,00	2,27
RS06535	73,00	183,25	RS06760	9,67	27,05	RS06985	63,36	58,20
RS06540	28,29	166,24	RS06765	357,41	111,01	RS06990	26,71	24,09
RS06545	69,57	134,99	RS06770	246,08	73,14	RS06995	67,41	115,04
RS06550	45,39	66,24	RS06775	254,74	165,63	RS07000	46,00	72,94
RS06555	23,15	84,38	RS06780	13,62	33,76	RS07005	147,48	97,91
RS06560	76,27	66,38	RS06785	9,05	37,49	RS07010	1133,03	736,46
RS06565	51,32	45,82	RS06790	3,82	38,38	RS07015	143,27	33,65
RS06570	142,55	444,65	RS06795	9,95	55,28	RS07020	312,95	102,64
RS06575	19,80	58,77	RS06800	21,25	40,45	RS07025	6554,77	1129,21
RS06580	38,88	46,10	RS06805	45,58	89,67	RS07030	14,63	52,09
RS06585	15,29	65,50	RS06810	14,72	35,00	RS07035	556,56	178,40
RS06590	58,50	144,32	RS06815	0,00	2,76	RS07040	45,07	109,31
RS06595	42,11	103,13	RS06820	305,90	370,39	RS07045	28,99	71,30
RS06600	139,05	110,30	RS06825	10,46	38,57	RS07050	2,64	8,06
RS06605	123,35	1543,01	RS06830	12,46	20,81	RS07055	58,72	90,50
RS06610	36,90	66,11	RS06835	12,73	11,18	RS07060	0,00	40,85
RS06615	14,53	30,92	RS06840	669,69	138,46	RS07065	14,04	120,72
RS06620	25,59	67,49	RS06845	325,45	77,23	RS07070	7,20	86,84
RS06625	12,78	36,99	RS06850	182,27	59,55	RS07075	27,57	102,38
RS06630	10,04	37,85	RS06855	3,45	12,81	RS07080	30,23	35,23
RS06635	23,13	118,67	RS06860	3,76	4,79	RS07085	16,45	59,97
RS06640	19,31	32,41	RS06865	0,00	15,72	RS07090	3,58	13,23
RS06645	33,37	65,22	RS06870	92,30	117,27	RS07095	20,57	63,84
RS06650	25,37	45,99	RS06875	11,24	32,50	RS07100	6,22	21,75
RS06655	22,68	64,04	RS06880	98,38	376,00	RS07105	5,20	58,13
RS06660	4,81	35,80	RS06885	10,31	63,67	RS07110	79,15	101,33
RS06665	13,02	22,96	RS06890	13,14	20,61	RS07115	68,60	164,38
RS06670	23,44	39,09	RS06895	20,61	54,50	RS07120	2995,00	4230,78
RS06675	11,26	26,13	RS06900	139,43	267,96	RS07125	3204,52	6589,68
RS06680	35,32	44,76	RS06905	32,49	127,47	RS07130	567,80	151,60
RS06685	8,05	16,14	RS06910	68,85	577,32	RS07135	331,95	263,95
RS06690	445,83	398,74	RS06915	31,00	145,92	RS07140	57,30	60,11
RS06695	105,75	54,14	RS06920	417,70	357,50	RS07145	12,46	17,85

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS07150</i>	2,62	10,97	<i>RS07375</i>	262,83	146,08	<i>RS07600</i>	19,85	23,16
<i>RS07155</i>	7,63	44,45	<i>RS07380</i>	52,90	46,51	<i>RS07605</i>	113,49	102,97
<i>RS07160</i>	326,54	108,69	<i>RS07385</i>	95,02	101,76	<i>RS07610</i>	763,61	814,12
<i>RS07165</i>	225,62	409,93	<i>RS07390</i>	28,74	36,67	<i>RS07615</i>	261,38	241,90
<i>RS07170</i>	16,53	36,97	<i>RS07395</i>	29,71	80,04	<i>RS07620</i>	112,85	117,33
<i>RS07175</i>	35,42	47,42	<i>RS07400</i>	58,05	57,00	<i>RS07625</i>	158,84	222,34
<i>RS07180</i>	6,02	23,84	<i>RS07405</i>	17,59	41,90	<i>RS07630</i>	857,38	327,74
<i>RS07185</i>	27,40	110,39	<i>RS07410</i>	54,88	96,00	<i>RS07635</i>	3,03	5,45
<i>RS07190</i>	11,50	25,99	<i>RS07415</i>	12,46	79,57	<i>RS07640</i>	8,84	7,31
<i>RS07195</i>	0,00	2,58	<i>RS07420</i>	10,74	72,54	<i>RS07645</i>	6,68	17,21
<i>RS07200</i>	17,72	25,13	<i>RS07425</i>	27,62	89,93	<i>RS07650</i>	11,08	29,08
<i>RS07205</i>	3,55	8,57	<i>RS07430</i>	12,66	81,53	<i>RS07655</i>	449,87	94,26
<i>RS07210</i>	42,20	115,93	<i>RS07435</i>	98,99	110,28	<i>RS07660</i>	46,23	75,64
<i>RS07215</i>	25,82	45,23	<i>RS07440</i>	1023,54	1078,07	<i>RS07665</i>	229,42	565,06
<i>RS07220</i>	75,33	140,20	<i>RS07445</i>	377,02	252,35	<i>RS07670</i>	74,46	148,98
<i>RS07225</i>	165,22	374,27	<i>RS07450</i>	54,38	17,91	<i>RS07675</i>	4898,78	6096,05
<i>RS07230</i>	160,38	284,98	<i>RS07455</i>	16,28	21,45	<i>RS07680</i>	335,20	299,54
<i>RS07235</i>	114,19	143,03	<i>RS07460</i>	8,29	241,70	<i>RS07685</i>	426,90	486,18
<i>RS07240</i>	18,40	98,72	<i>RS07465</i>	13,00	187,18	<i>RS07690</i>	1399,52	1353,54
<i>RS07245</i>	177,12	416,44	<i>RS07470</i>	134,19	865,99	<i>RS07695</i>	202,66	217,83
<i>RS07250</i>	182,90	367,62	<i>RS07475</i>	48,93	689,39	<i>RS07700</i>	59,54	61,82
<i>RS07255</i>	9,33	18,75	<i>RS07480</i>	3,66	30,17	<i>RS07705</i>	55,88	79,69
<i>RS07260</i>	31,63	42,55	<i>RS07485</i>	40,11	60,45	<i>RS07710</i>	123,52	142,47
<i>RS07265</i>	10,88	33,44	<i>RS07490</i>	11,50	28,99	<i>RS07715</i>	71,23	170,12
<i>RS07270</i>	43,78	114,24	<i>RS07495</i>	19,08	55,25	<i>RS07720</i>	14,14	34,28
<i>RS16225</i>	28,22	17,88	<i>RS07500</i>	4,77	25,11	<i>RS07725</i>	24,16	51,75
<i>RS07280</i>	54,59	87,73	<i>RS07505</i>	0,00	8,96	<i>RS07730</i>	40,33	218,15
<i>RS07285</i>	74,01	56,53	<i>RS07510</i>	2,24	27,92	<i>RS07735</i>	6,49	23,38
<i>RS07290</i>	20,48	14,23	<i>RS07515</i>	8,36	72,82	<i>RS07740</i>	0,00	15,92
<i>RS07295</i>	10,12	23,42	<i>RS07520</i>	196,54	181,56	<i>RS07745</i>	0,00	20,19
<i>RS07300</i>	7,26	12,14	<i>RS07525</i>	614,60	900,16	<i>RS07750</i>	3,16	11,30
<i>RS07305</i>	52,90	75,35	<i>RS07530</i>	14,58	89,65	<i>RS07755</i>	6,26	8,75
<i>RS07310</i>	67,40	66,26	<i>RS07535</i>	5,13	107,15	<i>RS07760</i>	52,37	194,67
<i>RS07315</i>	59,71	63,01	<i>RS07540</i>	7,12	36,29	<i>RS07765</i>	17,78	102,80
<i>RS07320</i>	38,83	53,37	<i>RS07545</i>	74,15	258,64	<i>RS07770</i>	11,12	130,07
<i>RS07325</i>	20,46	52,99	<i>RS07550</i>	237,64	357,73	<i>RS07775</i>	56,58	165,01
<i>RS07330</i>	19,02	76,10	<i>RS07555</i>	105,00	100,55	<i>RS07780</i>	22,25	72,61
<i>RS07335</i>	11,68	27,51	<i>RS07560</i>	621,96	230,37	<i>RS07785</i>	65,44	180,24
<i>RS07340</i>	53,07	289,34	<i>RS07565</i>	12,33	22,44	<i>RS07790</i>	62,67	160,28
<i>RS07345</i>	7,70	30,12	<i>RS07570</i>	17,90	101,45	<i>RS07795</i>	7,45	41,37
<i>RS07350</i>	27,51	28,02	<i>RS07575</i>	36,56	146,55	<i>RS07800</i>	67,11	860,06
<i>RS07355</i>	23,98	46,67	<i>RS07580</i>	11,10	91,37	<i>RS07805</i>	48,39	599,64
<i>RS07360</i>	97,81	243,05	<i>RS07585</i>	48,37	309,27	<i>RS07810</i>	12,84	35,98
<i>RS07365</i>	446,51	1395,78	<i>RS07590</i>	40,98	255,64	<i>RS07815</i>	38,59	83,72
<i>RS07370</i>	130,85	565,13	<i>RS07595</i>	38,80	35,80	<i>RS07820</i>	643,98	485,82

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS07825</i>	478,09	551,15	<i>RS08060</i>	7,01	16,30	<i>RS08285</i>	0,00	0,00
<i>RS07830</i>	132,90	146,08	<i>RS08065</i>	6,59	13,33	<i>RS08290</i>	0,00	3,09
<i>RS07835</i>	131,78	264,45	<i>RS08070</i>	5,70	12,44	<i>RS08295</i>	0,00	15,23
<i>RS07840</i>	124,13	96,63	<i>RS08075</i>	25,79	47,34	<i>RS08300</i>	1,93	25,64
<i>RS07845</i>	42,84	108,16	<i>RS08080</i>	126,49	1027,28	<i>RS08305</i>	44,28	32,96
<i>RS07850</i>	7,24	12,54	<i>RS08085</i>	108,15	66,65	<i>RS08310</i>	38,20	39,39
<i>RS07855</i>	3,61	6,79	<i>RS08090</i>	70,23	254,81	<i>RS08315</i>	42,59	70,31
<i>RS07860</i>	19,60	26,21	<i>RS08095</i>	108,10	294,54	<i>RS08320</i>	12,00	32,64
<i>RS07865</i>	9,28	15,31	<i>RS08100</i>	46,47	170,31	<i>RS08325</i>	36,54	33,51
<i>RS07870</i>	14,29	40,00	<i>RS08105</i>	66,83	385,60	<i>RS08330</i>	28,72	58,89
<i>RS07875</i>	20,06	46,22	<i>RS08110</i>	7,98	125,55	<i>RS08335</i>	107,64	253,61
<i>RS07880</i>	32,62	47,94	<i>RS08115</i>	27,95	245,75	<i>RS08340</i>	32,33	109,48
<i>RS07885</i>	16,52	24,31	<i>RS08120</i>	17,34	64,13	<i>RS08345</i>	83,29	264,97
<i>RS07890</i>	30,94	85,72	<i>RS08125</i>	17372,54	2071,34	<i>RS08350</i>	223,51	605,50
<i>RS07895</i>	474,65	168,13	<i>RS08130</i>	2697,78	689,14	<i>RS08355</i>	24,54	86,92
<i>RS07900</i>	677,05	536,35	<i>RS08135</i>	103716,68	22505,53	<i>RS08360</i>	178,08	82,67
<i>RS07905</i>	275,32	303,68	<i>RS08140</i>	72035,46	23093,51	<i>RS08365</i>	176,89	198,20
<i>RS07910</i>	479,40	567,52	<i>RS08145</i>	69,08	90,19	<i>RS08370</i>	88,15	57,76
<i>RS07915</i>	18,40	55,28	<i>RS08150</i>	27,81	49,46	<i>RS08375</i>	26,59	50,42
<i>RS07920</i>	9,65	53,55	<i>RS08155</i>	15,66	28,36	<i>RS08380</i>	32,26	39,63
<i>RS07925</i>	46,66	111,73	<i>RS08160</i>	62,97	54,00	<i>RS08385</i>	6,83	1,46
<i>RS07930</i>	21,42	54,68	<i>RS08165</i>	141,07	107,89	<i>RS08390</i>	31,72	48,49
<i>RS07935</i>	20,70	211,25	<i>RS08170</i>	89,48	137,50	<i>RS08395</i>	47,67	45,89
<i>RS07945</i>	50,91	56,78	<i>RS08175</i>	308,05	662,63	<i>RS08400</i>	48,41	49,32
<i>RS07950</i>	7,36	21,30	<i>RS08180</i>	174,70	294,68	<i>RS08405</i>	77,12	233,00
<i>RS07955</i>	29,94	74,15	<i>RS08185</i>	45,73	143,19	<i>RS16230</i>	9,30	1,87
<i>RS07960</i>	7,86	4,03	<i>RS08190</i>	35,97	114,31	<i>RS16235</i>	1,54	15,84
<i>RS07965</i>	3,14	5,07	<i>RS08195</i>	1,36	39,36	<i>RS08415</i>	0,00	16,54
<i>RS07970</i>	13,77	28,15	<i>RS08200</i>	6,31	18,16	<i>RS08420</i>	10,87	75,90
<i>RS07975</i>	312,94	4,17	<i>RS08205</i>	3,25	18,79	<i>RS08425</i>	12,51	13,71
<i>RS07980</i>	23,13	7,25	<i>RS08210</i>	3,05	86,79	<i>RS08430</i>	67,32	165,90
<i>RS07985</i>	37,44	21,49	<i>RS08215</i>	1,73	9,49	<i>RS08435</i>	16,07	31,36
<i>RS07990</i>	201,07	42,21	<i>RS08220</i>	0,00	6,86	<i>RS08440</i>	11,78	57,71
<i>RS07995</i>	102,55	59,84	<i>RS08225</i>	342,22	574,27	<i>RS08445</i>	2,88	43,30
<i>RS08005</i>	98,73	158,33	<i>RS08230</i>	34,35	141,35	<i>RS08450</i>	96,63	32,00
<i>RS08010</i>	173,37	53,13	<i>RS08235</i>	13,27	106,38	<i>RS08455</i>	19,00	48,16
<i>RS08015</i>	114,94	186,96	<i>RS08240</i>	87,52	99,78	<i>RS08460</i>	27,15	38,90
<i>RS08020</i>	32,27	39,36	<i>RS08245</i>	30,52	57,19	<i>RS08465</i>	31,23	52,27
<i>RS08025</i>	10,99	23,62	<i>RS08250</i>	388,20	179,78	<i>RS08470</i>	77,88	265,22
<i>RS08030</i>	37,85	16,83	<i>RS08255</i>	77,46	103,99	<i>RS08475</i>	186,09	233,61
<i>RS08035</i>	135,25	75,61	<i>RS08260</i>	171,86	556,73	<i>RS08480</i>	7,39	19,16
<i>RS08040</i>	71,13	76,69	<i>RS08265</i>	7,50	23,17	<i>RS08485</i>	36,88	118,85
<i>RS08045</i>	93,75	116,13	<i>RS08270</i>	2,33	16,67	<i>RS08490</i>	851,31	559,25
<i>RS08050</i>	36,49	83,65	<i>RS08275</i>	3,27	10,31	<i>RS08495</i>	12707,46	4066,63
<i>RS08055</i>	14,13	38,94	<i>RS08280</i>	0,00	17,65	<i>RS08500</i>	31422,71	6031,84

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS08505</i>	7,56	48,79	<i>RS08735</i>	63,95	36,44	<i>RS08960</i>	2,98	24,68
<i>RS08510</i>	12,72	70,48	<i>RS08740</i>	33,46	21,71	<i>RS08965</i>	5,57	14,48
<i>RS08515</i>	8,46	51,46	<i>RS16240</i>	9,81	19,63	<i>RS08970</i>	32,01	57,10
<i>RS08520</i>	4,79	23,53	<i>RS08750</i>	24,88	26,34	<i>RS08975</i>	194,95	265,48
<i>RS08525</i>	3,45	12,02	<i>RS08755</i>	10,81	22,62	<i>RS08980</i>	25,79	250,75
<i>RS08530</i>	14,99	26,35	<i>RS08760</i>	8,86	36,29	<i>RS08985</i>	36,59	391,41
<i>RS08535</i>	6,94	62,59	<i>RS08765</i>	30,41	88,32	<i>RS08990</i>	24,53	50,60
<i>RS08540</i>	2229,12	2589,07	<i>RS08770</i>	10,33	85,65	<i>RS08995</i>	6,65	116,12
<i>RS08545</i>	310,89	314,78	<i>RS08775</i>	5,69	13,73	<i>RS09000</i>	12,81	10,86
<i>RS08550</i>	23,25	26,16	<i>RS08780</i>	16,42	65,76	<i>RS09005</i>	17,26	26,44
<i>RS08555</i>	55,63	78,39	<i>RS08785</i>	9,19	30,58	<i>RS09010</i>	2,09	17,99
<i>RS08560</i>	49,23	43,60	<i>RS08790</i>	130,37	93,27	<i>RS09015</i>	13,95	48,22
<i>RS08565</i>	260,67	264,92	<i>RS08795</i>	138,94	226,91	<i>RS09020</i>	56,10	114,19
<i>RS08570</i>	3687,94	241,97	<i>RS08800</i>	145,64	235,53	<i>RS09025</i>	45,49	158,35
<i>RS08575</i>	4597,15	480,67	<i>RS08805</i>	22,25	52,01	<i>RS09030</i>	816,75	1349,36
<i>RS08580</i>	6771,48	1126,99	<i>RS08810</i>	18,56	12,31	<i>RS09035</i>	59,32	204,44
<i>RS08585</i>	33,15	86,42	<i>RS08815</i>	5,92	11,22	<i>RS09040</i>	96,61	326,20
<i>RS08590</i>	21,90	38,35	<i>RS08820</i>	5,06	16,38	<i>RS09045</i>	1677,90	1163,76
<i>RS08595</i>	28,24	66,69	<i>RS08825</i>	130,47	97,77	<i>RS09050</i>	7,71	25,33
<i>RS08600</i>	64,58	38,22	<i>RS08830</i>	86,20	38,25	<i>RS09055</i>	120,93	147,63
<i>RS08605</i>	47,56	35,36	<i>RS08835</i>	65,84	45,17	<i>RS09060</i>	42,69	4,63
<i>RS08610</i>	48,85	113,43	<i>RS08840</i>	11,55	19,41	<i>RS09065</i>	36,37	11,98
<i>RS08615</i>	56,23	99,30	<i>RS08850</i>	15,44	35,72	<i>RS09070</i>	32,88	47,72
<i>RS08620</i>	200,89	240,89	<i>RS08855</i>	9,50	27,06	<i>RS09075</i>	38,50	15,81
<i>RS08625</i>	504,40	386,98	<i>RS08860</i>	1,90	66,95	<i>RS09080</i>	20,25	20,76
<i>RS08635</i>	42,93	176,98	<i>RS08865</i>	6,64	7,88	<i>RS09085</i>	4,41	28,53
<i>RS08640</i>	475,54	753,75	<i>RS08870</i>	17,18	120,88	<i>RS09090</i>	12,68	14,17
<i>RS08645</i>	68,81	143,81	<i>RS08875</i>	19,10	5,87	<i>RS09095</i>	0,00	10,75
<i>RS08650</i>	56,60	99,70	<i>RS16245</i>	0,00	3,48	<i>RS09100</i>	57,91	144,40
<i>RS08655</i>	52,10	50,95	<i>RS08880</i>	13,33	3,71	<i>RS09105</i>	41,65	132,39
<i>RS08660</i>	61,17	88,99	<i>RS08885</i>	13,15	26,65	<i>RS09110</i>	5,97	39,65
<i>RS08665</i>	34,43	50,07	<i>RS08890</i>	11,45	21,59	<i>RS09115</i>	4,22	19,02
<i>RS08670</i>	3628,56	5056,79	<i>RS08895</i>	48,29	90,48	<i>RS09120</i>	14,02	43,99
<i>RS08675</i>	705,07	748,53	<i>RS08900</i>	61,42	63,86	<i>RS09125</i>	6,91	34,00
<i>RS08680</i>	6988,01	7052,59	<i>RS08905</i>	2,54	20,87	<i>RS09130</i>	7154,29	2574,88
<i>RS08685</i>	16,22	83,89	<i>RS08910</i>	8,09	16,85	<i>RS09135</i>	32,23	157,46
<i>RS08690</i>	15,22	87,11	<i>RS08915</i>	12,63	18,86	<i>RS16250</i>	28,73	56,91
<i>RS08695</i>	2402,42	3055,61	<i>RS08920</i>	1540,06	1569,41	<i>RS16255</i>	71,66	124,97
<i>RS08700</i>	12,10	42,75	<i>RS08925</i>	321,59	509,82	<i>RS09145</i>	88,51	153,19
<i>RS08705</i>	24,44	53,27	<i>RS08930</i>	40,50	50,31	<i>RS09150</i>	1776,04	1105,75
<i>RS08710</i>	24,12	60,06	<i>RS08935</i>	17,48	70,79	<i>RS09155</i>	86,30	126,75
<i>RS08715</i>	3,89	26,76	<i>RS08940</i>	7,86	35,52	<i>RS09160</i>	25,63	83,40
<i>RS08720</i>	54,57	102,77	<i>RS08945</i>	8,11	33,15	<i>RS09165</i>	58,61	179,09
<i>RS08725</i>	19,48	11,03	<i>RS08950</i>	23,13	44,20	<i>RS09170</i>	33,99	389,67
<i>RS08730</i>	3,59	14,02	<i>RS08955</i>	3,63	30,14	<i>RS09175</i>	12,97	136,94

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS09180</i>	14,69	128,42	<i>RS09400</i>	107,57	128,88	<i>RS09620</i>	46,97	68,05
<i>RS09185</i>	253,23	404,13	<i>RS09405</i>	31,39	54,99	<i>RS09625</i>	1,10	3,57
<i>RS09190</i>	717,68	876,15	<i>RS09410</i>	7,11	23,87	<i>RS09630</i>	18,35	18,40
<i>RS09195</i>	100,23	471,57	<i>RS09415</i>	11,83	24,64	<i>RS09635</i>	91,03	109,34
<i>RS09200</i>	22,05	233,87	<i>RS09420</i>	18,01	12,54	<i>RS09640</i>	48,22	165,05
<i>RS09205</i>	53,17	74,97	<i>RS09425</i>	15,86	34,10	<i>RS09645</i>	14,54	100,59
<i>RS09210</i>	91,39	121,27	<i>RS09430</i>	15,32	30,26	<i>RS09650</i>	72,67	211,07
<i>RS09215</i>	201,26	313,57	<i>RS09435</i>	24,76	14,19	<i>RS09655</i>	44,81	111,49
<i>RS09220</i>	33,58	14,20	<i>RS09440</i>	79,89	166,24	<i>RS09660</i>	104,76	164,91
<i>RS09225</i>	483,94	848,80	<i>RS09445</i>	0,00	12,28	<i>RS09665</i>	150,61	166,87
<i>RS09230</i>	133,85	250,68	<i>RS09450</i>	4,89	9,35	<i>RS09670</i>	167,78	199,80
<i>RS09235</i>	17,72	189,06	<i>RS09455</i>	0,00	5,32	<i>RS09675</i>	41,22	649,48
<i>RS09240</i>	66,16	157,48	<i>RS09460</i>	13,70	87,36	<i>RS09680</i>	4,03	184,61
<i>RS09245</i>	48,68	223,71	<i>RS09465</i>	8,83	78,47	<i>RS09685</i>	36,18	441,97
<i>RS09250</i>	46,82	89,01	<i>RS09470</i>	20,05	25,16	<i>RS09690</i>	37,35	222,57
<i>RS09255</i>	451,34	342,30	<i>RS09475</i>	22,35	23,12	<i>RS09695</i>	47,14	214,19
<i>RS09260</i>	46,62	188,18	<i>RS09480</i>	34,93	40,60	<i>RS09700</i>	136,68	656,76
<i>RS09265</i>	33,92	175,35	<i>RS09485</i>	101,18	153,03	<i>RS09705</i>	3012,05	4400,60
<i>RS09270</i>	2,89	55,08	<i>RS09490</i>	4,39	4,16	<i>RS09710</i>	497,25	593,09
<i>RS09275</i>	70,80	237,36	<i>RS09495</i>	782,72	1269,33	<i>RS09715</i>	118,22	190,87
<i>RS09280</i>	163,98	322,76	<i>RS09500</i>	394,90	480,61	<i>RS09720</i>	86,20	151,52
<i>RS09285</i>	56555,93	13045,55	<i>RS09505</i>	3071,35	2115,45	<i>RS09725</i>	86,11	249,85
<i>RS09290</i>	2599,91	4829,71	<i>RS09510</i>	1389,69	1657,73	<i>RS09730</i>	92,45	201,81
<i>RS09295</i>	239,93	390,97	<i>RS09515</i>	7,17	45,98	<i>RS09735</i>	274,93	797,95
<i>RS09300</i>	399,37	432,04	<i>RS09520</i>	46,95	150,45	<i>RS09740</i>	89,20	175,29
<i>RS09305</i>	405,70	268,77	<i>RS09525</i>	24,98	98,23	<i>RS09745</i>	259,07	481,42
<i>RS09310</i>	68,54	195,22	<i>RS09530</i>	3,43	25,72	<i>RS09750</i>	435,33	645,15
<i>RS09315</i>	21,46	148,77	<i>RS16270</i>	99,06	128,15	<i>RS09755</i>	24,83	252,53
<i>RS09320</i>	46,62	171,59	<i>RS09535</i>	42,54	44,91	<i>RS09760</i>	6,42	69,47
<i>RS09325</i>	15,97	13,93	<i>RS09540</i>	73,08	115,98	<i>RS09765</i>	16,93	11,92
<i>RS09330</i>	153,88	342,92	<i>RS09545</i>	1639,25	379,13	<i>RS09770</i>	16,21	38,39
<i>RS09335</i>	4,00	9,20	<i>RS09550</i>	2353,43	791,04	<i>RS09775</i>	5,76	37,80
<i>RS09340</i>	5,85	2,24	<i>RS09555</i>	30,71	142,60	<i>RS09780</i>	87,88	45,79
<i>RS09345</i>	24,56	72,16	<i>RS09560</i>	49,30	111,60	<i>RS09785</i>	16,51	124,89
<i>RS09350</i>	3,85	22,37	<i>RS09565</i>	451,71	917,11	<i>RS09790</i>	396,61	393,10
<i>RS09355</i>	18,08	14,75	<i>RS09570</i>	41,82	133,95	<i>RS09795</i>	99,64	69,01
<i>RS09360</i>	2,75	18,50	<i>RS09575</i>	57,78	264,58	<i>RS09800</i>	131,60	181,83
<i>RS16260</i>	112,57	147,82	<i>RS09580</i>	12,11	48,46	<i>RS09805</i>	20,33	8,18
<i>RS16265</i>	172,32	302,16	<i>RS09585</i>	8,09	18,86	<i>RS09810</i>	174,07	103,44
<i>RS09370</i>	17,23	33,93	<i>RS09590</i>	17,47	24,45	<i>RS09815</i>	45,42	74,49
<i>RS09375</i>	51,40	170,35	<i>RS09595</i>	2,83	4,68	<i>RS09820</i>	38,99	54,05
<i>RS09380</i>	116,96	287,16	<i>RS09600</i>	24,06	21,44	<i>RS09825</i>	208,02	722,73
<i>RS09385</i>	48,66	213,75	<i>RS09605</i>	42,44	46,52	<i>RS09830</i>	44,90	99,32
<i>RS09390</i>	22,90	61,40	<i>RS09610</i>	76,81	220,65	<i>RS09835</i>	3462,76	6970,04
<i>RS09395</i>	13,56	41,42	<i>RS09615</i>	23,21	42,99	<i>RS09840</i>	1030,38	748,60

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS09845	340,55	2262,91	RS10070	0,70	1,26	RS10290	113,65	129,76
RS09850	740,82	928,15	RS10075	10,23	42,87	RS10295	82,80	223,67
RS09855	897,21	1428,98	RS10080	21,85	61,10	RS10300	13,56	68,91
RS09860	147,56	485,61	RS10085	24,85	115,89	RS10305	55,19	82,53
RS09865	131,45	418,49	RS10090	7,20	21,57	RS10310	67,33	43,91
RS09870	105,59	419,29	RS10095	1,39	7,20	RS10315	185,02	66,43
RS09875	66,60	128,82	RS10100	107,36	335,64	RS10320	280,96	92,41
RS09880	116,17	232,79	RS10105	179,38	152,22	RS10325	238,09	91,21
RS09885	107,27	466,01	RS10110	0,00	12,81	RS10335	44,27	31,49
RS09890	141,80	123,72	RS10115	13,06	33,22	RS10340	4,36	21,02
RS09895	148,43	1272,75	RS10120	74,97	249,35	RS10345	32,20	63,30
RS09900	74,32	119,41	RS16275	576,76	124,46	RS10350	4,49	3,28
RS09905	45,11	90,64	RS16280	342,11	115,03	RS10355	324,28	38,06
RS09910	650,39	2598,79	RS10130	360,09	76,66	RS10360	328,49	33,38
RS09915	157,15	270,55	RS10135	77,49	35,31	RS10365	84,98	390,76
RS09920	1671,92	1568,40	RS10140	17,89	28,93	RS10370	36,44	298,47
RS09925	283,25	134,90	RS10145	70,52	123,95	RS10375	69,81	36,92
RS09930	339,24	600,51	RS10150	148,87	256,49	RS16285	2002,76	14,04
RS09935	299,64	287,14	RS10155	33,75	101,27	RS10380	668,38	49,51
RS09940	36,70	223,92	RS10160	469,24	553,13	RS10385	216,66	109,06
RS09945	1221,87	1638,97	RS10165	52,52	104,22	RS10390	131,92	74,97
RS09950	99,71	171,06	RS10170	1720,51	334,45	RS10395	24,98	31,99
RS09955	21,89	58,52	RS10175	4260,00	4020,67	RS10400	46,87	62,66
RS09960	23,82	55,97	RS10180	124,84	70,09	RS10405	25,66	26,54
RS09965	20,62	83,91	RS10185	238,36	208,12	RS10410	50,92	112,31
RS09970	57,94	191,88	RS10190	48,98	84,90	RS10415	24,89	37,04
RS09975	44,73	125,39	RS10195	5,66	31,01	RS10420	136,66	126,17
RS09980	13,35	53,20	RS10200	22,89	24,03	RS10425	112,41	324,78
RS09985	4722,71	4493,46	RS10205	92,70	56,90	RS10430	32,28	172,42
RS09990	1331,64	2362,80	RS10210	82,37	130,55	RS10440	0,00	24,39
RS09995	394,38	184,01	RS10215	33,39	3,17	RS10445	57,35	83,46
RS10000	760,54	1011,11	RS10220	201,15	294,63	RS10450	31,79	42,69
RS10005	352,62	259,35	RS10225	439,05	735,10	RS10455	4,06	113,90
RS10010	412,06	398,65	RS10230	1187,88	1820,66	RS10460	33,69	322,69
RS10015	242,16	338,19	RS10235	667,63	1948,25	RS10465	41,78	58,07
RS10020	486,05	324,49	RS10240	24,78	226,48	RS10470	17,73	33,77
RS10025	677,47	412,51	RS10245	26,30	80,93	RS10475	19,90	24,07
RS10030	42,23	140,01	RS10250	377,93	563,72	RS10480	67,37	67,87
RS10035	222,57	530,74	RS10255	337,65	668,19	RS10485	152,70	232,98
RS10040	16,55	25,96	RS10260	54,23	383,63	RS10490	42,31	73,45
RS10045	6,10	33,26	RS10265	18,04	80,70	RS10495	74,98	242,58
RS10050	5,24	13,16	RS10270	62,80	257,13	RS10500	42,84	101,09
RS10055	18,70	60,22	RS10275	117,77	227,95	RS10505	8,30	30,84
RS10060	90,12	198,37	RS10280	72,53	178,25	RS10510	18,82	78,23
RS10065	24,08	101,54	RS10285	53,37	123,34	RS10515	45,25	61,63

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS10520</i>	35,11	81,47	<i>RS10745</i>	116,13	137,90	<i>RS10970</i>	3,65	11,37
<i>RS10525</i>	34,88	51,63	<i>RS10750</i>	14,68	67,43	<i>RS10975</i>	31,66	62,19
<i>RS10530</i>	401,13	526,75	<i>RS10755</i>	10,22	73,44	<i>RS10980</i>	4,92	51,81
<i>RS10535</i>	47,74	28,15	<i>RS10760</i>	34,70	94,48	<i>RS10985</i>	14,42	28,38
<i>RS10540</i>	938,70	140,59	<i>RS10765</i>	22,56	37,11	<i>RS10990</i>	9,68	17,97
<i>RS10545</i>	1363,36	180,96	<i>RS10770</i>	225,33	55,31	<i>RS10995</i>	15,95	34,13
<i>RS10550</i>	12,08	23,30	<i>RS10775</i>	14,66	18,17	<i>RS11000</i>	10,66	34,09
<i>RS10555</i>	60,35	120,73	<i>RS10780</i>	35,62	23,53	<i>RS11005</i>	34,49	53,53
<i>RS10560</i>	28,50	45,52	<i>RS10785</i>	88,58	63,92	<i>RS11010</i>	35,83	51,87
<i>RS10565</i>	345,65	641,55	<i>RS10790</i>	148,35	174,90	<i>RS11015</i>	37,58	98,03
<i>RS10570</i>	3,03	9,00	<i>RS10795</i>	17,01	35,96	<i>RS11020</i>	23,98	62,48
<i>RS10575</i>	22,41	24,85	<i>RS10800</i>	0,00	32,42	<i>RS11025</i>	20,06	57,00
<i>RS10580</i>	14,78	37,25	<i>RS10805</i>	31,82	83,72	<i>RS11030</i>	36,43	61,93
<i>RS10585</i>	150,58	337,97	<i>RS10810</i>	19,82	34,97	<i>RS11035</i>	118,29	209,95
<i>RS10590</i>	106,61	237,40	<i>RS10815</i>	307,65	123,80	<i>RS11040</i>	31,64	40,65
<i>RS10595</i>	44,90	84,08	<i>RS10820</i>	31,48	111,45	<i>RS11045</i>	169,72	189,01
<i>RS10600</i>	49,07	22,65	<i>RS10825</i>	25,74	42,18	<i>RS11050</i>	36,64	20,18
<i>RS10605</i>	49,86	88,30	<i>RS10830</i>	10,11	14,13	<i>RS11055</i>	58,89	28,68
<i>RS10610</i>	54,49	131,33	<i>RS10835</i>	167,47	365,00	<i>RS11060</i>	38,14	41,73
<i>RS10615</i>	35,67	54,84	<i>RS10840</i>	61,13	188,98	<i>RS11065</i>	6,59	20,19
<i>RS10620</i>	61,30	72,48	<i>RS10845</i>	22,19	57,53	<i>RS11070</i>	4,35	49,41
<i>RS10625</i>	79,39	372,39	<i>RS10850</i>	121,48	49,11	<i>RS11075</i>	7,95	22,03
<i>RS10630</i>	6,26	79,63	<i>RS10855</i>	22,41	63,54	<i>RS11080</i>	10,50	56,17
<i>RS10635</i>	24,02	184,33	<i>RS10860</i>	2,51	18,59	<i>RS11085</i>	0,81	21,73
<i>RS10640</i>	19,50	59,93	<i>RS10865</i>	65,30	174,43	<i>RS11090</i>	19,08	52,85
<i>RS10645</i>	14,55	53,24	<i>RS10870</i>	0,00	19,34	<i>RS11095</i>	37,10	112,48
<i>RS10650</i>	22,04	55,54	<i>RS10875</i>	49,69	91,12	<i>RS11100</i>	64,40	184,87
<i>RS10655</i>	3,27	17,42	<i>RS10880</i>	204,21	227,70	<i>RS11105</i>	6,00	31,71
<i>RS10660</i>	5,83	16,71	<i>RS10885</i>	184,95	425,54	<i>RS11110</i>	34,23	83,35
<i>RS10665</i>	8,20	14,67	<i>RS10890</i>	58,32	116,97	<i>RS11115</i>	49,39	82,11
<i>RS10670</i>	17,26	50,13	<i>RS10895</i>	140,29	202,55	<i>RS11120</i>	5,77	66,45
<i>RS10675</i>	5,87	129,20	<i>RS10900</i>	183,31	91,03	<i>RS11125</i>	17,06	37,78
<i>RS10680</i>	401,34	605,23	<i>RS10905</i>	397,43	89,07	<i>RS11130</i>	22,07	114,20
<i>RS10685</i>	111,69	337,52	<i>RS10910</i>	1008,50	232,53	<i>RS11135</i>	47,78	327,79
<i>RS10690</i>	22,27	163,50	<i>RS10915</i>	18,99	41,17	<i>RS11140</i>	7,92	25,58
<i>RS10695</i>	9,90	109,90	<i>RS10920</i>	22,83	24,11	<i>RS11145</i>	24,85	131,12
<i>RS10700</i>	10,14	79,79	<i>RS10925</i>	68,13	95,48	<i>RS11150</i>	4,48	79,38
<i>RS10705</i>	17,62	61,00	<i>RS10930</i>	67,94	152,19	<i>RS11155</i>	12,48	48,65
<i>RS10710</i>	119,71	336,96	<i>RS10935</i>	16,58	31,51	<i>RS11160</i>	9,21	33,34
<i>RS10715</i>	59,41	440,60	<i>RS10940</i>	57,07	92,83	<i>RS11165</i>	12,90	32,01
<i>RS10720</i>	234,69	307,26	<i>RS10945</i>	17,74	40,34	<i>RS11170</i>	6,75	48,66
<i>RS10725</i>	874,04	1078,21	<i>RS10950</i>	29,27	61,10	<i>RS11175</i>	7,69	37,16
<i>RS10730</i>	460,12	688,42	<i>RS10955</i>	18,17	62,06	<i>RS11180</i>	4,31	21,42
<i>RS10735</i>	223,98	153,14	<i>RS10960</i>	3,23	6,96	<i>RS11185</i>	20,89	34,67
<i>RS10740</i>	30,76	70,25	<i>RS10965</i>	5,93	21,51	<i>RS11190</i>	3,01	9,96

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS11195	1,56	13,61	RS11420	26,06	77,47	RS11645	37,83	41,94
RS11200	56,98	27,46	RS11425	10,21	35,06	RS11650	71,89	146,55
RS11205	174,80	178,77	RS11430	7,41	26,58	RS11655	43,75	236,65
RS11210	34,94	59,14	RS11435	37,65	137,49	RS11660	42,11	104,41
RS11215	38,19	48,67	RS11440	17,33	72,47	RS11665	6,28	34,25
RS11220	18,09	43,92	RS11445	108,94	211,30	RS11670	9,57	20,88
RS11225	5,77	31,52	RS11450	79,56	66,56	RS11675	9,69	22,89
RS11230	15,43	55,42	RS11455	77,03	56,15	RS11680	20,19	42,29
RS11235	85,03	177,46	RS11460	88,84	100,11	RS11685	14,42	53,66
RS11240	69,55	100,26	RS11465	1180,76	991,77	RS11690	18,31	65,01
RS11245	75,97	53,02	RS11470	113,70	263,05	RS11695	5,96	20,94
RS11250	4,79	6,75	RS11475	60,21	123,16	RS11700	10,64	29,45
RS11255	5,81	4,42	RS11480	17,04	33,09	RS11705	971,31	279,82
RS11260	1,84	7,57	RS11485	7,31	35,25	RS11710	663,00	287,98
RS11265	17,39	10,34	RS11490	21,66	120,11	RS11715	2304,83	877,52
RS11270	42,21	56,70	RS11495	8,32	113,80	RS11720	1500,88	1053,25
RS11275	143,73	606,41	RS11500	16,11	71,23	RS11725	301,33	483,98
RS11280	23,66	48,56	RS11505	13,40	96,70	RS11730	283,58	270,00
RS11285	10,52	19,24	RS11510	8,76	115,79	RS11735	28,33	92,82
RS11290	51,02	19,21	RS11515	4,84	61,37	RS11740	42,41	74,70
RS11295	222,88	220,89	RS11520	5,15	71,14	RS11745	3,94	17,60
RS11300	252,35	233,27	RS11525	16,80	134,03	RS11750	17,23	63,99
RS11305	20,09	25,71	RS11530	10,98	133,08	RS11755	43,40	305,60
RS11310	6,16	34,24	RS11535	5,63	13,08	RS11760	43,42	208,64
RS11315	0,00	28,91	RS11540	1,31	38,68	RS11765	508,74	2502,78
RS11320	23,14	116,31	RS11545	10,44	34,72	RS11770	218,14	170,03
RS11325	60,00	59,21	RS11550	31,70	52,30	RS11775	180,91	237,44
RS11330	81,22	70,18	RS11555	106,96	126,33	RS11780	25104,18	47042,67
RS11335	77,42	104,60	RS11560	36,97	27,24	RS11785	213,24	353,71
RS11340	592,75	726,90	RS11565	144,27	138,70	RS11790	17,62	77,12
RS11345	128,47	167,14	RS11570	111,58	148,68	RS11795	18,11	59,34
RS11350	10,18	28,94	RS11575	54,65	75,18	RS11800	6827,20	7425,84
RS11355	36,26	49,53	RS11580	124,28	98,79	RS11805	82,74	119,28
RS11360	97,47	62,13	RS11585	87,94	66,96	RS11810	99,71	85,63
RS11365	26,55	25,88	RS11590	25,06	44,22	RS11815	2,29	12,42
RS11370	33,92	32,51	RS11595	17,13	42,25	RS11820	60,45	196,39
RS11375	0,00	13,17	RS11600	16,54	51,15	RS11825	24,08	63,17
RS11380	49,89	131,25	RS11605	11,10	29,70	RS11830	62,58	171,59
RS11385	190,39	159,08	RS11610	5,88	26,67	RS11835	39,82	62,61
RS11390	136,61	94,99	RS11615	24,19	54,87	RS11840	46,42	34,00
RS11395	19,28	22,61	RS11620	56,59	85,73	RS11845	38,34	44,34
RS11400	45,86	56,72	RS11625	92,62	90,69	RS11850	3388,68	3345,09
RS11405	28,09	90,90	RS11630	8,93	33,83	RS11855	44,46	35,14
RS11410	30,58	120,30	RS11635	27,54	107,84	RS11860	44,01	66,56
RS11415	17,31	55,08	RS11640	34,61	54,47	RS11865	28,83	167,29

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS11870	38,68	45,28	RS12095	10,66	49,30	RS12325	93,56	261,41
RS11875	96,00	132,66	RS12100	7,37	21,76	RS12330	6,37	17,91
RS11880	75,02	149,72	RS12105	0,88	2,14	RS12335	61,44	32,19
RS11885	28,67	66,24	RS12110	8,69	53,12	RS12340	67,73	85,27
RS11890	5,84	40,01	RS12115	15,92	16,60	RS12345	7,88	20,60
RS11895	335,74	764,60	RS12120	0,97	8,20	RS12350	19,36	23,75
RS11900	67,62	78,43	RS12125	15,80	28,74	RS12355	12,91	98,89
RS11905	70,90	66,36	RS12130	19,96	32,57	RS12360	6,49	33,08
RS11910	21,10	38,61	RS12135	142,16	44,03	RS12365	0,00	8,01
RS11915	1396,10	641,15	RS12140	196,10	123,41	RS12370	6,52	32,80
RS11920	20,75	37,26	RS12145	310,09	186,81	RS12375	3,19	25,10
RS11925	2436,55	2461,59	RS12150	72,38	155,68	RS12380	0,00	7,94
RS11930	498,86	844,70	RS12155	46,52	289,55	RS12385	5,74	5,01
RS11935	63,12	83,28	RS12160	66,38	318,88	RS12390	24,59	89,08
RS11940	83,91	115,30	RS12165	28,46	141,57	RS12395	9,19	37,70
RS11945	342,65	545,93	RS12170	12,56	49,12	RS12400	18,56	65,86
RS11950	22,08	51,99	RS12175	13,74	38,39	RS12405	44,08	229,33
RS11955	165,98	98,35	RS12180	7,75	48,40	RS12410	7,52	62,78
RS11960	314,37	382,96	RS12185	156,72	642,20	RS12415	147,33	207,91
RS11965	134,21	120,74	RS12190	6,55	14,05	RS12420	9,08	14,13
RS11970	2436,03	5274,91	RS12200	22,56	99,03	RS12425	3,52	31,44
RS11975	490,63	383,21	RS16290	6,34	46,73	RS12430	7,33	12,49
RS11980	100,30	200,08	RS12205	13,34	206,77	RS12435	55,77	108,23
RS11985	224,60	496,93	RS12210	9,19	56,66	RS12440	17,71	77,74
RS11990	46,10	130,46	RS12215	13,12	56,54	RS12445	18,73	100,87
RS11995	70,15	186,83	RS12220	22,21	62,19	RS12450	21,35	66,10
RS12000	78,65	86,06	RS12225	28,87	57,82	RS12455	10,46	48,03
RS12005	28,89	49,64	RS12230	87,91	282,84	RS12460	6,85	66,80
RS12010	89,35	217,82	RS12235	26,56	116,22	RS12465	7,11	34,54
RS12015	27,18	83,65	RS16295	51,69	116,60	RS12470	44,84	103,73
RS12020	55,96	120,53	RS12250	12,88	11,65	RS12475	26,61	80,69
RS12025	1462,08	2096,09	RS12255	108,48	148,51	RS12480	14,78	76,34
RS12030	2785,17	3583,33	RS12260	104,33	74,47	RS12485	45,43	146,10
RS12035	1049,78	247,96	RS12265	71,37	114,48	RS12490	15,81	63,37
RS12040	88,61	127,69	RS12270	7,57	22,57	RS12495	40,52	80,99
RS12045	138,75	122,67	RS12275	27,91	111,06	RS12500	29,18	44,11
RS12050	93,82	246,11	RS12280	4,87	113,91	RS12505	42,76	108,12
RS12055	58,79	161,29	RS12285	4,40	53,69	RS12510	90,69	73,06
RS12060	205,27	239,53	RS12290	29,65	216,25	RS12515	90,37	131,84
RS12065	527,54	979,45	RS12295	17,89	183,00	RS12520	90,15	141,49
RS12070	2269,51	3576,31	RS12300	33,19	335,76	RS12525	40,66	36,02
RS12075	406,24	312,69	RS12305	5,22	82,98	RS12535	20,18	61,84
RS12080	53,86	102,21	RS12310	26,11	106,20	RS12540	13,36	38,14
RS12085	21,10	37,60	RS12315	55,48	104,39	RS12545	6,72	21,05
RS12090	921,39	604,64	RS12320	223,57	498,32	RS12550	11,54	53,24

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS12555</i>	33,36	71,66	<i>RS12780</i>	12,88	27,42	<i>RS13005</i>	14,56	33,09
<i>RS12560</i>	18,27	52,35	<i>RS12785</i>	30,08	29,06	<i>RS13010</i>	20,51	34,02
<i>RS12565</i>	56,19	102,80	<i>RS12790</i>	99,34	220,51	<i>RS13015</i>	6,12	17,92
<i>RS12570</i>	120,03	199,31	<i>RS12795</i>	183,37	302,53	<i>RS13020</i>	7,00	5,34
<i>RS12575</i>	155,23	326,53	<i>RS12800</i>	91,10	430,60	<i>RS13025</i>	11,03	35,44
<i>RS12580</i>	30,69	144,52	<i>RS12805</i>	40,76	112,45	<i>RS13030</i>	17,00	153,09
<i>RS12585</i>	1589,55	504,66	<i>RS12810</i>	136,61	64,72	<i>RS13035</i>	0,61	88,08
<i>RS12590</i>	195,54	1828,33	<i>RS12815</i>	0,00	23,74	<i>RS13040</i>	84,74	277,27
<i>RS12595</i>	292,22	602,77	<i>RS12820</i>	36,05	83,20	<i>RS13045</i>	166,47	103,40
<i>RS12600</i>	115,65	181,45	<i>RS12825</i>	42,63	145,37	<i>RS13050</i>	60,63	171,92
<i>RS12605</i>	41,07	149,21	<i>RS12830</i>	23,28	48,38	<i>RS13055</i>	77,71	118,50
<i>RS12610</i>	2766,21	272,29	<i>RS12835</i>	1,00	7,57	<i>RS13060</i>	21,44	94,44
<i>RS12615</i>	1740,85	146,03	<i>RS12840</i>	121,74	120,65	<i>RS13065</i>	12,15	95,67
<i>RS12620</i>	894,50	9,97	<i>RS12845</i>	84,90	99,99	<i>RS13070</i>	7,76	93,15
<i>RS12625</i>	526,33	28,47	<i>RS12850</i>	927,13	1808,54	<i>RS13075</i>	20,31	73,10
<i>RS12630</i>	37,43	75,29	<i>RS12855</i>	21,62	66,56	<i>RS13080</i>	39,93	51,02
<i>RS12635</i>	143,53	222,80	<i>RS12860</i>	5623,16	8781,42	<i>RS13085</i>	66,87	83,05
<i>RS12640</i>	111,73	101,82	<i>RS12865</i>	92,73	66,90	<i>RS13090</i>	27,77	75,28
<i>RS12645</i>	15,19	65,42	<i>RS12870</i>	14,69	62,73	<i>RS13095</i>	11,50	87,36
<i>RS12650</i>	16,13	61,29	<i>RS12875</i>	19,42	65,13	<i>RS13100</i>	90,11	75,28
<i>RS12655</i>	39,24	49,61	<i>RS12880</i>	229,10	155,07	<i>RS13105</i>	93,38	246,27
<i>RS12660</i>	1007,33	1553,58	<i>RS12885</i>	12,08	115,30	<i>RS13110</i>	102,69	122,68
<i>RS12665</i>	50,25	135,64	<i>RS12890</i>	41,76	144,55	<i>RS13115</i>	9,08	142,66
<i>RS12670</i>	5,24	40,55	<i>RS12895</i>	19,22	60,41	<i>RS13120</i>	39,82	212,32
<i>RS12675</i>	17,01	37,18	<i>RS12900</i>	2,45	41,29	<i>RS13125</i>	230,18	955,62
<i>RS12680</i>	6,56	26,51	<i>RS12905</i>	233,34	534,13	<i>RS13130</i>	20,28	57,11
<i>RS12685</i>	3,97	18,16	<i>RS12910</i>	167,90	436,36	<i>RS13135</i>	24,84	55,93
<i>RS12690</i>	27,86	71,81	<i>RS12915</i>	75,43	128,37	<i>RS13140</i>	17,27	43,60
<i>RS12695</i>	36,82	85,74	<i>RS12920</i>	10,34	34,56	<i>RS13145</i>	149,85	182,48
<i>RS12700</i>	6,73	39,49	<i>RS12925</i>	9,79	29,23	<i>RS13150</i>	41,38	174,15
<i>RS12705</i>	130,03	268,17	<i>RS12930</i>	10,43	29,73	<i>RS13155</i>	259,09	984,98
<i>RS12710</i>	170,45	191,24	<i>RS12935</i>	26,84	56,41	<i>RS13160</i>	227,93	218,71
<i>RS12715</i>	35,65	190,36	<i>RS12940</i>	48,05	45,73	<i>RS13165</i>	131,11	172,79
<i>RS12720</i>	50,69	68,59	<i>RS12945</i>	280,26	40,55	<i>RS13170</i>	49,85	94,99
<i>RS12725</i>	41,40	59,67	<i>RS12950</i>	33,49	35,19	<i>RS13175</i>	213,23	38,13
<i>RS12730</i>	82,92	168,91	<i>RS12955</i>	23,47	37,09	<i>RS13180</i>	145,28	58,34
<i>RS12735</i>	11,28	34,10	<i>RS12960</i>	42,19	277,08	<i>RS13185</i>	46,15	56,65
<i>RS12740</i>	18,77	41,51	<i>RS12965</i>	9,56	65,89	<i>RS13190</i>	53,71	49,84
<i>RS12745</i>	27,55	86,41	<i>RS12970</i>	66,93	155,76	<i>RS13195</i>	38,56	105,01
<i>RS12750</i>	24,42	49,03	<i>RS12975</i>	14,66	55,63	<i>RS13200</i>	152,64	158,04
<i>RS12755</i>	12,38	36,29	<i>RS12980</i>	133,34	181,14	<i>RS13205</i>	13,41	22,37
<i>RS12760</i>	379,22	30,16	<i>RS12985</i>	188,53	434,14	<i>RS13210</i>	175,42	375,30
<i>RS12765</i>	22,61	23,08	<i>RS12990</i>	6886,90	21415,65	<i>RS13215</i>	82,50	154,67
<i>RS12770</i>	39,62	36,31	<i>RS12995</i>	67,59	90,63	<i>RS13220</i>	31,94	78,53
<i>RS12775</i>	48,84	40,25	<i>RS13000</i>	19,83	27,72	<i>RS13225</i>	3,72	209,58

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS13230</i>	7,82	141,53	<i>RS13455</i>	14,00	51,30	<i>RS13675</i>	16,82	75,44
<i>RS13235</i>	4,26	30,19	<i>RS13460</i>	34,22	48,27	<i>RS13680</i>	23,32	66,71
<i>RS13240</i>	7,61	18,57	<i>RS13465</i>	12,96	26,27	<i>RS13685</i>	14,69	34,40
<i>RS13245</i>	5,76	31,68	<i>RS13470</i>	6,69	22,68	<i>RS13690</i>	19,08	39,20
<i>RS13250</i>	9,53	29,78	<i>RS13475</i>	13,84	21,56	<i>RS13695</i>	0,00	0,00
<i>RS13255</i>	0,00	2,73	<i>RS13480</i>	4,99	46,67	<i>RS13700</i>	24,92	34,77
<i>RS13260</i>	880,29	1645,46	<i>RS13485</i>	71,23	111,79	<i>RS13705</i>	20,00	10,75
<i>RS13265</i>	66,06	73,94	<i>RS13490</i>	206,92	232,05	<i>RS13710</i>	25,70	10,69
<i>RS13270</i>	12,44	17,05	<i>RS13495</i>	385,83	411,79	<i>RS13715</i>	11,56	11,76
<i>RS13275</i>	21,08	78,55	<i>RS13500</i>	204,16	11,07	<i>RS13720</i>	48,51	62,44
<i>RS13280</i>	38,44	59,00	<i>RS13505</i>	368,85	16,50	<i>RS13725</i>	32,52	39,99
<i>RS13285</i>	42,28	88,26	<i>RS13510</i>	977,85	20,36	<i>RS13730</i>	8,81	6,41
<i>RS13290</i>	295,10	84,32	<i>RS13515</i>	87,52	174,90	<i>RS13735</i>	51,24	162,33
<i>RS13295</i>	16,67	84,93	<i>RS13520</i>	283,31	272,80	<i>RS13740</i>	65,36	240,93
<i>RS13300</i>	31,05	28,90	<i>RS13525</i>	227,82	73,85	<i>RS13745</i>	30,99	131,23
<i>RS13305</i>	59,17	125,67	<i>RS13530</i>	10,55	25,44	<i>RS13750</i>	112,19	850,98
<i>RS13310</i>	52,30	77,98	<i>RS13535</i>	58,18	114,20	<i>RS13755</i>	104,84	504,49
<i>RS13315</i>	142,49	393,22	<i>RS16300</i>	18,23	41,61	<i>RS13760</i>	82,83	759,25
<i>RS13320</i>	71,30	117,01	<i>RS16305</i>	14,21	17,19	<i>RS13765</i>	49,35	61,31
<i>RS13325</i>	80,74	130,88	<i>RS13545</i>	17,20	48,68	<i>RS13770</i>	67,41	57,41
<i>RS13330</i>	22,57	41,19	<i>RS13550</i>	12,49	19,89	<i>RS13780</i>	188,85	224,89
<i>RS13335</i>	63,69	56,48	<i>RS13555</i>	8,63	21,95	<i>RS13785</i>	0,00	12,13
<i>RS13340</i>	82,77	156,37	<i>RS13560</i>	14,12	38,99	<i>RS13790</i>	8,33	117,70
<i>RS13345</i>	71,52	218,32	<i>RS13565</i>	6,24	29,07	<i>RS13795</i>	8,59	41,08
<i>RS13350</i>	133,85	269,91	<i>RS13570</i>	6,26	23,59	<i>RS13800</i>	12,34	101,17
<i>RS13355</i>	52,47	457,31	<i>RS13575</i>	2,04	16,61	<i>RS13805</i>	63,91	244,46
<i>RS13360</i>	78,89	587,32	<i>RS13580</i>	118,62	490,45	<i>RS13810</i>	33,95	122,52
<i>RS13365</i>	47,19	218,64	<i>RS13585</i>	891,11	1735,75	<i>RS13815</i>	13,85	139,88
<i>RS13370</i>	26,12	156,38	<i>RS13590</i>	18,34	42,00	<i>RS13820</i>	13,57	105,22
<i>RS13375</i>	127,26	445,66	<i>RS13595</i>	0,00	5,40	<i>RS13825</i>	0,95	25,49
<i>RS13380</i>	137,54	563,59	<i>RS13600</i>	0,00	10,74	<i>RS13830</i>	21,51	151,63
<i>RS13385</i>	678,24	771,19	<i>RS13605</i>	24,13	69,91	<i>RS13835</i>	4,64	68,87
<i>RS13390</i>	101,19	295,63	<i>RS13610</i>	6,00	8,36	<i>RS13840</i>	281,55	884,58
<i>RS13395</i>	72,15	112,15	<i>RS13615</i>	18,64	29,21	<i>RS13845</i>	1533,83	294,45
<i>RS13400</i>	26,30	88,83	<i>RS16310</i>	2,20	27,99	<i>RS13850</i>	122,77	126,16
<i>RS13405</i>	58,68	153,46	<i>RS13625</i>	98,80	257,23	<i>RS13855</i>	54,98	63,65
<i>RS13410</i>	17,13	119,71	<i>RS13630</i>	30,56	97,79	<i>RS13860</i>	69,36	124,90
<i>RS13415</i>	42,67	78,55	<i>RS13635</i>	74,08	313,43	<i>RS13865</i>	38,43	44,59
<i>RS13420</i>	72,74	130,87	<i>RS13640</i>	105,36	187,61	<i>RS16315</i>	16,44	31,22
<i>RS13425</i>	70,61	64,62	<i>RS13645</i>	15,18	21,14	<i>RS13870</i>	66,47	30,15
<i>RS13430</i>	250,49	164,95	<i>RS13650</i>	49,16	54,68	<i>RS13875</i>	33,82	31,35
<i>RS13435</i>	202,87	105,90	<i>RS13655</i>	34,40	25,86	<i>RS13880</i>	60,04	325,45
<i>RS13440</i>	102,21	117,05	<i>RS13660</i>	51,36	17,75	<i>RS13885</i>	103,26	186,46
<i>RS13445</i>	20,72	35,50	<i>RS13665</i>	12,76	12,54	<i>RS13890</i>	28,31	43,55
<i>RS13450</i>	44,95	101,71	<i>RS13670</i>	15,71	15,62	<i>RS13895</i>	9,20	29,14

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS13900	3,42	9,56	RS14120	216,56	338,83	RS14345	80,23	41,80
RS13905	42,99	48,88	RS14125	41,22	112,64	RS14350	43,27	151,53
RS13910	169,67	262,93	RS14130	44,75	242,04	RS14355	342,46	913,76
RS13915	473,99	276,86	RS14135	21,67	188,42	RS14360	39,58	85,88
RS13920	27,92	123,98	RS14140	12,29	56,24	RS14365	36,94	60,38
RS13925	19,64	140,33	RS14145	1,91	34,02	RS14370	27,74	115,81
RS13930	2,64	29,86	RS14150	12,93	78,23	RS14375	72,18	146,59
RS13935	1,95	80,37	RS14155	453,76	1978,16	RS14380	24,94	48,67
RS13940	18,25	96,23	RS14160	447,25	194,47	RS14385	42,50	72,61
RS13945	8,70	74,03	RS14165	24,82	109,76	RS14390	22,06	18,33
RS13950	48,46	437,02	RS14170	166,58	174,99	RS14395	62,01	150,21
RS13955	187,30	972,74	RS14175	268,42	390,04	RS14400	44,93	64,22
RS13960	239,34	218,41	RS14180	507,46	1420,25	RS14405	37,67	161,62
RS13965	77,90	50,97	RS14185	4605,79	1063,99	RS14410	39,57	60,92
RS13970	25,65	9,83	RS14190	791,17	746,84	RS14415	41,14	53,57
RS13975	51,69	43,06	RS14195	447,32	487,36	RS14420	10,02	60,36
RS13980	27,68	39,14	RS14200	604,90	339,39	RS14425	239,97	423,07
RS13985	452,61	274,99	RS14205	467,27	241,06	RS14430	50,38	149,53
RS13990	32,80	62,72	RS14210	653,64	322,88	RS14435	34,29	57,96
RS13995	12,90	55,50	RS14215	405,36	2777,25	RS14440	40,38	53,09
RS14000	2266,07	490,10	RS14220	337,28	5914,70	RS14445	86,44	387,49
RS14005	15,29	44,77	RS14225	185,11	3473,77	RS14450	91,91	115,11
RS14010	30,61	186,07	RS14230	52,40	1744,55	RS14455	42,36	54,98
RS14015	218,00	333,54	RS14235	43,02	1324,36	RS14460	13,30	50,13
RS14020	166,85	953,15	RS14240	54,95	2483,38	RS14465	21,00	86,70
RS14025	102,37	1109,51	RS14245	26,82	746,39	RS14470	104,59	104,05
RS14030	20,79	45,15	RS14250	150,29	867,78	RS14475	81,18	150,12
RS14035	14,15	77,21	RS14255	1449,31	2815,94	RS14480	48,72	76,38
RS14040	18,73	109,16	RS14260	4,71	131,47	RS14485	50,72	128,37
RS14045	13,44	94,32	RS14265	129,70	221,88	RS14490	37,94	61,18
RS14050	40,96	83,62	RS14270	93,56	349,28	RS14495	23,77	51,83
RS14055	0,00	30,90	RS14275	64,74	107,48	RS14500	1,46	19,94
RS14060	1,74	11,12	RS14280	26,41	43,61	RS14505	3,30	8,46
RS14065	65,47	108,06	RS14285	7,68	10,68	RS14510	34,43	61,94
RS14070	97,44	241,37	RS14290	3,00	24,46	RS14520	3,22	63,31
RS14075	19,83	44,14	RS14295	2,89	14,69	RS14525	269,00	1091,46
RS14080	6,70	48,36	RS14300	12,39	32,30	RS14530	106,99	151,70
RS14085	144,15	142,55	RS14305	2,98	38,29	RS14535	33,12	100,40
RS16320	53,56	80,78	RS14310	12,52	63,10	RS14540	60,44	102,74
RS16325	170,56	146,62	RS14315	26,28	46,32	RS14545	12,47	35,99
RS14095	66,16	134,08	RS14320	31,57	39,03	RS14550	4,97	6,58
RS14100	13,60	84,11	RS14325	212,48	229,10	RS14555	115,86	369,66
RS14105	15,44	54,63	RS14330	104,12	375,11	RS14560	0,00	12,51
RS14110	42,57	72,21	RS14335	21,81	66,45	RS14565	7,57	61,62
RS14115	63,03	125,37	RS14340	19,72	44,10	RS14570	7,65	217,79

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS14575</i>	8,57	61,83	<i>RS14800</i>	20,09	37,58	<i>RS15025</i>	252,54	145,88
<i>RS14580</i>	1,61	29,48	<i>RS14805</i>	352,12	377,07	<i>RS15030</i>	44,65	59,54
<i>RS14585</i>	6,47	34,35	<i>RS14810</i>	24,95	28,23	<i>RS15035</i>	7,92	37,99
<i>RS14590</i>	33,85	53,19	<i>RS14815</i>	7,26	20,32	<i>RS15040</i>	116,87	187,21
<i>RS14595</i>	29,50	21,77	<i>RS14820</i>	135,14	152,69	<i>RS15045</i>	650,70	784,76
<i>RS14600</i>	12,39	36,65	<i>RS14825</i>	19,39	30,03	<i>RS15050</i>	1,85	33,16
<i>RS14605</i>	3,53	31,00	<i>RS14830</i>	21,18	53,20	<i>RS15055</i>	33,28	82,78
<i>RS14610</i>	6,35	34,99	<i>RS14835</i>	24,59	51,67	<i>RS15060</i>	24,61	54,70
<i>RS14615</i>	18,25	89,02	<i>RS14840</i>	26,37	53,45	<i>RS15065</i>	28,96	54,12
<i>RS14620</i>	68,92	214,94	<i>RS14845</i>	12,81	20,20	<i>RS15070</i>	62,85	127,92
<i>RS14625</i>	20,85	85,24	<i>RS14850</i>	22,36	42,46	<i>RS15075</i>	2,33	47,10
<i>RS14630</i>	35,55	111,95	<i>RS14855</i>	26,09	69,77	<i>RS15080</i>	127,37	275,05
<i>RS14635</i>	890,81	548,71	<i>RS14860</i>	52,22	65,29	<i>RS15085</i>	1395,97	3817,09
<i>RS14640</i>	355,29	274,11	<i>RS14865</i>	16,23	49,81	<i>RS15090</i>	2478,08	7357,12
<i>RS14645</i>	390,18	700,61	<i>RS14870</i>	11,46	34,41	<i>RS15095</i>	816,62	2527,71
<i>RS14650</i>	168,88	423,57	<i>RS14875</i>	4,11	22,22	<i>RS15100</i>	16,57	40,25
<i>RS14655</i>	299,32	404,98	<i>RS14880</i>	2251,99	2478,93	<i>RS15105</i>	11,25	81,29
<i>RS14660</i>	409,52	286,58	<i>RS14885</i>	21,80	44,46	<i>RS15110</i>	19,34	62,05
<i>RS14665</i>	89,17	141,86	<i>RS14890</i>	120,04	211,49	<i>RS15115</i>	10,53	13,57
<i>RS14670</i>	46,72	195,80	<i>RS14895</i>	42,20	47,59	<i>RS15120</i>	9,80	70,87
<i>RS14675</i>	132,67	468,31	<i>RS14900</i>	26,98	58,64	<i>RS15125</i>	12,49	103,64
<i>RS14680</i>	2506,76	20935,19	<i>RS14905</i>	31,98	126,69	<i>RS15130</i>	16,82	58,54
<i>RS14685</i>	330,70	282,28	<i>RS14910</i>	33,38	34,32	<i>RS15135</i>	40,12	87,24
<i>RS14690</i>	0,00	47,99	<i>RS14915</i>	3,59	24,66	<i>RS15140</i>	20,96	46,09
<i>RS14695</i>	1258,25	1987,06	<i>RS14920</i>	90,02	26,39	<i>RS15145</i>	164,34	351,66
<i>RS14700</i>	15,46	68,56	<i>RS14925</i>	6,03	19,07	<i>RS15150</i>	89,78	180,73
<i>RS14705</i>	8,80	32,17	<i>RS14930</i>	13,59	23,62	<i>RS15155</i>	126,04	203,28
<i>RS14710</i>	190,40	461,65	<i>RS14935</i>	110,68	289,10	<i>RS15160</i>	147,66	271,16
<i>RS14715</i>	57,59	109,69	<i>RS14940</i>	44,62	263,61	<i>RS15165</i>	15,39	60,40
<i>RS14720</i>	41,40	23,82	<i>RS14945</i>	43,61	137,84	<i>RS15170</i>	13,56	28,79
<i>RS14725</i>	13,56	20,17	<i>RS14950</i>	59,50	45,22	<i>RS15175</i>	98,96	177,22
<i>RS14730</i>	183,68	362,41	<i>RS14955</i>	42,49	95,31	<i>RS15180</i>	10,84	49,54
<i>RS14735</i>	36,05	158,91	<i>RS14960</i>	36,56	18,42	<i>RS15185</i>	30,87	110,11
<i>RS14740</i>	76,55	79,00	<i>RS14965</i>	5,33	8,56	<i>RS15190</i>	14,92	37,15
<i>RS14745</i>	192,56	516,31	<i>RS14970</i>	19,90	24,74	<i>RS15195</i>	22,96	57,85
<i>RS14750</i>	106,70	193,07	<i>RS14975</i>	10,13	41,80	<i>RS15200</i>	123,31	159,18
<i>RS14755</i>	16,18	23,77	<i>RS14980</i>	921,77	791,18	<i>RS15205</i>	132,40	121,22
<i>RS14760</i>	235,22	419,41	<i>RS14985</i>	35,81	38,69	<i>RS15210</i>	164,03	63,03
<i>RS14765</i>	357,99	594,34	<i>RS14990</i>	44,31	82,81	<i>RS15215</i>	743,46	125,94
<i>RS14770</i>	1,69	7,88	<i>RS14995</i>	58,47	229,85	<i>RS15220</i>	24,04	171,86
<i>RS14775</i>	18,18	67,85	<i>RS15000</i>	10,19	84,12	<i>RS15225</i>	25,83	150,75
<i>RS14780</i>	45,69	94,52	<i>RS15005</i>	120,00	275,94	<i>RS15230</i>	53,38	85,63
<i>RS14785</i>	230,56	265,55	<i>RS15010</i>	105,23	162,66	<i>RS15235</i>	16,48	53,32
<i>RS14790</i>	3,14	76,22	<i>RS15015</i>	91,86	126,53	<i>RS15240</i>	30,08	67,92
<i>RS14795</i>	15,10	75,42	<i>RS16330</i>	61,40	286,75	<i>RS15245</i>	30,35	82,66

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
RS15250	13,22	55,73	RS15475	11,78	50,37	RS15720	30,72	164,92
RS15255	15,52	44,77	RS15480	2,62	14,10	RS15725	150,10	250,81
RS15260	46,25	198,24	RS15485	6,47	14,47	RS15730	8,71	18,54
RS15265	86,71	462,70	RS15490	2,58	30,08	RS15735	41,60	104,93
RS15270	35,54	147,01	RS15495	3,88	16,33	RS15740	7,57	55,40
RS15275	19,32	82,81	RS15500	5,76	15,20	RS15745	63,84	52,60
RS15280	4,62	209,37	RS15505	368,02	403,31	RS15750	88,46	49,33
RS15285	71,27	560,54	RS15510	135,00	260,52	RS15755	30,50	56,03
RS15290	25,86	60,68	RS15515	33,41	69,46	RS15760	5,40	26,59
RS15295	2,55	20,82	RS15520	72,15	114,23	RS15765	12,16	44,54
RS15300	200,97	174,01	RS15525	411,49	191,63	RS15770	4,99	25,60
RS15305	34,01	113,64	RS15530	47,27	139,86	RS15775	0,00	13,08
RS15310	115,39	102,94	RS15535	16,88	41,17	RS15780	3,36	22,46
RS15315	229,24	131,30	RS15540	10,97	34,57	RS15785	4,07	45,75
RS15320	111,13	72,59	RS15545	9,04	19,69	RS15790	3,05	27,07
RS15325	131,05	120,42	RS15550	6,19	40,40	RS15795	28,44	323,81
RS15330	50,60	51,93	RS15555	84,10	49,94	RS15800	6,25	32,63
RS15335	22,43	101,06	RS15560	47,50	346,18	RS15805	11,06	73,12
RS15340	18,23	86,32	RS15565	66,56	492,07	RS15810	9,01	68,46
RS15345	14,66	45,37	RS15570	285,97	1424,12	RS15815	40,08	154,05
RS15350	85,10	71,32	RS15575	1057,60	3685,26	RS15820	25,17	119,38
RS15355	32,45	56,34	RS15580	49,80	71,19	RS15825	284,02	642,65
RS15360	1,45	14,05	RS15585	270,67	308,55	RS15830	190,01	310,12
RS15365	0,00	32,52	RS15590	192,09	177,80	RS15835	78,48	149,91
RS15370	1,91	13,91	RS15595	149,79	159,63	RS15840	16,27	57,75
RS15375	18,21	35,57	RS15600	245,20	184,41	RS15845	33,93	279,08
RS15380	40,57	89,37	RS15605	8,83	48,17	RS15850	14,68	226,68
RS15385	46,08	335,35	RS15610	356,71	187,84	RS15855	32,17	235,82
RS15390	25,21	94,17	RS15620	40,02	135,29	RS15860	21,23	194,94
RS15395	36,98	86,10	RS15625	23,65	56,64	RS15865	40,92	53,20
RS15400	60,54	137,51	RS15630	54,88	189,82	RS15870	176,33	69,14
RS15405	36,68	55,26	RS15635	98,45	252,37	RS15875	832,16	557,55
RS15410	9,73	54,03	RS15640	93,51	268,64	RS15880	9,00	12,95
RS15415	15,27	101,54	RS15645	19,86	22,89	RS15885	4,27	7,62
RS15420	6,21	104,81	RS15650	28,59	71,89	RS15890	28,59	67,06
RS15425	2,34	109,13	RS15655	283,04	799,22	RS15895	98,36	59,82
RS15430	14,89	169,60	RS15660	291,89	1268,41	RS15900	86,44	52,16
RS15435	53,25	703,25	RS15665	336,82	885,81	RS15905	164,04	644,85
RS15440	185,92	177,81	RS15670	51,19	361,68	RS15910	143,72	517,38
RS15445	145,34	676,22	RS15675	165,39	420,09	RS15915	106,95	165,00
RS15450	146,68	537,83	RS15680	136,69	294,50	RS15920	56,00	59,30
RS15455	94,13	212,15	RS15685	57,49	98,12	RS15925	1,77	19,61
RS15460	15,68	54,54	RS15690	39,74	62,59	RS15930	2,21	25,13
RS15465	19,16	81,34	RS15695	36,64	66,63	RS15935	17,26	24,81
RS15470	16,88	48,02	RS15715	88,25	345,49	RS15940	4,42	20,52

X. ANEXOS

Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa	Locus (HNY42_)	Acetato	Glucosa
<i>RS15945</i>	21,50	19,41	<i>RS16030</i>	29,12	114,64	<i>RS16110</i>	45,91	98,47
<i>RS15950</i>	75,01	81,88	<i>RS16035</i>	4,47	50,81	<i>RS16115</i>	120,68	225,90
<i>RS15955</i>	26,17	101,58	<i>RS16040</i>	11,83	59,65	<i>RS16120</i>	42,82	86,90
<i>RS15960</i>	69,40	407,95	<i>RS16045</i>	11,72	75,51	<i>RS16125</i>	14,15	42,54
<i>RS15970</i>	59,48	235,16	<i>RS16050</i>	99,57	400,16	<i>RS16130</i>	3,41	20,26
<i>RS15975</i>	52,53	289,27	<i>RS16055</i>	66,61	156,56	<i>RS16135</i>	6,48	39,05
<i>RS15980</i>	14,46	39,43	<i>RS16060</i>	49,71	99,41	<i>RS16140</i>	53,35	152,07
<i>RS15985</i>	32,11	337,77	<i>RS16065</i>	23,55	136,25	<i>RS16145</i>	17,08	30,85
<i>RS15990</i>	26,08	219,63	<i>RS16070</i>	40,87	172,42	<i>RS16150</i>	16,48	13,58
<i>RS15995</i>	40,47	296,73	<i>RS16075</i>	10,75	43,10	<i>RS16155</i>	27,08	54,49
<i>RS16000</i>	61,94	490,05	<i>RS16080</i>	8,47	10,77	<i>RS16160</i>	7,51	32,36
<i>RS16005</i>	24,72	302,54	<i>RS16085</i>	7,00	7,77	<i>RS16165</i>	6,30	36,04
<i>RS16010</i>	570,05	825,41	<i>RS16090</i>	9,15	35,99	<i>RS16175</i>	7,33	43,79
<i>RS16015</i>	54,33	126,12	<i>RS16095</i>	11,74	85,43	<i>RS16180</i>	22,42	124,03
<i>RS16020</i>	137,01	252,79	<i>RS16100</i>	127,39	396,49	<i>RS15710</i>	4,38	30,21
<i>RS16025</i>	6,63	24,14	<i>RS16105</i>	30,67	145,05			