

## Índice general

Índice de Tablas .....	XIX
Índice de Figuras .....	XXI
Abreviaturas .....	XXV
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
1. Bacterias del ácido láctico .....	3
1.1 Definición y clasificación .....	3
1.2 Fisiología de las BAL: rutas de degradación de azúcares .....	5
1.3 Hábitat y aplicaciones de las BAL .....	7
1.3.1 Uso en alimentos.....	7
1.3.2. Hábitat natural .....	8
1.3.3 Seguridad .....	9
2. Probióticos.....	9
2.1 Polifosfato como molécula probiótica.....	12
2.2 Uso de los probióticos para captación de metales .....	13
3. Metabolismo del fosfato en bacterias.....	16
3.1 Importancia del fosfato en bacterias .....	16
3.2 Sistemas de regulación por fosfato: regulón Pho.....	17
3.2.1 El sistema de dos componentes PhoBR de <i>Escherichia coli</i> .....	18
3.2.2. El transportador PstSCAB y PhoU .....	21
4. Síntesis de polifosfato en bacterias .....	24
4.1 Definición y origen .....	24
4.2 Enzimas involucradas en la síntesis de polifosfato .....	26
4.2.1 Polifosfato quinasa (Ppk; EC 2.7.4.1) .....	27
4.2.2 Exopolifosfatasa (Ppx; EC 3.6.1.11) .....	29
4.3 Papel del poli-P en diversos procesos celulares .....	33
4.3.1 Poli-P como componente estructural.....	33
4.3.2 Poli-P como sustituto de ATP, fuente de energía y reservorio de Pi. ....	34
4.3.3 Quelación de metales y protección contra el estrés oxidativo .....	34
4.3.4 Polifosfato actúa como una chaperona protectora de proteínas ...	35
4.3.5 Polifosfato en la regulación de la respuesta al estrés .....	36
4.3.6 Papel en la virulencia de patógenos .....	37
<b>Objetivos.....</b>	<b>39</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>43</b>
Metodología .....	46
1.Condiciones de cultivo bacteriano.....	46
2. Construcción de cepas mutantes en los genes <i>pst</i> y <i>pho</i> .....	46
4. Ensayos de toxicidad, incorporación y especiación de As .....	50
5.Análisis estadísticos.....	51
Resultados.....	52
1.Obtención de las cepas mutantes de <i>Lactobacillus</i> .....	52
2. La mutación de los genes <i>pst</i> que codifican para los transportadores ABC de fosfato afecta a la absorción y toxicidad del As(V) .....	53
3. Las mutaciones en el TCS PhoPR provocan una mayor resistencia al As(III) en <i>Lc. paracasei</i> .....	57
4. No se observan diferencias en la oxidación de As(III) en los mutantes <i>phoP</i> o <i>phoR</i> de <i>Lc. paracasei</i> .....	59
Discusión.....	62
Conclusiones.....	65
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>67</b>
Metodología .....	70
1.Condiciones de cultivo bacteriano.....	70

2. Clonaje, expresión y purificación de PhoP .....	70
3. Experimentos de expresión génica .....	73
4. Identificación de sitios putativos de unión a PhoP .....	74
5. Inactivación de los genes <i>phnD</i> y <i>ackA</i> .....	75
6. Ensayos de crecimiento en diferentes concentraciones de fosfato y toxicidad frente al As(III) .....	76
7. Fosforilación de PhoP .....	76
8. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA).....	77
Resultados.....	78
1. Expresión de los genes <i>pstSCAB1B2-phoU</i> en <i>Lc. paracasei</i> en condiciones de alto y bajo fosfato.....	78
2. Análisis del transcriptoma de <i>Lc. paracasei</i> y su mutante derivado $\Delta$ <i>phoP</i> .....	79
4. Análisis de la unión de PhoP a regiones promotoras de genes expresados diferencialmente en una cepa $\Delta$ <i>phoP</i> .....	85
5. Caracterización de genes candidatos para explicar la resistencia a As(III).....	90
5.1 Un transportador putativo de fosfonato en el genoma de <i>Lc. paracasei</i> BL23 .....	90
5.2 El déficit de acetato quinasa es el responsable de la resistencia a As(III) en un mutante $\Delta$ <i>phoP</i> de <i>Lc. paracasei</i> .....	91
Discusión.....	93
Conclusiones.....	99
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>101</b>
Metodología .....	104
1. Condiciones de cultivo bacteriano.....	104
2. Construcción de cepas deficientes en <i>ppx1</i> y <i>ppx2</i> .....	105
3. Complementación de $\Delta$ <i>ppx1</i> .....	106
4. Aislamiento y cuantificación de Poli-P .....	107
5. Electroforesis y tinción de Poli-P .....	107
6. Determinación de la expresión génica mediante RT-qPCR .....	107
7. Análisis filogenético de las proteínas Ppx1 .....	108
8. Expresión y purificación de proteínas con cola de histidinas .....	108
9. Actividades enzimáticas .....	109
Resultados.....	110
1. La síntesis y degradación de poli-P están ligadas a la disponibilidad de fosfato y a la fase de crecimiento en <i>Lc. paracasei</i> BL23 .....	110
2. La inactivación del gen <i>ppx1</i> que codifica una exopolifosfatasa putativa resulta en la ausencia de acumulación de poli-P.....	112
3. Ppx1 es esencial para la síntesis de poli-P en <i>Lc. paracasei</i> .....	115
4. Actividades exopolifosfatasa y poli-P quinasa de las enzimas de <i>Lc. paracasei</i> BL23 .....	120
Discusión.....	122
Conclusiones.....	125
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>127</b>
Metodología .....	130
1. Condiciones de cultivo bacteriano.....	130
2. Construcción de un mutante en el residuo catalítico de Ppx1 (Glu-112) y una cepa deficiente en <i>ppx2</i> utilizando el sistema CRISPR-Cas9 endógeno de <i>Lc. paracasei</i> BL23.....	130
3. Acumulación de poli-P en cepas mutantes y silvestre bajo diferentes condiciones del cultivo .....	135
5. Determinación de la viabilidad .....	135
6. Supervivencia bajo diferentes condiciones de estrés .....	136

7. Análisis estadísticos .....	136
Resultados.....	137
1. <i>Lc. paracasei</i> acumula poli-P durante la entrada en la fase estacionaria.	137
2. El poli-P se acumula como respuesta a la falta de nutrientes .....	138
3. Una mutación en Glu-112 en la exopolifosfatasa Ppx1 resulta en una mayor acumulación de poli-P. ....	139
4. Una poli-P quinasa de tipo Ppk2 de <i>Lc. paracasei</i> .....	141
5. Efectos de los niveles de poli-P en la supervivencia bacteriana en la fase estacionaria .....	141
Discusión.....	145
Conclusiones.....	148
<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>151</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>157</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>181</b>