



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

**Caracterització d'un nou polièster present en les soques llises  
de *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium aurum*,  
*Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum*,  
*Mycobacterium chubuense* i *Mycobacterium gilvum*.**

**Implicació en la morfologia colonial, motilitat i formació de  
biofilms.**

Gemma Agustí Adalid

2009





Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia  
Facultat de Biociències

**Caracterització d'un nou polièster present en les soques llises  
de *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium aurum*,  
*Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum*,  
*Mycobacterium chubuense* i *Mycobacterium gilvum*.  
Implicació en la morfologia colonial, motilitat i formació de  
biofilms.**

Memòria de tesi presentada per obtenir el grau de Doctora en Biotecnologia per la Universitat Autònoma de Barcelona, per Gemma Agustí Adalid.

Vist i plau de les Directores de la Tesi,

Dra. Marina Luquin Fernández i Dra. Esther Julián Gomez

Bellaterra, Setembre de 2009



*“La ciencia se compone de errores,  
que a su vez,  
son los pasos hacia la verdad.”  
Julio Verne*



---

Presentació.....	7
Acrònims.....	9
A. INTRODUCCIÓ.....	11
A.1. Característiques generals del gènere <i>Mycobacterium</i> .....	11
A.2. Micobacteris ambientals.....	13
A.2.1. Classificació dels MNT.....	14
A.2.2. Infeccions oportunistes per MNT.....	15
A.2.3. Reservoris ambientals dels MNT.....	17
A.2.3.1. Capacitats dels MNT per a la prevalença en els espais naturals.....	19
A.2.3.1.1. Motilitat bacteriana en superfície.....	20
A.2.3.1.1.1 Motilitat en el gènere <i>Mycobacterium</i> .....	21
A.2.4. Morfologia colonial en el gènere <i>Mycobacterium</i> .....	22
A.3. L'embolcall del gènere <i>Mycobacterium</i> .....	24
A.3.1. La paret cel·lular.....	25
A.3.1.1. Components de la paret cel·lular.....	26
A.3.1.1.1. Peptidoglicà (PG).....	27
A.3.1.1.2. Arabinogalactà (AG).....	27
A.3.1.1.3. Àcids micòlics.....	27
A.3.1.1.4. Lípids lliures.....	28
A.3.1.1.4.1. Menaquinones (MK) i dimicocerosat de tiocerol (DIM).....	28
A.3.1.1.5. Glicolípid lliures.....	29
A.3.1.1.5.1. Aciltrealoses.....	29
A.3.1.1.5.2. Lipooligosacàrids (LOS).....	31
A.3.1.1.5.3. Glicolípid fenòlics (PGL).....	32
A.3.1.1.5.4. Glicopeptidolípids (GPL).....	32
A.3.1.1.6. Glicans i lipoglicans.....	33
A.3.1.1.6.1. Fosfatidilinositolmanòsids (PIM).....	33
A.3.1.1.6.2. Lipoarabinomanà (LAM) i lipomanà (LM).....	34
A.4. Hidrofobicitat cel·lular.....	35
A.5. Biopel·lícules bacterianes.....	37
A.5.1. Adhesió cel·lular en el gènere <i>Mycobacterium</i> .....	38
A.5.2. Formació de biopel·lícules en la interfase líquid–aire en micobacteris.....	40
A.6. El genoma micobacterià.....	41

---

A.6.1. Mètodes d'expressió de gens en el gènere <i>Mycobacterium</i> .....	43
A.6.2. Estudis genètics dels canvis en la morfologia colonial dels micobacteris .....	43
A.6.3. Genètica en <i>Mycobacterium vaccae</i> .....	45
B. OBJECTIUS .....	47
C. MATERIAL I MÈTODES .....	49
C.1. Microorganismes i condicions de cultiu .....	49
C.1.2. Conservació i manteniment de les soques .....	51
C.1.2.1. Conservació .....	51
C.1.2.2. Manteniment .....	51
C.2. Anàlisi macroscòpica i microscòpica de la morfologia colonial .....	51
C.2.1. Lupa estereoscòpica .....	51
C.2.2. Microscopi electrònic de rastreig .....	51
C.3. Anàlisi de la capacitat de motilitat .....	53
C.3.1. Tinció Ziehl–Neelsen (ZN) .....	55
C.4. Anàlisi dels lípids i glicolípid .....	56
C.4.1. Extracció i anàlisi dels lípids, glicolípid i fosfolípids lliures .....	56
C.4.1.1. Obtenció de l'extracte cru (EC) mitjançant extracció amb solvents orgànics .....	56
C.4.1.2. Anàlisi per CCF analítica unidimensional .....	56
C.4.2. Extracció i anàlisi de MK i DIM .....	57
C.4.2.1. Extracció amb solvents orgànics .....	57
C.4.2.2. Anàlisi per CCF analítica bidimensional .....	57
C.4.3. Extracció i anàlisi dels àcids micòlics .....	58
C.4.3.1. Metanòlisi àcida .....	58
C.4.3.2. Anàlisi dels àcids micòlics per CCF analítica unidimensional .....	58
C.5. Estudi de la TV .....	59
C.5.1. Detecció de l'1–tetradecanol mitjançant CG–EM .....	59
C.5.2. Extracció i anàlisi estructural de la TV .....	59
C.5.2.1. Extracció de la TV mitjançant diferents solvents .....	59
C.5.2.2. Purificació de la TV per HPLC .....	60
C.5.2.3. Anàlisi estructural de la TV .....	61
C.5.2.3.1. Espectroscòpia d'infraroig (IR) .....	61
C.5.2.3.2. CG–EM .....	61



---

C.5.2.3.3. RMN .....	62
C.6. Estudi de la hidrofobicitat .....	63
C.6.1. Anàlisi mitjançant hexadecà .....	63
C.6.2. Observació microscòpica de la interfase PBS/n–hexadecà .....	64
C.7. Anàlisi de la capacitat de formació de biopel·lícules en la interfase i adhesió cel·lular .....	65
C.7.1. Anàlisi de la formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid–aire .....	65
C.7.2. Anàlisi de l'adhesió a vidre i poliestirè (PS).....	65
C.7.2.1. Quantificació de l'adhesió a vidre i PS.....	66
C.8. Estudis genètics en <i>M. vaccae</i> .....	68
C.8.1. Soques bacterianes i vectors utilitzats.....	68
C.8.1.1. Estudis previs en <i>M. vaccae</i> .....	69
C.8.1.1.1. Estudi de la corba de creixement de <i>M. vaccae</i> llis i <i>M. vaccae</i> rugós en medi líquid TSB .....	69
C.8.1.1.2. Determinació de la CMI de <i>M. vaccae</i> llis i <i>M. vaccae</i> rugós en diferents antibiòtics.....	70
C.8.1.1.2.1. Recompte en placa.....	70
C.8.1.1.2.2. Estudi CMI mitjançant la resazurina .....	70
C.8.1.1.2.2.1. Preparació de la resazurina .....	71
C.8.1.1.3. Estudi del tant per cent de reversió de llis a rugós de les colònies de <i>M. vaccae</i> llis i del tant per cent de reversió de rugós a llis de les colònies de <i>M. vaccae</i> rugós.....	71
C.8.1.2. Estudi de l'eficiència de transformació de <i>M. vaccae</i> llis en pEZ123 i pSUM36 .....	72
C.8.1.2.1. Microdialització plasmídica .....	72
C.8.1.2.2. Preparació de cèl·lules electrocompetents, transformació i electroporació.....	72
C.8.1.2.2.1. Obtenció de cèl·lules electrocompetents d' <i>E. coli</i> .....	72
C.8.1.2.2.2. Obtenció de cèl·lules electrocompetents de <i>M. vaccae</i> i <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 .....	73
C.8.1.2.2.3. Electroporació de <i>M. vaccae</i> i <i>E. coli</i> .....	74
C.8.1.2.3. Extracció d'ADN plasmídic, digestió amb enzims de restricció i electroforesi en gel d'agarosa en <i>E. coli</i> .....	75
C.8.1.2.3.1. Extracció d'ADN plasmídic d' <i>E. coli</i> mitjançant clorur de liti.....	75
C.8.1.2.3.2. Digestió de l'ADN plasmídic d' <i>E. coli</i> mitjançant enzims de restricció .....	77
C.8.1.2.3.3. Electroforesi en gel d'agarosa .....	77

C.8.2.4. Anàlisi de la presència dels diferents plasmidis electroporats en <i>M. vaccae</i> mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR) .....	78
C.8.2.4.1. Extracció d'ADN total de <i>M. vaccae</i> .....	78
C.8.2.4.2. PCR .....	79
C.8.2.5. Estudi de l'estabilitat plasmídica de pEZ123 en <i>M. vaccae</i> lliis .....	81
C.8.3. Estudi de la integració del transposó Tngfp del plasmidi pEZ123 en el genoma de <i>M. vaccae</i> lliis .....	81
C.8.3.1. Ligation-mediated PCR (LMPCR) .....	83
C.8.4. Construcció d'una llibreria genòmica en <i>M. vaccae</i> rugós .....	85
C.8.4.1. Digestió d'ADN mitjançant enzims de restricció .....	85
C.8.4.2. Purificació dels fragments d'ADN mitjançant columna Qiagen .....	86
C.8.4.3. Desfosforització dels extrems de l'ADN plasmídica .....	86
C.8.4.4. Lligació de fragments d'ADN .....	87
C.8.4.5. Transformació d' <i>E. coli</i> i <i>M. vaccae</i> rugós amb els productes de la lligació .....	87
D. RESULTATS .....	89
D.1. Condicions de cultiu i morfologia colonial .....	89
D.2. Anàlisi microscòpica .....	90
D.3. Anàlisi de la capacitat de motilitat .....	91
D.4. Anàlisi dels lípids i glicolípid .....	92
D.4.1 Patró de lípids, glicolípid i fosfolípids .....	92
D.5. Estudi de la TV .....	93
D.5.1. Purificació de la TV per HPLC .....	94
D.5.2. Espectroscòpia d'IR .....	95
D.5.3. CG-EM .....	95
D.5.4. RMN .....	95
D.6. Estudi de la hidrofobicitat .....	96
D.6.1. Anàlisi mitjançant hexadecà .....	96
D.6.2. Observació microscòpica de la interfase PBS/n-hexadecà .....	96
D.7. Anàlisi de formació de biopel·lícules en la interfase i de la capacitat d'adhesió .....	97
D.7.1. Anàlisi de la formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid-aire .....	97
D.7.2. Anàlisi de l'adhesió al vidre i al PS .....	98
D.8. Genètica amb <i>M. vaccae</i> .....	99

---

D.8.1. Estudis previs en <i>M. vaccae</i> .....	99
D.8.1.1. Estudi de la corba de creixement de <i>M. vaccae</i> llis i <i>M. vaccae</i> rugós en medi líquid TSB .....	99
D.8.1.2. Determinació de la CMI de <i>M. vaccae</i> llis i <i>M. vaccae</i> rugós en diferents antibiòtics.....	99
D.8.1.3. Estudi del percentatge de reversió de llis a rugós de les colònies de <i>M. vaccae</i> llis i del percentatge de reversió de rugós a llis de les colònies de <i>M. vaccae</i> rugós .....	100
D.8.2. Estudi de l'eficiència de transformació de <i>M. vaccae</i> llis en diferents plasmidis.....	100
D.8.2.4. Anàlisi de la presència dels diferents plasmidis electroporats en <i>M. vaccae</i> llis mitjançant PCR .....	101
D.8.2.5. Estudi de l'estabilitat plasmídica .....	101
D.8.3. Estudi de la integració del transposó Tngfp del plasmidi pEZ123 en el genoma de <i>M. vaccae</i> llis .....	102
D.8.3.1. LMPCR.....	102
D.8.4. Construcció d'una llibreria genòmica en <i>M. vaccae</i> rugós .....	103
D.8.4.1. Digestió d'ADN mitjançant enzims de restricció.....	103
E. DISCUSSIÓ .....	147
F. CONCLUSIONS .....	155
G. BIBLIOGRAFIA.....	157
H. COMPENDI D'ARTICLES.....	167
I. AGRAÏMENTS.....	193



## Presentació

Els micobacteris són un grup de microorganismes de gran importància clínica, ja que existeixen múltiples espècies que són agents causals de diverses malalties humanes amb unes importants morbiditat i mortalitat. Entre aquest grup de micobacteris patògens cal destacar *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium leprae*, agents causals de la tuberculosi i la lepra, respectivament.

D'altra banda, a part dels microorganismes que constitueixen els complexos *M. tuberculosis* i *M. leprae* trobem un grup nombrós de micobacteris, format per micobacteris atípics o micobacteris ambientals (MNT). Aquest grup engloba la resta d'espècies micobacterianes no incloses en els dos grups anteriors. De les més de 130 espècies descrites de MNT, aproximadament un terç podrien estar relacionades amb malalties en humans i ser les responsables de les anomenades micobacteriosis, encara que, a diferència del complex *M. tuberculosis* i *M. leprae*, les espècies de MNT no són patògens obligats.

En general, hi ha poca informació sobre la incidència de les malalties causades pels MNT perquè no és obligatori fer un seguiment i control directe d'aquestes malalties, tot i que, en els últims anys ha augmentat la incidència de les micobacteriosis, en gran part per l'increment en el nombre d'individus immunosuprimits, sobretot com a conseqüència de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana. Aquests augments en la incidència han promogut d'una banda, la creació de guies internacionals d'assistència en el diagnòstic i el tractament de les infeccions causades per aquests microorganismes i, d'una altra banda, també l'estudi de la capacitat dels micobacteris a colonitzar i persistir en l'ambient.

Els MNT tenen una gran capacitat de prevalença en aigües de distribució i això és degut principalment a la seva capacitat de créixer en un ampli rang de condicions ambientals i, sobretot, a la seva capacitat de colonitzar superfícies. La motilitat i la capacitat d'adherir-se a superfícies són algunes de les respostes funcionals que es manifesten en el procés de colonització d'una superfície. Per tant l'estudi de la motilitat, la hidrofobicitat i la capacitat d'adhesió a diferents materials ens pot ajudar a entendre i determinar els mecanismes de colonització, persistència i transmissió dels MNT en el medi ambient.

En el gènere *Mycobacterium*, els efectes de la morfologia colonial en les funcions biològiques són múltiples. Diferents estudis, en *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus* i *Mycobacterium smegmatis*, mostren una relació directa entre la morfologia colonial, la motilitat, la hidrofobicitat, l'adhesió cel·lular i la formació de biopel·lícules en superfície, a més a més de relacionar

aquestes funcions biològiques amb la presència en la paret cel·lular d'aquests micobacteris d'un tipus específic de glicolípid anomenats glicopeptidolípid.

Aquesta tesi s'ha centrat a estudiar i relacionar la morfologia colonial amb les funcions biològiques (motilitat, hidrofobicitat, adhesió cel·lular i formació de biopel·lícules en superfície), descrites inicialment en *M. avium*, *M. abscessus* i *M. smegmatis*, en un altre grup de micobacteris ambientals, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium chubuense*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium obuense*, *Mycobacterium parafortuitum* i *Mycobacterium vaccae*. Aquestes espècies micobacterianes tenen en comú que són de creixement ràpid, presenten originàriament una morfologia colonial llisa i, segons els estudis comparatius del 16S ARN, són filogenèticament properes entre elles, a la vegada que filogenèticament distants de les espècies micobacterianes ja estudiades.

En aquest sentit, ens hem proposat obtenir de forma espontània, a partir de les colònies llises de *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*, variants rugoses estables les quals han estat aïllades en cultiu pur. Posteriorment, ens hem centrat a analitzar els lípids i glicolípid de la paret cel·lular d'aquests micobacteris mitjançant cromatografia de capa fina per a comprovar si s'observaven diferències en la composició lipídica i glicolipídica entre les dues variants morfològiques. A més, s'ha dut a terme l'estudi comparatiu de la capacitat de motilitat, de les característiques hidrofòbiques, de l'adhesió cel·lular i de la formació de biopel·lícules en la interfase líquid-aire entre les dues morfologies colonials en les diferents espècies estudiades. I, finalment, s'han fet estudis genètics per determinar les bases moleculars relacionades amb els canvis de morfologia colonial en *M. vaccae*.

## Acrònims

ADN	Àcid desoxiribonucleic
AG	Arabinogalactà
ARN	Àcid ribonucleic
ARNr 16S	Àcid ribonucleic ribosomal 16S
BCG	Bacil de Calmette i Guérin
CCF	Cromatografia en capa fina
CFU	Unitats formadores de colònies
CG-EM	Cromatografia de gasos-espectometria de masses
CMI	Concentració mínima inhibidora
DAT	Diaciltrealoses
DIM	Dimicocerosats de tiocerol
DMT	Dimicolat de trealosa
DO	Densitat òptica
EC	Extracte cru
Gm	Gentamicina
GPL	Glicopeptidolípids
HPLC	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
Hyg	Higromicina
IR	Espectroscopia d'infraroig
Km	Kanamicina
LAM	Lipoarabinomanà
LB	Luria-Bertoni
LM	Lipomanà
LMPCR	“Ligation-mediated” de la reacció en cadena de la polimerasa
LOS	Lipooligosacàrids
MAC	Complex <i>Mycobacterium avium</i>
mAG	Complex micoloil-arabinogalactà
MATH	Adhesió microbiana a hidrocarburs

MK	Menaquinones
MMT	Monomicolat de trealosa
MNT	Micobacteris “no tuberculosos”
OMS	Organització Mundial per la Salut
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PG	Peptidoglicà
PGL	Glicolípid fenòlics
PI	Fosfatidilinositol
PIM	Fosfatidilinositolmanòsids
PS	Poliestirè
PVC	Policlorur de vinil
RMN	Ressonància magnètica nuclear
SL	Sulfolípid
Sm	Estreptomicina
TAT	Triaciltrealoses
TB	Tuberculosi
TSA	Tryptone Soy Agar
TSB	Tryptone Soy Broth
TV	Taca vermella
VIH	Virus de la immunodeficiència humana
ZN	Tinció Ziehl-Neelsen



## A. INTRODUCCIÓ

Els micobacteris són un grup de microorganismes de gran importància clínica, ja que existeixen múltiples espècies que són agents causals de diverses malalties humanes amb unes importants morbiditat i mortalitat (Saviola, 2006).

Algunes malalties, com la tuberculosi (TB) i la lepra, ocasionades per *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium leprae*, respectivament, han anat lligades a l'història de l'home. Malgrat els esforços que s'han fet per al seu control, actualment constitueixen un dels problemes sanitaris de major gravetat en l'àmbit mundial.

La TB segueix sent una important causa de mort, sobretot al Tercer Món. La TB en els nostres dies afecta per igual tots els continents, encara que especialment els països amb problemes socioeconòmics. La guerra, la pobresa, les migracions humanes i l'absència d'infraestructures mèdiques adequades contribueixen a la disseminació de la malaltia.

Segons dades de l'Organització Mundial per la Salut (OMS), la TB va causar la mort d'1,8 milions de persones l'any 2007 (WHO, 2009). Es calcula que al voltant d'un terç de la població mundial està infectada pel bacil tuberculós i que cada segon s'infecta una persona més.

La lepra també presenta un problema de primer ordre. És una malaltia que predomina a l'Àsia, l'Àfrica i l'Amèrica llatina. L'OMS ha constatat que, encara que existeix una disminució en la prevalença de la malaltia, se n'ha observat un increment en la incidència (WHO, 2007).

D'altra banda, les micobacteriosis o malalties produïdes per altres micobacteris diferents de *M. tuberculosis* i *M. leprae*, han anat guanyant amb el temps un major protagonisme. Les malalties produïdes per aquest grup s'han incrementat fonamentalment en els països amb un major desenvolupament econòmic i en associació amb el virus de la immunodeficiència humana (Lai, 2006; Griffith, 2007).

### A.1. Característiques generals del gènere *Mycobacterium*

El gènere *Mycobacterium* comprèn un conjunt de bacteris aeròbics els quals són els únics membres de la família *Mycobacteriaceae*, dins de l'ordre *Actinomycetales* (taula 1) (Hartmans, 2006; Saviola, 2006).

Taula 1. Classificació científica del gènere *Mycobacterium*

Domini	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Actinobacteria</i>
Ordre	<i>Actinomycetales</i>
Subordre	<i>Corynebacterineae</i>
Família	<i>Mycobacteriaceae</i>
Gènere	<i>Mycobacterium</i>

El gènere *Mycobacterium* està constituït per bacils rectes o lleugerament corbats, encara que poden variar molt en la seva morfologia, poden presentar des de formes coccoides petites fins a formes de llargs filaments. La seva mida oscil·la entre 0,2–0,6 µm d'amplada i 1–10 µm de longitud (Hartmans, 2006).

La morfologia de les seves colònies pot variar des de colònies amb morfologia llisa fins a rugosa entre les diferents espècies. D'igual forma, algunes de les espècies d'aquest gènere poden presentar més d'una morfologia colonial (Barrera, 2007).

Les espècies d'aquest gènere destaquen per tenir un elevat contingut de G+C (62–70 %) en el seu àcid desoxiribonucleic (ADN).

El metabolisme dels micobacteris és molt variable. Moltes espècies micobacterianes s'adapten fàcilment al creixement en substrats molt simples que continguin una font de carboni, una de nitrogen i ions de metalls essencials, entre els quals el nitrogen i el magnesi (Barrera, 2007). Podem trobar tant micobacteris de creixement ràpid que creixen en menys de tres dies en medis simples, com micobacteris que creixen lentament i necessiten medis més rics o fins *M. leprae* que encara no ha pogut ser cultivat en medis sintètics. En general, el seu temps de generació comprèn entre les dues hores de *Mycobacterium smegmatis* fins a les 24 hores de *M. tuberculosis* (Chauhan, 2006; Saviola, 2006).

Des del punt de vista dels requeriments atmosfèrics, els micobacteris poden ser aeròbics o microaeròfils. El seu creixement es veu afavorit amb una atmosfera d'entre 5 i 10 % de CO<sub>2</sub>. La temperatura òptima de creixement és altament variable, oscil·la entre els 25 °C fins a més de 40 °C segons l'espècie.

Els micobacteris es caracteritzen per tenir una paret cel·lular gruixuda i amb un alt contingut lipídic, completament diferent dels restants bacteris, amb l'excepció dels gèneres *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* i *Caseobacter*, els quals estan altament relacionats amb el gènere *Mycobacterium* per la similitud de l'estructura i la composició de les seves parets cel·lulars. Aquest alt contingut lipídic en la paret aporta al micobacteri una escassa permeabilitat cel·lular, que és responsable entre altres coses, de

la ineficàcia de múltiples agents antimicrobians, a més de fer que no es tenyeixin bé amb els reactius utilitzats en la coloració de Gram (Tuberculosis, 2007).

Els micobacteris es tenyeixen adequadament pel mètode de tinció Ziehl–Neelsen (ZN), que utilitza com a solució decolorant una mescla d’etanol i àcid clorhídric. Aquests microorganismes un cop tenyits són resistents a la decoloració àcid–alcohòlica i per això s’anomenen “bacils àcid–alcohol resistents”. Amb el microscopi òptic s’observen els bacils tenyits de vermell per la incorporació i retenció en la paret cel·lular del colorant primari (carbolfucsina) (Saviola, 2006).

El gènere *Mycobacterium* inclou més de 130 espècies ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)) que han estat classificades, a partir de la seva importància clínica i epidemiològica, en tres grups:

- **Complex *M. tuberculosis***, que inclou les espècies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (inclosa la soca BCG), *Mycobacterium cannetti*, *Mycobacterium pinnipedi* i *Mycobacterium africanum*, causants totes elles de tuberculosi. S’inclou també *Mycobacterium microti*, causant de tuberculosi en rata.
- **Complex *M. leprae***. Inclou les espècies *M. leprae*, causant de la lepra humana (també coneguda com a malaltia de Hansen), i *Mycobacterium lepraemurium* que produeix lepra en rosegadors.
- **Micobacteris “no tuberculosos” (MNT)**, també anomenats micobacteris atípics o micobacteris ambientals. Són la resta de les espècies no incloses en els dos grups anteriors. Només alguns d’ells són patògens oportunistes i responsables de les anomenades micobacteriosis.

## A.2. Micobacteris ambientals

A diferència del complex *M. tuberculosis* i *M. leprae*, les espècies de MNT no són patògens obligats. Es troben àmpliament distribuïts en una gran diversitat d’hàbitats: aigua dolça o salada, sòl i pols, animals, vegetals, etc. (Hartmans, 2006).

Entre les característiques més importants que distingeixen els MNT dels micobacteris del complex *M. tuberculosis* hi ha la baixa virulència per a hostes immunocompetents i la manca de transmissió interhumana.

### A.2.1. Classificació dels MNT

Les diferents espècies del grup de MNT es poden classificar segons la velocitat de creixement i la producció de pigment en presència o absència de llum. Runyon va proposar aquesta classificació a finals dels anys 50 i avui en dia encara segueix vigent (Runyon, 1959).

Des del punt de vista de la velocitat de creixement els micobacteris es poden dividir en micobacteris de creixement ràpid o lent. Els micobacteris de creixement ràpid són aquells en que les colònies es fan visibles abans de set dies de cultiu. En canvi, els de creixement lent necessiten més de set dies per a obtenir colònies visibles.

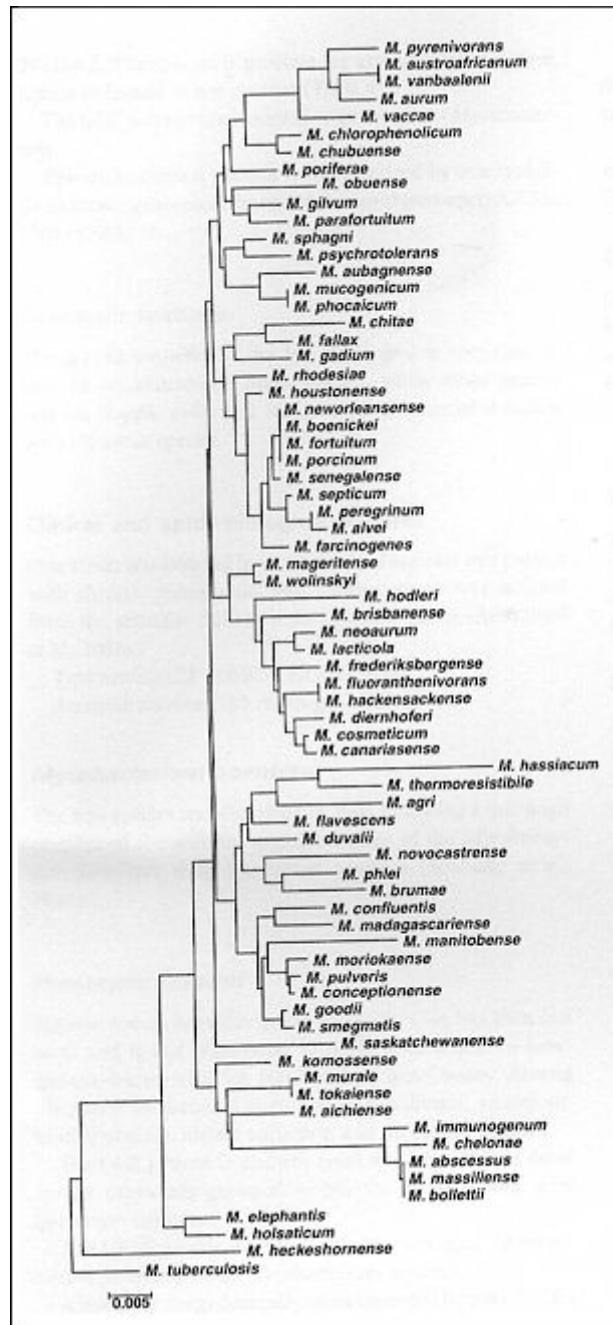
Alternativament, es poden classificar també d'acord amb la seva pigmentació, i s'obtenen així tres grups: fotocromògens (produeixen pigment com a conseqüència de l'exposició a la llum), escotocromògens (produeixen pigment en la foscor) i no cromògens (no produeixen pigment). La presència de pigment de color groc-taronja, característic de les espècies de micobacteris classificades com a fotocromògens i escotocromògens, és deguda a la producció de carotenoides, components associats a la membrana plasmàtica i que tenen com a funció protegir contra danys fotolítics.

Això no obstant, aquestes classificacions fenotípiques, a causa del desenvolupament dels mètodes moleculars han quedat limitades. En la taxonomia micobacteriana està guanyant força l'ús de la taxonomia molecular, sent un dels mètodes més usats la comparació de les seqüències genètiques del gen codificant per l'àcid ribonucleic ribosomal 16S (ARNr 16S) (Tortoli, 2003).

En l'estudi del patró de l'ARNr 16S s'obtenen excel·lents resultats en l'estudi filogenètic en el gènere *Mycobacterium*, fet que ha produït que l'estudi del ARNr 16S sigui l'estàndard per a la identificació de noves espècies (Tortoli, 2006). La facilitat amb què es pot fer l'anàlisi genètic i comparar amb espècies descrites en bases de dades públiques ha tingut una repercussió enorme en la taxonomia, i ha permès la identificació ràpida i precisa de les espècies micobacterianes. Aquest fet ha afavorit un gran increment en el nombre d'espècies de MNT descrites en l'última dècada, que ha passat de tenir aproximadament unes 40 espècies descrites als anys 80 a les més de 130 espècies d'avui en dia (Hartmans, 2006).

Mitjançant la comparació de les seqüències d'aquest gen es poden establir les relacions filogenètiques existents entre les diferents espècies micobacterianes descrites fins ara (figura 1).

**Figura 1.** Arbre filogenètic mitjançant la comparació de les seqüències de l'ARNr 16S de micobacteris de creixement ràpid, adaptada de Tortoli (2006).



### A.2.2. Infeccions oportunistes per MNT

El potencial patogènic d'aquest grup nombrós de micobacteris va ser reconegut en iniciar-se l'últim segle (Pinner, 1935). Pinner va aplicar el terme "microorganisme àcid-fast atípic" per denominar uns microorganismes causants de malalties en humans diferents al conegut *M. tuberculosis* però amb característiques similars a aquest. En els últims anys, aquest reconeixement ha estat major en gran part per l'increment en el nombre de individus

immunosuprimits, a causa sobretot, de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH), i també pel progrés en les capacitats de diagnòstic dels laboratoris (Saviola, 2006).

Els MNT poden causar infeccions i malalties asimptomàtiques en humans. De les més de 130 espècies descrites de MNT, aproximadament un terç podrien estar relacionades amb malalties en humans.

En general hi ha poca informació sobre la prevalença de les malalties causades pels MNT ja que no són obligatoris ni la declaració ni el seguiment i el control directe d'aquestes malalties. Tanmateix, recentment han sorgit diferents estudis en què es mostren els increments en l'incidència d'aquestes malalties a tot el món.

Marras i col·laboradors van mostrar que al Canadà la incidència d'aïllament de MNT va ser de 9,1/100.000 en el 1997 i de 14,1/100.000 en el 2003, la qual cosa mostra una mitjana de l'increment anual de incidència al voltant del 8,4 % (Marras, 2002 i 2007).

A l'Àsia, Lai i col·laboradors el 2006 van mostrar que la incidència de malalties causades per aquests micobacteris va ser d'un 8,97/100.000 el 1997 i d'un 16,55/100.000 en 2003. Estudis a la Xina, el Japó, el Corea i l'Àustràlia també mostren aquesta tendència a l'augment de la incidència amb els anys (Marras, 2002; Weimin, 2007).

A Europa, un estudi epidemiològic a diferents països, entre ells Espanya, mostra una similar tendència en la incidència dels MNT. També descriuen que l'aïllament dels diferents MNT està en constant canvi a la majoria de països europeus estudiats (Martin-Casabona, 2004).

Aquests augments en la incidència de les micobacteriosis en els últims anys ha promogut l'actualització de les guies internacionals d'assistència en el diagnòstic i tractament d'aquests microorganismes (Nichols, 2004; Griffith, 2007) i també ha promogut que avui en dia els MNT estiguin considerats com un grup de patògens emergents.

El complex *Mycobacterium avium* (MAC), entre els quals destaquen *M. avium* i *Mycobacterium intracellulare*, són els MNT que amb més freqüència causen infeccions en països desenvolupats (taula 2). Les principals presentacions d'infeccions per MAC són limfadenitis en nens, infeccions respiratòries en persones grans, malalties respiratòries, intestinals i disseminades en persones VIH positives i infeccions en persones amb altres problemes immunitaris (Nichols, 2004). A més del MAC, també s'ha demostrat que moltes altres espècies de MNT poden estar implicades en infeccions, com són: *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* i

*Mycobacterium fortuitum* (Falkinham III, 1996; Dailloux, 1999; Katoch, 2004; Martín-Casabona, 2004; Field, 2006; Saviola, 2006) (taula 2).

**Taula 2.** Malalties ocasionades per micobacteris no tuberculosos. Adaptada de Griffith (2007) i Nichols (2004)

Malaltia	Organisme
Malalties pulmonars	<i>M. abscessus</i> , MAC, <i>Mycobacterium asiaticum</i> , <i>Mycobacterium celatum</i> , <i>Mycobacterium haemophilum</i> , <i>Mycobacterium immunogenum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>Mycobacterium malmoense</i> , <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>Mycobacterium shimoidei</i> , <i>Mycobacterium simiae</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i> i <i>M. xenopi</i> .
Limfadenitis	<i>M. abscessus</i> , MAC, <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>Mycobacterium genavense</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>Mycobacterium palustre</i> , <i>M. scrofulaceum</i> i <i>M. szulgai</i> .
Malaltia disseminada	<i>M. abscessus</i> , MAC, <i>M. celatum</i> , <i>Mycobacterium conspicuum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. immunogenum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium mucogenicum</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> i <i>M. xenopi</i> .
Malalties cutànies, en teixits tous i òssies	<i>M. abscessus</i> , MAC, <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. immunogenum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. marinum</i> , <i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>Mycobacterium terrae</i> i <i>Mycobacterium ulcerans</i> .

### A.2.3. Reservoirs ambientals dels MNT

Diferents estudis mostren que l'aigua, ja sigui aigua dolça (estanys, llacs, rius i pantans), aigua salada o aigua d'ús domèstic, és un vehicle important per a la transmissió dels MNT (Fordham von Reyn, 1993; Falkinham III, 1996; Falkinham III, 2004; Hartmans, 2006).

L'any 1997, Hunter va descriure que diferents micobacteris es trobaven relacionats amb infeccions humanes en que la via d'infecció havia estat l'aigua. Aquests inclouen *MAC*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. terrae*, *M. ulcerans* i *M. xenopi*. Avui en dia aquesta llista continua creixent, i podríem incloure-hi també *M. chelonae*, *M. immunogenicum*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. simiae* i *M. palustre* (Falkinham, 2004 i Nichols, 2004).

Un dels majors problemes dels MNT és la seva elevada presència en les aigües potables d'ús domèstic. Els MNT presenten una elevada resistència als productes de desinfecció usats en les aigües domèstiques, fet que contribueix que aquests microorganismes persisteixin i es trobin circulant pels sistemes de canalització de l'aigua. Estudis en aigües municipals procedents de mostres d'hospitals i domèstiques demostren que la proporció de MNT en aquestes aigües varia entre un 10 % fins a un 95 % en mostres estretes a Europa i Amèrica (Phillips, 2001). Aquesta elevada presència dels MNT en aquest tipus d'aigües és el que origina la majoria de micobacteriosis en humans.

L'estudi d'un ampli rang de superfícies de tubs de calefacció, mostren que en superfícies de plàstic i goma aquestes colonitzacions augmenten respecte d'altres materials emprats, independentment del temps d'exposició d'aquests en els diferents materials. També, sistemes de distribució d'aigua vells mostren nivells de colonització alts, per l'acumulació amb el temps d'una gran quantitat de matèria orgànica i microorganismes colonitzadors de superfície que afavoreix en la presència de MNT (Falkinham, 1996 i 2004). A més a més, diferents estudis mostren que generalment s'observen nivells alts de *M. avium* i *M. xenopi* en sistemes de distribució d'aigua calenta; en canvi, altres micobacteris com *M. kansasii* s'aïllen més freqüentment en sistemes de distribució d'aigua freda (Fordham von Reyn, 1993; Nichols, 2004).

Els índexs d'infecció més alts en humans, per la colonització dels MNT en els sistemes d'aigua potable, els trobem en els hospitals (Wallace, 1998; Phillips, 2001), havent-hi un alt índex d'infeccions en els tractaments d'hemodiàlisi i els tractaments buccals.

A part de l'aigua, existeixen altres reservoris ambientals coneguts dels MNT, encara que menys estudiats, com són el sòl, la pols i el menjar. Aquests reservoris ambientals faciliten que els micobacteris estiguin en contacte directe amb l'home, fent que puguin ser colonitzadors habituals de superfícies mucoses corporals (Falkinham, 1996 i 2004; Nichols, 2004).

Pel que fa als reservoris ambientals com el sòl i la pols, es va determinar que la incidència d'infeccions per MAC en persones que treballaven en mines i granges era molt elevada (Falkinham, 1996). Altres estudis, mostren l'abundància d'espècies micobacterianes de creixement ràpid en el sòl, sent el



més habitual *M. fortuitum*, que es troba en el 40–80 % dels aïllaments (Hartmans, 2006).

La identificació de MAC mitjançant *PCR–restriction fragment length polymorphism* (PCR–RFLP) en aliments ha demostrat la seva presència en una gran varietat de menjars (Yoder, 1999; Argueta, 2000). Altres estudis amb micobacteris aïllats dels aliments, van demostrar que els MAC són relativament resistents a altes temperatures i que poden sobreviure a la pasteurització quan aquests es troben en gran nombre en la llet crua (Grant, 1996).

Estudis epidemiològic amb pacients amb VIH i infectats per MAC van demostrar que algunes mostres de menjar, procedents de les llars d'aquests malalts, donaven cultius positius per a aquest grup de micobacteris, encara que la proporció de mostres positives va ser generalment molt baixa, fet que va suggerir que aquesta no fos una ruta principal de transmissió (Horsburgh, 1994; Yajko, 1995).

Els MAC també s'han pogut aïllar de cigarretes (Eaton, 1995), fet que contribueix a l'augment de malalties ocasionades per MAC en fumadors.

#### **A.2.3.1. Capacitats dels MNT per a la prevalença en els espais naturals**

L'augment, en aquestes últimes dècades, d'infeccions oportunistes en humans degudes a espècies de MNT, ha promogut l'estudi de la capacitat dels micobacteris a l'hora de colonitzar i persistir en l'ambient.

L'estudi de l'ecologia i de la fisiologia dels MNT és important per ajudar a entendre la distribució geogràfica de les espècies micobacterianes i identificar quins són els factors que influeixen en la seva resistència i propagació.

Tal com hem vist, els MNT tenen una gran capacitat de prevalença en aigües de distribució i això és degut principalment a la seva capacitat de créixer en un ampli rang de temperatures, pH, salinitat i concentració d'oxigen, a la seva alta resistència a la desinfecció, al clor i als biocides, i sobretot, a la seva capacitat de formar biopel·lícules (Wallace, 1998; Hall–Stoodley, 2005 i Hartmans, 2006).

Un estudi recent (Falkinham III, 2001) demostrà que l'anàlisi de mostres d'aigua procedents de sistemes de canalització va donar nivells de micobacteris molt inferiors als que es van obtenir en analitzar les biopel·lícules adherides en les parets d'aquests mateixos sistemes de distribució. Això indica que aquests micobacteris no es troben circulant només per l'aigua, sinó que són capaços de colonitzar i formar biopel·lícules, i en aquest estat és com es troben majoritàriament.

Depenent de la variabilitat de nutrients, de les condicions ambientals i de les condicions de la superfície, els bacteris romanen localitzats, colonitzen altres àrees o envaeixen teixits humans.

La motilitat i la capacitat d'adhesió a superfícies són algunes de les respostes funcionals que es manifesten en el procés de colonització d'una superfície (Hall–Stoodley, 2005).

### A.2.3.1.1. Motilitat bacteriana en superfície

Ja en els anys 70, J. Henrichsen examinant la motilitat en superfície de diferents espècies bacterianes, va classificar els diferents moviments observats en sis categories: *swimming*, *swarming*, *gliding*, *twitching*, *sliding* i *darting*. Aquestes categories descrites per J. Henrichsen encara avui segueixen vigents (Harshey, 2003) (taula 3).

Els moviments de “swimming” i “swarming” es troben directament relacionats amb la presència de flagels; el “twitching” i algunes formes de “gliding” s’han relacionat amb la presència de pilis tipus IV; mentre que en altres formes de “gliding” no es coneix què facilita el moviment. En el “sliding” el moviment depèn del creixement i de la reducció de la fricció entre el bacteri i el medi, i s’origina per les formes de translocació passives degudes a forces d’expansió generades per les cèl·lules. Finalment, res no es coneix sobre què permet el “darting” (taula 3) (Henrichsen, 1972; Harshey, 2003).

**Taula 3.** Característiques principals dels diferents tipus de motilitat en superfície adaptada de Harshey (2003).

Tipus de motilitat	Origen del moviment	Velocitat expansió colonial ( $\mu\text{m/s}$ )	Funció	Gèneres bacterians
Swarming/Swimming	Flagel·lar	2–10	Colonització superfícies	<i>Aeromonas</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i>
Twitching/Gliding	Pilis tipus IV	0,06–0,3	Colonització superfícies, formació biopel·lícules, transformació, conjugació	<i>Aeromonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Azoarcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Branhamella</i> , <i>Comomonas</i> , <i>Dichelobacter</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Kingella</i> , <i>Legionella</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Myxococcus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pasteurella</i> ,

				<i>Pseudomonas, Ralstonia, Shewanella, Streptococcus, Suttonella, Synechocystis, Vibrio, Wolinella</i>
Gliding	Desconegut	0,025–10	Colonització superfícies	<i>Anabaena, Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter, Mycoplasma, Myxococcus, Phormidium, Saprospira, Stigmatella</i>
Sliding	Cap	0,03–6	Colonització superfícies	<i>Acinetobacter, Alcaligenes, Bacillus, Escherichia, Flavobacterium, Mycobacterium, Serratia, Streptococcus, Vibrio</i>
Darting	Desconegut	----	----	<i>Staphylococcus</i>

#### A.2.3.1.1.1 Motilitat en el gènere *Mycobacterium*

Els micobacteris han estat considerats tradicionalment microorganismes immòbils fins que Martínez i col·laboradors (1999) van demostrar la capacitat de *M. smegmatis* i *M. avium* de lliscar per la superfície del medi de cultiu mitjançant el moviment de “sliding”. Els resultats obtinguts van mostrar que quan *M. smegmatis* i *M. avium* creixien en medis de cultiu modificats, amb pocs nutrients i amb concentracions mínimes d’agar o agarosa (0,3 %), aquests es desplaçaven per la superfície del medi i envaïen pràcticament tota la placa de cultiu. Posteriorment, Howard i col·laboradors (2006) i Ren i col·laboradors (2007) van descriure el mateix fenomen per *M. abscessus* i *M. marinum*, respectivament.

En aquestes espècies s’ha relacionat la seva capacitat de moviment amb la morfologia colonial i la presència de glicopeptidolípid (GPL). Els GPL són una classe de peptidolípid glicosilats localitzats a la paret cel·lular d’alguns micobacteris (Chatterjee, 2001; Schoney i Sweet, 2008). Martínez i col·laboradors (1999), van demostrar, tant en *M. smegmatis* com en *M. avium*, que les variants morfològiques llises presentaven GPL en la seva paret cel·lular i tenien la capacitat de moure’s, a diferència dels mutants espontanis rugosos, els quals no contenien GPL i eren immòbils.

L’evidència genètica de la relació entre la presència de GPL i la capacitat de lliscar posteriorment va ser estudiada en *M. smegmatis* però no en *M. avium* (Recht, 2000 i 2001). En *M. smegmatis*, Recht i col·laboradors (2000 i 2001)

van determinar que l'alteració en el transport dels GPL a la paret cel·lular donava lloc a la inhibició de la capacitat de moviment del bacteri.

*M. avium* presenta una ampla varietat de morfologies colonials. Les més habituals són la morfologia llisa opaca, la morfologia llisa transparent i la morfologia rugosa. Martínez i col·laboradors (1999) van demostrar que tant la variant llisa transparent com la variant llisa opaca produïen GPL i tenien la capacitat de moure's, encara que aquestes lliscaven per l'agar de diferent manera. En canvi, les variants rugoses estudiades, que es trobaven totalment desproveïdes de GPL, no presentaven motilitat, mentre que les que sintetitzaven GPL de forma deficient presentaven una capacitat de motilitat molt reduïda.

A més, Cangelosi i col·laboradors (2001) van demostrar que quan es feia créixer *M. avium* en medi sòlid, el qual contenia el colorant vermell Congo, les variants llises es diferenciaven morfològicament en colònies de color rosa, vermell i blanc. En aquest estudi es va observar també que les variants llises vermelles lliscaven molt millor que les blanques, encara que els autors no van relacionar aquestes diferències observades entre les dues morfologies amb el contingut de GPL o altres compostos de la paret cel·lular (Cangelosi, 2001).

Tanmateix, Howard i col·laboradors (2006) van comparar la capacitat de motilitat de la soca rugosa tipus de *M. abscessus* amb variants llises i rugoses, obtingudes de forma espontània. Amb aquests estudis, van determinar que mentre les variants llises produïen GPL i tenien la capacitat de lliscar entre 1–2 cm del centre de la placa d'agar, les rugoses, tant la soca original com l'obtinguda de forma espontània, presentaven una mínima expressió de GPL i eren immòbils.

Aquesta relació entre motilitat, morfologia colonial i síntesi de glicolípid també es trobà en *M. marinum*. Ren i col·laboradors (2007) tot estudiant en aquesta espècie les rutes de síntesi dels lipooligosacàrids (LOS), una classe de glicolípid present a la paret cel·lular d'algunes espècies del gènere *Mycobacterium*, van demostrar per primer cop que *M. marinum* tenia la capacitat de moure's per la superfície de la placa d'agar. A més demostraren que mutants defectius en la síntesi de LOS presentaven defectes en la capacitat de lliscar per l'agar.

#### **A.2.4. Morfologia colonial en el gènere *Mycobacterium***

Ja a principis dels anys 60, era conegut que els micobacteris presentaven diferents morfologies colonials quan aquests es feien créixer en medi sòlid (Fregman i Smith, 1961). Al 1961, Fregman i col·laboradors van associar, per primer cop, la presència o l'absència d'un glicolípid específic, anomenat

micòsid D, amb el canvi de morfologia colonial en una soca micobacteriana escotocromògena, anomenada P-5 (Fregman, 1961). Analitzant el patró de lípids i glicolípid van observar que les variants llises, però no les rugoses, presentaven aquest micòsid D. També van estudiar que el canvi de morfologia colonial s'indueïa després de prolongades incubacions en medi líquid o exposicions dels cultius a radiació UV. A més van descriure que aquest canvi de variant morfològica llisa a rugosa era estable, reproduïble i irreversible en medi sòlid.

Poc temps després aquests mateixos autors van proposar una nova terminologia per descriure i classificar les morfologies colonials del gènere *Mycobacterium*, en colònies llises i rugoses (Fregman i Smith, 1961).

Molt posteriorment a aquests primers resultats, nombrosos treballs realitzats estudien les bases estructurals d'aquestes variacions morfològiques. En diferents estudis es demostra l'existència de glicolípid específics d'espècie, LOS i GPL els quals es trobarien directament relacionats amb la morfologia colonial de diferents espècies micobacterianes. En aquests treballs, a més es mostra com aquests lípids i glicolípid es troben presents en les variants morfològiques llises i no en les variants rugoses.

Entre aquests estudis destaquen els resultats obtinguts en *M. kansasii* i *M. mucogenicum*, on es va demostrar que les variacions morfològiques d'aquests micobacteris eren degudes a canvis en el patró de LOS de la paret cel·lular. Van observar que aquests glicolípid es trobaven presents en les colònies de morfologia llisa, mentre que les seves variants rugoses estaven totalment desproveïdes de LOS (Belisle i Brennan, 1989; Muñoz, 1998).

Aquesta correlació també va ser demostrada entre els membres del complex MAC, però en aquest cas els glicolípid implicats eren els GPL. Estudis genètics fets per Belisle i col·laboradors (1993) en *M. avium*, van demostrar que les soques rugoses presentaven una deleció en una àmplia zona de la regió genòmica *ser2*, regió involucrada de la síntesi de GPL. A més van observar que aquesta deleció en el genoma de les colònies rugoses donava lloc a l'alteració del patró d'expressió de GPL en aquestes colònies i també al canvi de morfologia colonial de llisa a rugosa. Posteriorment, Martínez i col·laboradors van determinar el 1999, mitjançant mètodes cromatogràfics, que de totes les morfologies colonials que presenta *M. avium*, les variants llises presentaven grans quantitats de GPL mentre que les variants morfològiques rugoses havien perdut totalment la capacitat de sintetitzar GPL.

Estudis recents amb *M. smegmatis* i *M. abscessus* demostren també que la deficiència en la producció de GPL dona lloc a variants morfològiques rugoses en aquestes soques (Etienne, 2002; Howard, 2006; Kocíncová, 2008). Estudis genètics en *M. smegmatis* van mostrar que si s'alteraven, mitjançant

transposició, els gens implicats en la producció de GPL, s'obtenien variants morfològiques altament rugoses. Aquestes noves variants rugoses diferien de la soca parental en el seu contingut en GPL en la paret cel·lular. Mentre que en la soca original el contingut en GPL representava el 85 % dels lípids exposats a la superfície, el mutant era totalment deficient en aquests glicolípid (Etienne, 2002).

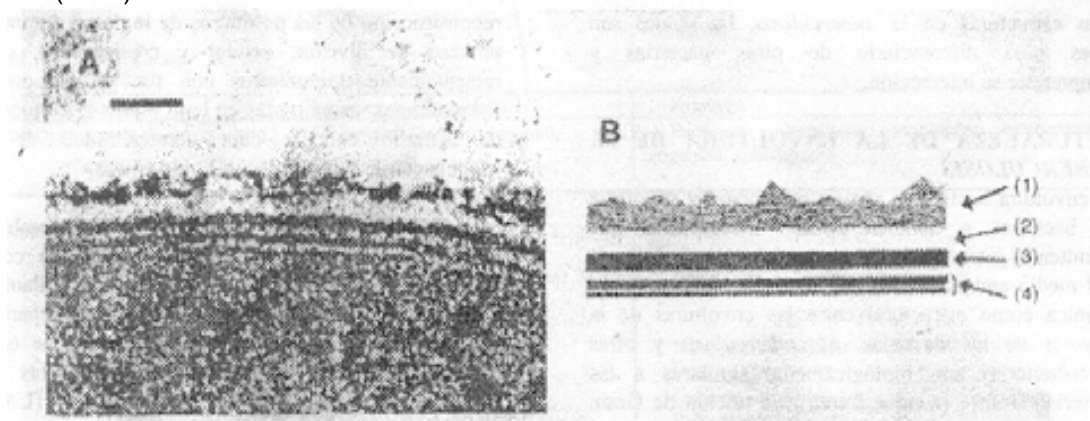
### A.3. L'embolcall del gènere *Mycobacterium*

La morfologia colonial en els micobacteris està relacionada amb el contingut de lípids i glicolípid presents a la part més externa de la paret cel·lular. Els lípids i els glicolípid micobacterians han estat sempre objecte de nombrosos estudis (Hartmans, 2006). Entre els anys 80 i 90, per la seva importància en els estudis taxonòmics per a la diferenciació i caracterització de les diferents espècies de micobacteris (Luquin, 1991; Lanéelle, 1996 i Minnikin, 1984), i actualment, per la implicació d'aquests en funcions biològiques importants com la virulència, la capacitat d'adhesió a diferents superfícies i la motilitat (Falkinham III, 1996; Martínez, 1999; Pinto 2004; Barrera, 2007).

L'embolcall dels micobacteris és un embolcall complex i amb una inusual estructura que està adaptat a donar protecció a aquests microorganismes de les influències externes, i que presenta també mecanismes que permeten l'intercanvi de substàncies entre el bacteri i el medi ambient (McNeil i Brennan, 1991; Barrera, 2007).

L'embolcall micobacterià conté dues parts principals: la membrana citoplasmàtica i, per sobre d'aquesta membrana, la paret cel·lular (Draper i Daffé, 2005). La paret cel·lular apareix mitjançant talls ultrafins com una membrana biològica trilaminar, presenta dues capes electro-denses: una capa externa i una capa interna, separades per una capa transparent, capa mitjana (figura 2) (Draper i Daffé, 2005).

**Figura 2.** Esquema de les diferents capes que formen la paret cel·lular de *M. tuberculosis*. 1, capa externa; 2, capa mitjana; 3, capa interna i 4, membrana plasmàtica. Adaptada de Draper i Daffé (2005).



### A.3.1. La paret cel·lular

La paret cel·lular micobacteriana és una bicapa asimètrica formada per diversos tipus de lípids i glicolípids (Minnikin, 1980), molts dels quals són únics del gènere *Mycobacterium*. Aquests lípids i glicolípids són molt abundants en la paret micobacteriana, i representen més d'un 60 % del pes sec del micobacteri.

La paret dels micobacteris es caracteritza per ser molt complexa i per la seva inusual estructura. L'esquelet de la paret cel·lular dels micobacteris està format per tres macromolècules: el peptidoglicà (PG), l'arabinogalactà (AG) i els àcids micòlics. Tots tres es troben units entre si de forma covalent, mitjançant unions fosfodièsters, i formant un complex anomenat micoloil–arabinogalactà (mAG) (Draper i Daffé, 2005).

D'una altra banda, també trobem formant part de la paret cel·lular, però de forma més minoritària, lípids i glicolípids units de forma no covalent (o lliures) i altres d'units de forma covalent, a l'esquelet del complex mAG: (Brennan, 1995; Drapper, 1998; Ryll, 2001) (figura 3). Els anomenats lípids i glicolípids lliures són aquells els quals s'extrauen fàcilment amb l'ajut de solvents orgànics i es troben situats a la part més externa de la paret cel·lular dels micobacteris (Daffé i Draper, 1998).

#### Lípids lliures

- Menaquinones (MK)
- Dimicocerosats de tiocerol (DIM)

#### Glicolípids lliures

- Aciltrealoses
  - Dimicolat de trealosa (DTM)
  - Monomicolat de trealosa (MMT)
  - Sulfolípid (SL)
  - Diaciltrealoses (DAT)
  - Triaciltrealoses (TAT)
- Lipooligosacàrids (LOS)
- Glicolípids fenòlics (PGL)
- Glicopeptidolípid (GPL)

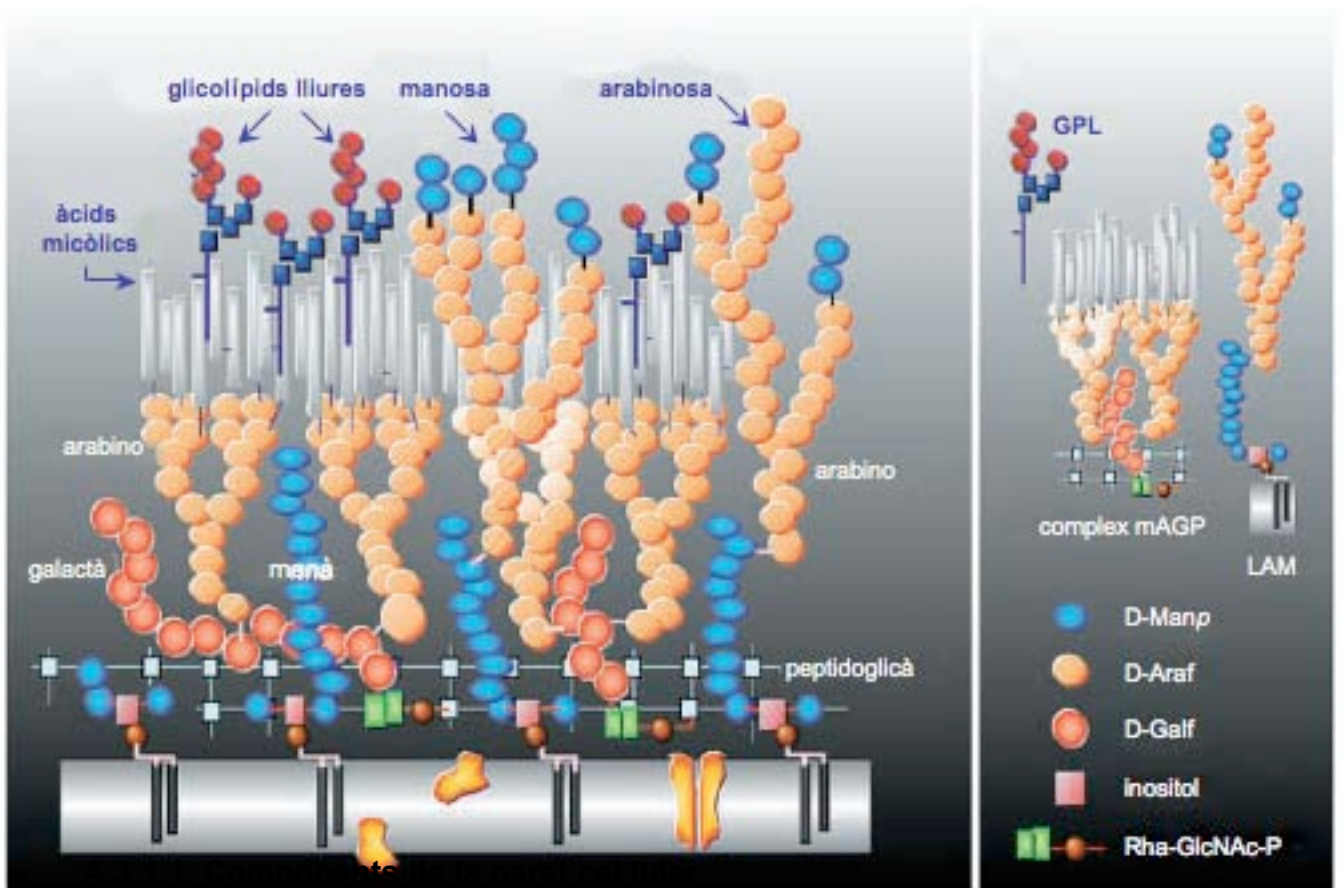
#### Glicans i lipoglicans

- Lipoarabinomanà (LAM)

- Lipomanà (LM)
- Fosfatidilinositolmanòsids (PIM)

A més d'aquests lípids i glicolípidis existeixen proteïnes associades a la paret, algunes amb funcions enzimàtiques (necessàries per a la construcció i reconstrucció dels polímers de la paret durant el procés de divisió cel·lular i creixement) i altres amb funció de porines (Draper i Daffé, 2005). La funció d'aquestes porines a la paret cel·lular dels micobacteris és la de deixar passar els nutrients hidrofílics del medi cap al bacteri. Tot i així, aquestes porines es troben en baix nombre, fet que fa que els micobacteris presentin una permeabilitat baixa per les molècules hidrofíliques.

**Figura 3.** Representació esquemàtica de la paret cel·lular micobacteriana. Adaptada de Chatterjee i Khoo (2001).





### A.3.1.1.1. Peptidoglicà (PG)

El PG és un estructura comuna de la paret de la majoria de bacteris i es responsable de la mida i de la forma de la cèl·lula.

L'estructura del PG micobacterià és un polímer format per unitats repetides d'N-acetilglucosamina i N-glucolilmuràmic que porta unit als grups acil de l'àcid muràmic, cadenes peptídiques curtes com l'L-alanina, la D-isoglutamina, l'àcid mesodianimopimèlic i la D-alanina (Draper i Daffé, 2005).

### A.3.1.1.2. Arabinogalactà (AG)

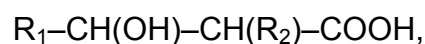
L'AG és un polisacàrid d'arabinosa i galactosa. L'AG representa el 35 % de la paret cel·lular de la majoria dels micobacteris.

Aproximadament un 10–12 % de residus d'àcid muràmic de la paret dels micobacteris es troben units pel seu carboni 6 mitjançant un enllaç fosfodièster, a l'AG. En la porció més distal i externa de l'AG, per l'arabinosa de la seva cadena lateral, es troben fixats de forma covalent, mitjançant enllaços fosfodièsters, els àcids micòlics (Draper i Daffé, 2005).

### A.3.1.1.3. Àcids micòlics

Els àcids micòlics són lípids presents a la paret cel·lular dels gèneres *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* i *Corynebacterium*. Són àcids grassos de cadena linear (entre 60–90 àtoms de carboni)  $\beta$ -hidroxilats i  $\alpha$ -ramificats.

L'estructura general dels àcids micòlics és:



on,  $R_1$  és una cadena alifàtica llarga que conté generalment entre 50 i 56 àtoms de carboni, anomenada meromicolat, que presenta una gran varietat de grups funcionals com: grups metoxi, ceto o epoxi, anells ciclopropan, ramificacions metil i dobles enllaços carboni-carboni. I  $R_2$ , és una cadena curta alifàtica, que generalment conté entre 22 i 26 àtoms de carboni (Steck, 1978).

La diferència entre els àcids micòlics dels diferents gèneres bacterians es troba en el nombre de carbonis que presenten. Els àcids micòlics del gènere *Mycobacterium* presenten aproximadament 80 àtoms de carboni, en canvi, els de *Nocardia* i *Rhodococcus* presenten uns 50 àtoms i els de *Corynebacterium* uns 30 àtoms de carboni (Brennan, 1988).

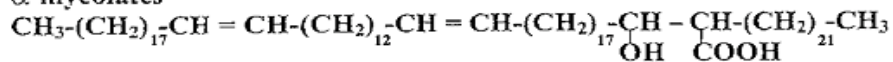
Els àcids micòlics són un dels majors components de la paret micobacteriana ja que representen entre un 40–60 % del pes de la paret cel·lular, i un 40 % dels lípids presents en el complex mAG.

S'han descrit set tipus diferents d'àcids micòlics en relació amb els diversos grups funcionals que presenten en la cadena anomenada meromicolat::  $\alpha$ -micolat,  $\alpha'$ -micolat, cetomicolat, epoximicolat, metoximicolat, "wax-ester" micolat i  $\omega$ -1-metoximicolat (figura 4) (Luquin, 1990; Hartmans, 2006).

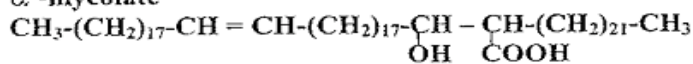
Encara que la majoria dels àcids micòlics en la paret cel·lular dels micobacteris es troben com a èsters lligats a l'AG, alguns són transferits per les micolil-transferases a la  $\alpha$ - $\alpha'$ -trealosa per formar glicolípidis lliures: monomicolat de trealosa (MMT) i dimicolat de trealosa (DMT) (Trias i Benz, 1994).

**Figura 4.** Estructures químiques dels àcids micòlics, adaptada d'Asselineau i Lanéelle (1998).

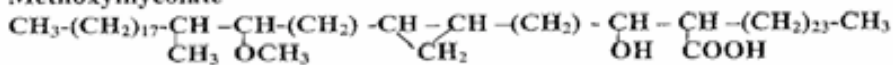
$\alpha$ -mycolates



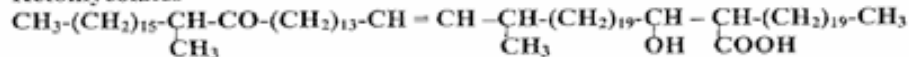
$\alpha'$ -mycolate



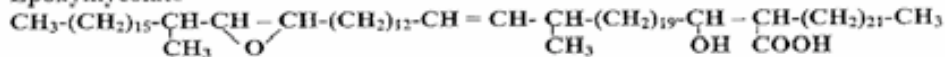
Methoxymycolate



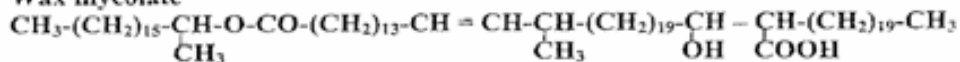
Ketomycolates



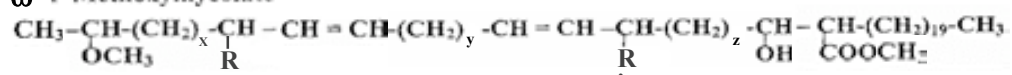
Epoxy mycolate



Wax mycolate



$\omega$ -1-Methoxymycolate



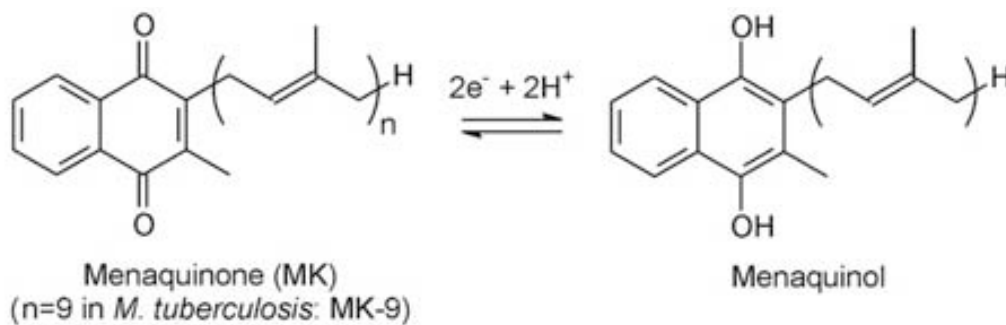
#### A.3.1.1.4. Lípids lliures

##### A.3.1.1.4.1. Menaquinones (MK) i dimicocerosat de tiocerol (DIM)

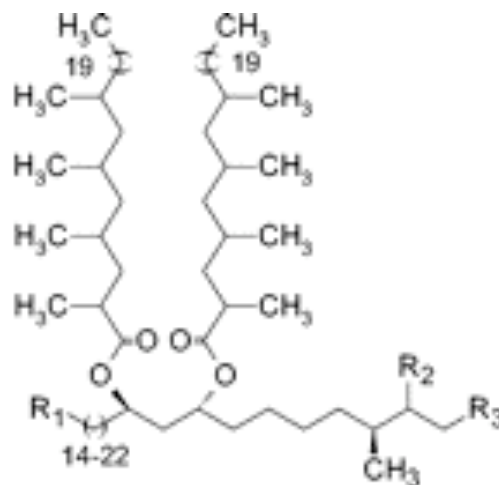
Les MK juntament amb els DIM són els lípids lliures majoritaris de la paret cel·lular dels micobacteris. Les MK es troben presents en totes les espècies del gènere *Mycobacterium*, en canvi, els DIM es troben presents en *M. tuberculosis*

i altres espècies relacionades. Estudis de DIM en *M. tuberculosis* han mostrat que estan relacionats directament amb la virulència de *M. tuberculosis* (Pinto, 2004). L'estructura d'aquests lípids es mostra a la figura 5 i 6.

**Figura 5.** Estructura molecular de la MK-9 de *M. tuberculosis*.



**Figura 6.** Estructura general dels DIM de *M. tuberculosis*.



### A.3.1.1.5. Glicolípidis lliures

#### A.3.1.1.5.1. Aciltrealoses

Les aciltrealoses són compostos que comparteixen una mateixa estructura basada en una molècula de trealosa esterificada per àcids micòlics o altres cadenes d'àcids grassos (figura 7).

#### A.3.1.1.5.1.1. Dimicolat de trealosa (DMT)

L'estructura del DMT és un 6,6'-dimicoloil- $\alpha,\alpha'$ -D-trealosa (Figura 7). El DMT es caracteritza per tenir uns 170 àtoms de carboni i tenir el seu punt de fusió a 44–45 °C. La seva trealosa es troba esterificada amb dues molècules d'àcids micòlics.

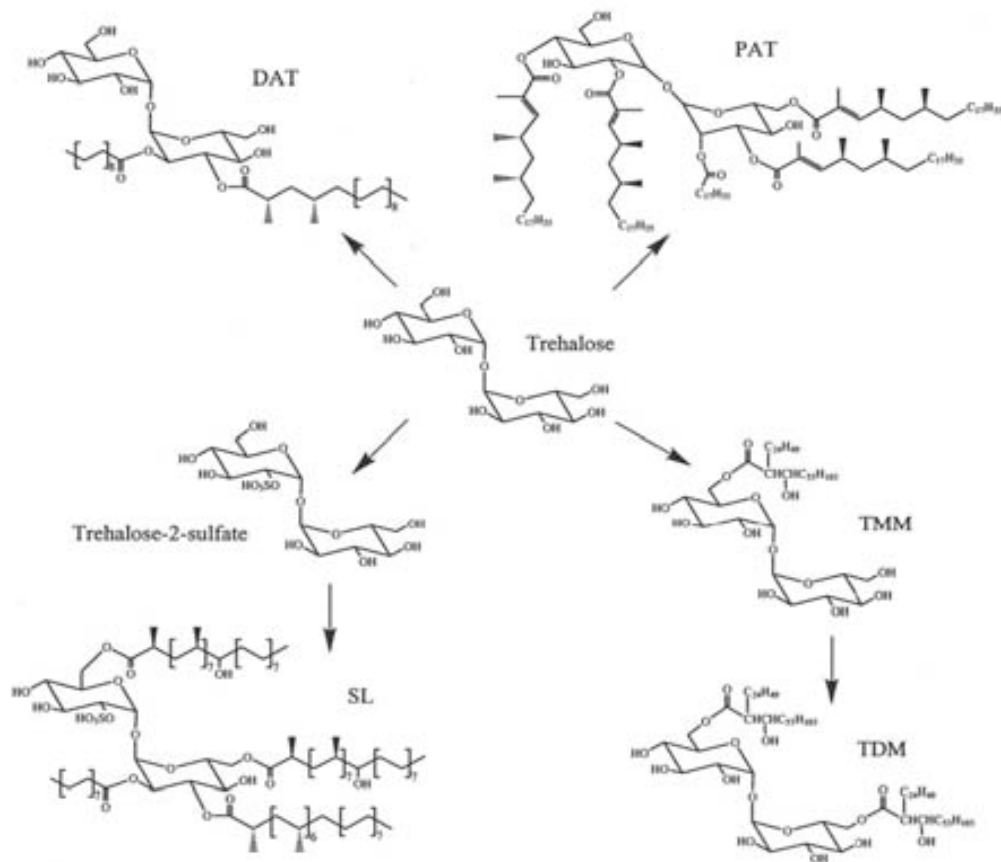
El DMT es troba a tots els membres del gènere, i no només és característic del gènere *Mycobacterium*, sinó que s'ha trobat també en altres gèneres bacterians com *Nocardia*, *Rhodococcus* o *Corynebacterium*, però es diferencien del DMT del gènere *Mycobacterium* pel nombre de carbonis dels seus àcids micòlics.

El DMT és un dels glicolípid més estudiats i més important, ja que se li reconeix un gran nombre d'efectes en el sistema immune a més a més d'estar involucrat en l'aspecte de cordes que presenta *M. tuberculosis* (Ryll, 2001 i Barrera, 2007). Entre les principals activitats biològiques reconegudes destaca el seu efecte tòxic en ratolí (Kato, 1972; Goren i Brennan, 1979) i la seva activitat antitumoral i angiogènica (Yamagami, 2001).

#### A.3.1.1.5.1.2. Sulfolípids (SL)

Els SL són components exclusius de soques virulentes de *M. tuberculosis*. Estan formats per una trealosa sulfatada esterificada per àcid palmític, àcid esteàric i dues àcids grassos polimetil ramificats (Goren, 1970). El SL-I, amb estructura: 2,3,6,6'-tetracil- $\alpha,\alpha'$ -D-trealosa 2' sulfat, és el sulfolípid majoritari en *M. tuberculosis* H37Rv (figura 7).

**Figura 7.** Glicolípidis lliures majoritaris de *M. tuberculosis* basats en una molècula de trealosa: les trehaloses multiacilades (PAT), el DMT, els SL i les diaciltrehaloses (DAT). Adaptada de Jackson i col·laboradors (2007).



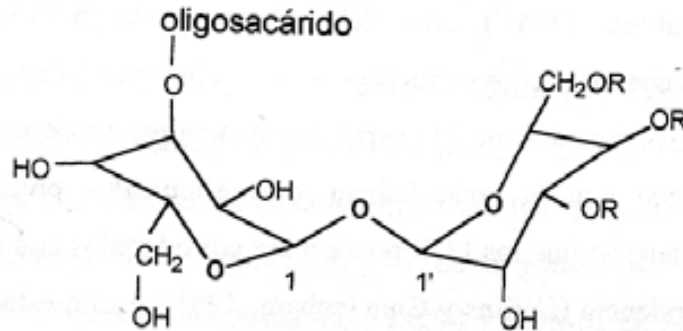
#### A.3.1.1.5.1.3. Diaciltrehaloses (DAT) i triaciltrehaloses (TAT)

La DAT (2,3–diaciltrealosa) és una molècula de trealosa que es troba esterificada per dues àcids grassos polimetilramificats (Baer, 1993) (figura 7). Les DAT es troben presents en *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* i *M. fortuitum*.

Les TAT (2,3,6–triaciltrealosa) tenen una estructura similar a les DAT però se'n diferencien perquè presenten una tercera molècula d'àcids grassos esterificant la trealosa (Muñoz, 1997). Es troben presents en *M. tuberculosis* i *M. fortuitum*.

#### A.3.1.1.5.2. Lipooligosacàrids (LOS)

Els LOS són glicolípidis que presenten un nucli comú de poliàcil trehaloses O–metilades, que es troba glicosilat per una o més unitats oligosacàrides. Els diferents LOS que presenta una mateixa espècie micobacteriana es difereixen principalment en la part oligosacàrida (figura 8). Els LOS es troben distribuïts en moltes espècies del gènere, entre elles *M. tuberculosis*.

**Figura 8.** Estructura química dels LOS. R, grups acilats.

#### A.3.1.1.5.3. Glicolípidis fenòlics (PGL)

Els PGL estan formats per un grup fenol i un tiocerol, esterificat per dues àcids grassos multimetil-ramificats (micoceròsic o tiocerànic). La seva part glucosídica unida al grup fenol pot contenir entre un i quatre sucres.

Els PGL els trobem en micobacteris patògens obligats i oportunistes, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. haemophilum* i *M. canetti*.

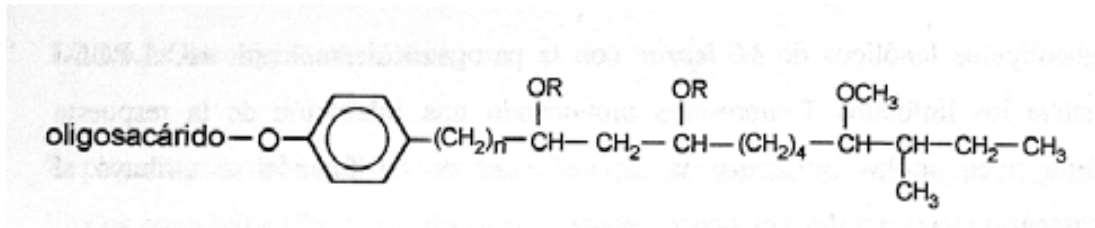
#### A.3.1.1.5.4. Glicopeptidolipids (GPL)

Els GPL presenten un nucli lipopeptidil que consisteix en un cadena acilada i un tripèptid format pels aminoàcids D-fenilalanina, D-treonina i D-alanina (figura 9).

Els GPL són els glicolípidis principals de la capa més externa dels micobacteris del grup MAC, *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. simiae*, *Mycobacterium habana*, *M. paratuberculosis*, *M. xenopi*, *Mycobacterium butyricum*, *Mycobacterium peregrinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *Mycobacterium senegalense* i *Mycobacterium porcinum* (Chatterjee, 2001; Schoney i Sweet, 2008)

Els GPL han estat molt estudiats pel seu paper en la morfologia colonial i la motilitat de les espècies *M. avium* i *M. smegmatis* (Martínez, 1999; Recht, 2000).

**Figura 9.** Estructura química dels GPL. R, àcids grassos de cadena llarga.



#### A.3.1.1.6. Glicans i lipoglicans

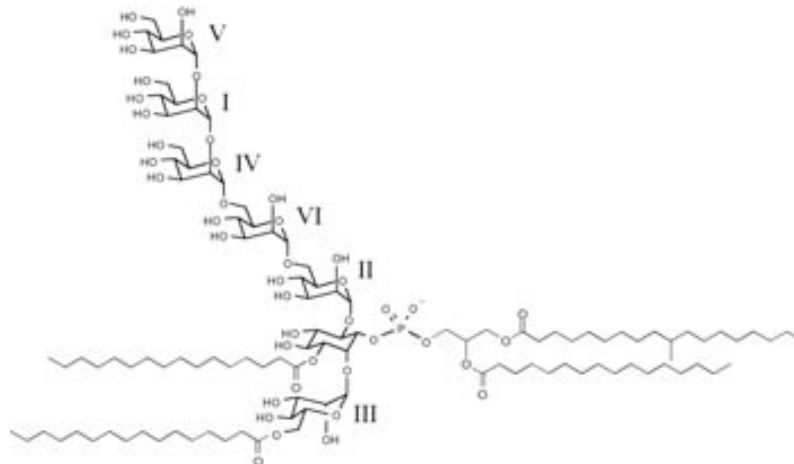
Aquest grup està format majoritàriament per glicans que es troben units de forma covalent a la membrana citoplasmàtica mitjançant un fosfatidilinositol i s'estenen al llarg de la paret cel·lular.

##### A.3.1.1.6.1. Fosfatidilinositolmanòsids (PIM)

L'any 1939 Anderson i col·laboradors van descriure per primer cop que les fraccions fosfolipídiques estretes de *M. tuberculosis* i altres micobacteris estudiats contenen inositol i manosa. Estudis realitzats posteriorment per Ballou i col·laboradors (1963) i per Lee i Ballou (1965) a partir d'extractes lipídics extrets de *M. tuberculosis* i *M. phlei*, van permetre descriure l'estructura dels PIM i la posició de les molècules de manosa unides al fosfatidilinositol (PI).

Les molècules de fosfatidilinositol poden portar unides a l'anell d'inositol d'1 a 6 molècules de D-manosa i produeixen 6 PIM diferents: fosfatidil-manòsid (I), fosfatidil-dimanòsid (II), fosfatidil-trimanòsid (III), fosfatidil-tetramanòsid (IV), fosfatidil-pentamanòsid (V) i fosfatidil-hexamanòsid (VI) (figura 10).

**Figura 10.** Estructura química del PIM-6 de *M. tuberculosis*.



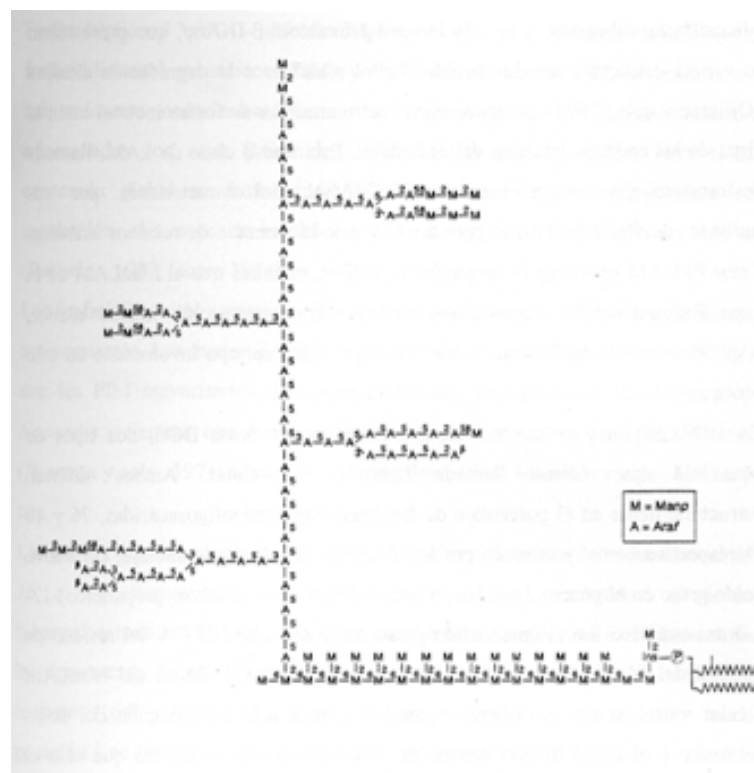
Aquests lípids es troben tant en la seva forma lliure, com units de forma covalent a la membrana citoplasmàtica del micobacteri. Aquests lípids els trobem en tots els membres del gènere *Mycobacterium*.

#### A.3.1.1.6.2. Lipoarabinomanà (LAM) i lipomanà (LM)

El LAM i LM són lipoglicans d'alt pes molecular formats per successives addicions de manosa a una molècula de PI. En el cas del LAM a més de la manosa, presenta un altre polisacàrids unit al PI, el D-arabinomanà (figura 11) (Nigou, 2003).

Segons l'espècie varia la mida, el grau d'unió i el nombre de residus de manosa en aquests lipoglicans. Els LAM i LM els trobem en tots els membres del gènere *Mycobacterium*.

**Figura 11.** Estructura química del LAM. R, àcids grassos de cadena llarga. Adaptada de Besra i Chatterjee (1994).





#### A.4. Hidrofobicitat cel·lular

Les propietats hidrofòbiques dels bacteris vénen donades per una complexa interacció entre els diferents components polars i apolars que formen part i es troben exposats a l'exterior de la superfície cel·lular (Doyle, 2000).

La localització i la distribució dels components hidrofòbics al llarg de l'embolcall cel·lular és un factor important en les propietats hidrofòbiques del bacteri. Quan els grups hidrofòbics i hidrofílics es troben tots dos formant part per igual de la superfície cel·lular, les interaccions hidrofòbiques es veuen neutralitzades per les unions dominants entre les molècules d'aigua i els grups hidrofílics. Es per això que perquè una superfície tingui caràcter hidrofòbic, les molècules hidrofòbiques en l'embolcall cel·lular han d'estar cobrint gran part d'aquest embolcall i en concentracions elevades respecte de les molècules hidrofíliques, o han de trobar-se localitzades i concentrades en zones (Doyle i Rosenberg, 1990).

Diferents estudis han determinat les propietats hidrofòbiques de determinats lípids i glicolípid localitzats a l'exterior de la paret cel·lular dels micobacteris. Un dels glicolípid més estudiat ha estat el DMT. Behling i col·laboradors (1993), van analitzar les característiques hidrofòbiques de diferents glicolípid purificats de la paret cel·lular de *M. smegmatis*, entre els quals, el DMT. Els resultats obtinguts d'aquest estudi van mostrar que quan aquests glicolípid entraven en contacte amb una solució aquosa, s'agrupaven formant una monocapa insoluble i estable en la interfase aire-aigua. Amb aquests resultats els autors van demostrar l'elevada insolubilitat dels DMT en aigua i, per tant, les característiques altament hidrofòbiques del DMT.

En el gènere *Mycobacterium*, hi ha diferents estudis on es mostren les característiques hidrofòbiques de determinats micobacteris.

Loosdrecht i col·laboradors (1987), van mesurar les propietats hidrofòbiques de la paret cel·lular d'una llarga llista de bacteris, entre els quals la de *M. phlei*. Els resultats obtinguts van mostrar que *M. phlei* juntament amb *Corynebacter sp.* presentaven característiques altament hidrofòbiques, sent aquestes les més elevades en comparació amb la resta de bacteris analitzats.

Un recent estudi, va analitzar les alteracions de les característiques hidrofòbiques de la paret cel·lular de *M. bovis* BCG, després de sotmetre'l a l'acció de diferents antimicobacterians: isoniazida, etionamida, etambutol i estreptomina. L'anàlisi de la hidrofobicitat micobacteriana, després dels diferents tractaments amb els antibiòtics, es va dur a terme mitjançant microscòpia de força química, amb la qual van obtenir imatges topogràfiques de la paret cel·lular, van poder quantificar-ne la rugositat, a més de correlacionar els canvis estructurals amb variacions de les propietats químiques de la paret cel·lular. Els resultats obtinguts van mostrar que totes les drogues

testades induïen modificacions en la superfície cel·lular de *M. bovis* BCG, encara que amb la isoniazida i l'etambutol s'obtenia un gran descens en la hidrofobicitat de la superfície cel·lular. A més a més, els autors van atribuir aquest descens de la hidrofobicitat a l'alteració de la capa externa d'àcids micòlics, la qual cosa donaria lloc a l'exposició massiva en la superfície dels LAM (Alsteens, 2007).

Etienne i col·laboradors (2002) mesuraren la hidrofobicitat de la paret cel·lular en *M. smegmatis*. En aquest treball, els autors van analitzar com afectava a les característiques hidrofòbiques de *M. smegmatis* l'absència de GPL en l'embolcall cel·lular. Els resultats obtinguts van mostrar que la soca mutant de *M. smegmatis*, la qual era defectiva en la producció de GPL, presentava un índex de hidrofobicitat cel·lular significativament superior al de la soca original. Els autors van descriure que l'absència d'aquests glicolípid en l'estructura de la paret cel·lular donaria lloc a canvis en la distribució dels lípids i glicolípid en l'embolcall micobacterià, i que aquests canvis serien els responsables d'un increment en l'exposició a l'exterior de la paret cel·lular, d'altres lípids altament hidrofòbics.

L'any 2005, aquests mateixos autors van fer un estudi similar amb altres soques de *M. smegmatis*. En aquest estudi van comparar la hidrofobicitat de la superfície cel·lular de *M. smegmatis* ATCC 607, (soca de morfologia rugosa), amb la de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (soca mutant de morfologia llisa procedent de la soca original ATCC 607) i que presenta una elevada eficiència de transformació i diferències en la superfície cel·lular respecte de la soca original. Els autors van observar variacions en les proporcions de GPL i LOS en la paret cel·lular de les dues soques, responsables de les diferències de morfologia colonial entre elles; encara que no van trobar diferències significatives en la hidrofobicitat entre totes dues soques (Etienne, 2005).

Aquest interès recent per l'estudi de les característiques hidrofòbiques del gènere *Mycobacterium* es deu al fet que s'ha determinat que aquestes propietats hidrofòbiques juguen un paper important en la interacció dels micobacteris amb el seu entorn. L'alta hidrofobicitat dels micobacteris contribueix a la seva adherència a superfícies o teixits, a la formació d'aerosols i a la resistència a antibiòtics i desinfectants (Primm, 2004; Falkinham III, 1996).

Tal com s'ha explicat a l'apartat A.2.3, d'aquesta tesi, l'aigua és un reservori ambiental important i un vehicle important per a la transmissió de MNT. A més, diverses espècies de MNT es troben relacionades amb infeccions humanes via l'aigua i presenten una resistència elevada als productes de desinfecció usats en aquestes aigües (Falkinham III, 2004 i Hartmans, 2006). Per tant, l'estudi de la hidrofobicitat i la capacitat d'adhesió a diferents materials ens pot ajudar a entendre i determinar els mecanismes de colonització, persistència i transmissió dels MNT en el medi ambient.

## A.5. Biopel·lícules bacterianes

La majoria de microorganismes presents a la natura tendeixen a proliferar adherits a diferents tipus de superfícies, formant el que s'anomena biopel·lícula.

Les biopel·lícules microbianes es defineixen com a comunitats de microorganismes que creixen adherits a una superfície inert o un teixit viu, embolcallts d'una matriu extracel·lular que ells mateixos sintetitzen (Hall–Stoodley i Stoodley, 2005).

Les biopel·lícules representen una forma habitual de creixement dels microorganismes a la natura. En general, els bacteris tenen la capacitat de colonitzar superfícies en una gran varietat d'ambients. La capacitat de formar biopel·lícules no es troba restringida a un grup específic de microorganismes ja que en condicions ambientals adequades tots són capaços de formar-ne. Els trobem en la majoria d'ambients naturals o artificials ja siguin units a una superfície (adhesió cel·lular), en forma de floccs en un medi líquid o en forma de biopel·lícula en la interfase aire–líquid (Branda, 2005).

Els bacteris que viuen formant colònies i units a una superfície tenen grans avantatges respecte a una única cèl·lula. La formació de biopel·lícules representa una estratègia de supervivència, en la qual els diferents microorganismes que els formen es troben en un equilibri dinàmic. Aquests ofereixen a les cèl·lules importants beneficis com per exemple: protecció a canvis ambientals, a la dessecació, a gradients químics tòxics, a radiacions UV, a la limitació de nutrients i a canvis de pH i temperatura (Hall–Stoodley i Stoodley, 2005).

La composició de les biopel·lícules és variable. És extremament difícil generalitzar sobre la seva estructura, composició i activitats fisiològiques, encara que, en general, el component majoritari de les biopel·lícules és l'aigua, que representa al voltant d'un 97 % del seu contingut total (taula 4).

A més d'aigua i de les cèl·lules microbianes, en la biopel·lícula trobem la matriu extracel·lular, formada principalment per exopolisacàrids i en menor quantitat proteïnes, ADN, nutrients, metabòlits i diferents productes de la lisi bacteriana (Sutherland, 2001) (taula 4).

**Taula 4.** Composició de les biopel·lícules en superfície, proposada per Sutherland (2001).

Components	% de la biopel·lícula
Aigua	97%
Cèl·lules microbianes	2–5%
Polisacàrids	1–2%
Proteïnes (extracel·lulars i producte de la lisi)	<1–2%
ADN i ARN (producte de la lisi)	<1–2%

### A.5.1. Adhesió cel·lular en el gènere *Mycobacterium*

El gènere *Mycobacterium* ha estat identificat com un eficient colonitzador de superfícies. Els micobacteris ambientals es troben molt ben adaptats als medis aquàtics, els trobem formant biopel·lícules en xarxes de distribució d'aigües domèstiques, en aquaris i plantes de tractament d'aigües (Primm, 2004; Williams, 2009). A més, s'ha determinat que l'elevada hidrofobicitat de la paret cel·lular, la presència de determinats lípids i glicolípidis en l'embolcall cel·lular i la capacitat de motilitat de determinats micobacteris, juguen un paper molt important en la persistència i colonització micobacterianes a l'ambient (Hall–Stoodley i Lappin–Scott, 1998; Primm, 2004).

Diferents estudis mostren la capacitat de diferents micobacteris per adherir-se a diversos materials i mostren com els GPL, podrien estar implicats en la capacitat d'adhesió a diferents superfícies en *M. smegmatis*, *M. abscessus* i *M. avium* (Recht, 2000; Freeman, 2006; Howard, 2006; Yamazaki, 2006; Kocíncová, 2008; Wu, 2009).

Estudis genètics en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, demostren que aquesta soca mòbil i que presenta GPL en la seva paret cel·lular, és capaç d'adherir-se a superfícies de policlorur de vinil (PVC). En canvi, mutants rugosos immòbils, obtinguts per transposició, els quals presenten una alteració en l'expressió del gen *mps* (gen relacionat amb la síntesis dels GPL), haurien perdut aquesta capacitat d'adherir-se al PVC (Recht, 2000).

Estudis més recents i realitzats també en *M. smegmatis*, però aquests amb la soca de morfologia rugosa ATCC 607, van mostrar que mutants amb morfologia llisa, obtinguts de forma espontània a partir de successius cultius de la soca ATCC 607, presentaven una superproducció de GPL respecte de la soca original. A més, l'anàlisi comparativa de la capacitat de motilitat i d'adhesió al plàstic entre la soca original i la soca llisa mutant, va mostrar que

mentre que la soca original rugosa era incapaç d'adherir-se al plàstic i de lliscar per la superfície de l'agar, la soca mutant llisa s'adheria eficientment al plàstic i presentava motilitat. Analitzant genèticament totes dues morfologies colonials, van mostrar que l'aparició d'aquests mutants llisos era deguda a una alteració de la regió promotora de l'operó *mps* degut als elements d'inserció mòbils IS1096 i ISMsm3 (Kocíncová, 2008).

Un estudi recent realitzat amb un aïllat clínic rugós de *M. abscessus* i les seves respectives variants morfològiques llises i rugoses, obtingudes de forma espontània, va mostrar que les dues soques rugoses, les quals eren defectives en GPL, eren incapaces d'adherir-se i créixer en una superfície de poliestirè (PS) a diferència de la soca espontània llisa, rica en GPL, que sí que ho era capaç (Howard, 2006).

Estudis realitzats en *M. avium*, una altra espècie micobacteriana en què les variants llises presenten GPL, van mostrar també aquestes diferències d'adherència entre morfologies colonials llises i rugoses. Freeman i col·laboradors (2006), van demostrar que els GPL eren necessaris, en *M. avium*, per a la colonització d'algunes superfícies, però en cap cas per a totes. Els resultats obtinguts en aquest estudi van mostrar que les variants llises s'adherien a tots els materials testats (PVC, Permanox® i vidre); en canvi, els mutants rugosos de *M. avium*, obtinguts de l'alteració de l'expressió del gen *mps* per transposició, eren defectius en l'adhesió al PVC, encara que aquests s'adherien bé a les altres dues superfícies testades.

Un altre estudi fet el mateix any en *M. avium*, va identificar diferents gens associats a la formació de biopel·lícules, molts dels quals es trobaven relacionats en la síntesi de GPL. Els resultats d'aquest estudi van mostrar que l'alteració de l'expressió de diferents gens per transposició en una soca de *M. avium* formadora de gran quantitat de biopel·lícules en PVC, donava lloc a l'obtenció de mutants incapaçs de formar biopel·lícules en aquest material. En aquest estudi, però, no van analitzar el patró de GPL dels mutants obtinguts (Yamazaki, 2006).

Wu i col·laboradors (2009) van evidenciar l'impacte de l'alteració del gen *pstA*, gen relacionat juntament amb *pstB* en la biosíntesi de GPL en la capacitat de producció de biopel·lícules en *M. avium* subespècie *paratuberculosis*. Els resultats obtinguts per aquests autors van mostrar com els mutants defectius en l'expressió d'aquest gen presentaven una reducció significativa en la seva habilitat de formar biopel·lícules en PVC en comparació amb la soca parental, especialment al cap de 7 i 9 dies de la inoculació (Wu, 2009).

En tots els estudis anteriorment citats es senyala que els GPL tindrien un paper important en la capacitat d'adhesió cel·lular a diferents superfícies en

determinats micobacteris. Però s'ha vist que no són els únics glicolípidis que podrien estar relacionats amb aquesta capacitat.

Estudis realitzats en *M. marinum* van mostrar que els LOS podrien estar implicats en la capacitat d'adhesió a la sílica en aquesta espècie micobacteriana. En aquest article, els autors van estudiar el paper dels LOS en la motilitat i en la formació de biopel·lícules. Els resultats obtinguts van mostrar defectes en la motilitat per la superfície de l'agar i en la capacitat d'adhesió a la sílica en mutants defectius en la síntesi de LOS, la qual cosa indica que els LOS podrien contribuir a la persistència i colonització d'aquesta espècie en l'ambient (Ren, 2007).

### **A.5.2. Formació de biopel·lícules en la interfase líquid–aire en micobacteris**

La formació de biopel·lícules bacterianes en la interfase també ha estat considerada com una forma d'adhesió microbiana. Les biopel·lícules en la interfase es defineixen com agrupacions de cèl·lules en una interfase d'un sistema aquàtic, i aquesta interfase pot ser líquid–líquid, líquid–aire o líquid–gas.

S'ha determinat que les característiques hidrofòbiques de la paret cel·lular bacteriana juguen un paper important en la formació de biopel·lícules en la interfase ja que generalment les cèl·lules relacionades amb aquestes biopel·lícules presenten característiques altament hidrofòbiques (Doyle i Rosenberg, 1990; Branda 2005).

Estudis en el gènere *Mycobacterium* han determinat que aquest gènere és capaç de formar biopel·lícules en la interfase líquid–aire (Hartmans, 2006). Falkinham III i col·laboradors (1996), van descriure que l'elevada hidrofobicitat que presenten els micobacteris era la responsable que els micobacteris tendissin a concentrar-se en gran nombre en les interfases aire–aigua, la qual cosa afavoreix la transmissió d'aquests bacteris mitjançant aerosols, a més d'afavorir la persistència d'aquests microorganismes en els sistemes de distribució d'aigua.

Estudis recents mostren la implicació dels àcids micòlics que es trobaven formant part de l'estructura de lípids i glicolípidis, en la formació d'aquestes biopel·lícules en la interfase, en aquest gènere bacterià.

Estudis en *M. tuberculosis* relacionen la capacitat de formació de biopel·lícules en la interfase líquid–aire amb la presència de DMT en la seva paret cel·lular. Estudis realitzats amb dos aïllats clínics de *M. tuberculosis*, mostren que les diferències en la formació de biopel·lícules entre les dues soques són degudes a l'exposició o no del DMT a l'exterior de l'embolcall

cel·lular. Mentre que la soca que presentava DMT, creixia ràpidament formant un tel per tota la superfície del cultiu líquid i, fins i tot, abastava les parets del recipient, la soca que no presentava aquest glicolípid en l'embolcall cel·lular produïa biopel·lícules petites i poc estables, les quals mai no arribaven a cobrir la totalitat de la superfície del medi de cultiu (Hunter, 2006).

Altres estudis, aquest cop en *M. smegmatis*, mostren que la formació de biopel·lícules es troba directament relacionada amb la síntesi d'àcids micòlics, que es trobaven localitzats a la matriu extracel·lular.

Ojha i col·laboradors (2005) investigant la capacitat de formació de biopel·lícules en la superfície del medi de cultiu en *M. smegmatis*, van identificar nous components cel·lulars necessaris en la formació d'aquestes biopel·lícules micobacterianes. Aquests autors van mostrar, analitzant el patró d'àcids micòlics, que aquest patró era totalment diferent entre els bacils que creixien de forma lliure pel medi de cultiu líquid i els que es trobaven formant part de la biopel·lícula micobacteriana. Els autors van trobar, en els bacils que formaven part de la biopel·lícula, àcids micòlics de cadena més curta que els originals. A més a més, van demostrar com GroEL1, proteïna membre de la família de les xaperones Hsp60, era necessària en l'etapa de maduració de la biopel·lícula en la interfase. Una mutació en el gen que modula la síntesi de GroEL1 donava lloc a soques defectives en la producció d'aquests àcids micòlics curts i, com a conseqüència, aquestes soques generaven unes biopel·lícules en la interfase molt febles i poc compactes (Ojha, 2005; Zambrano i Kolter, 2005).

Dos estudis en *M. smegmatis* van mostrar com soques mutants en el gen *lsr2*, obtingudes per transposició, presentaven una alteració en la morfologia colonial a més de ser defectives en la formació de biopel·lícules en la interfase (Chen, 2006; Arora, 2008). Chen i col·laboradors (2006), mitjançant l'estudi del patró de lípids i glicolípid van demostrar que aquests mutants no eren defectius en la producció de GPL sinó que no sintetitzaven uns lípids apolars desconeguts. Els autors van determinar l'estructura d'aquests nous lípids com a àcids micòlics els quals es trobaven esterificant molècules de diacilglicerol i els van anomenar mycolyl–diacylglycerols (Chen, 2006).

## A.6. El genoma micobacterià

En els últims anys s'han determinat les seqüències completes dels genomes de les espècies micobacterianes que es relacionen a la taula 5.

La mida del genoma dels micobacteris està compresa entre els 3 i  $5,5 \times 10^9$  daltons. L'ADN micobacterià presenta un contingut alt en G+C, al voltant del 60–70 %. La presència d'ADN extracromosòmic (plasmídic) ha estat ben

demonstrat en diverses espècies micobacterianes, tant en micobacteris patògens de creixement lent com en micobacteris no patògens de creixement ràpid (Hartmans, 2006).

L'organització i les seqüències dels gens codificants per l'ARNr 16S han estat àmpliament estudiades en micobacteris. L'ARNr 16S es pot aïllar i seqüenciar fàcilment i aquestes seqüències són usades en la determinació de les relacions filogenètiques entre espècies micobacterianes (Tortoli, 2003 i 2006; Hartmans, 2006).

**Taula 5.** Llista de soques micobacterianes amb el genoma complet seqüenciat (NCBI Genome Database).

<b>Soques micobacterianes</b>	<b>Referència</b>
<i>M. abscessus</i>	NCBI Genome Database
<i>M. avium</i> 104	NCBI Genome Database
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> K-10	Li <i>et al.</i> 2005
<i>M. bovis</i> BCG	Seki <i>et al.</i> 2009
<i>M. bovis</i> AF2122/97	<a href="http://genolist.pasteur.fr/BoviList">http://genolist.pasteur.fr/BoviList</a> Garnier <i>et al.</i> 2003
<i>M. gilvum</i> PYR-GCK	NCBI Genome Database
<i>M. leprae</i> TN	<a href="http://genolist.pasteur.fr/Leproma">http://genolist.pasteur.fr/Leproma</a> Cole <i>et al.</i> 2001
<i>M. marinum</i>	Stinear <i>et al.</i> 2008
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	NCBI Genome Database
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	Fleischmann <i>et al.</i> 2002
<i>M. tuberculosis</i> F11	Birren <i>et al.</i> 2007
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	Zheng <i>et al.</i> 2008
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<a href="http://genolist.pasteur.fr/TubercuList">http://genolist.pasteur.fr/TubercuList</a> , Cole <i>et al.</i> 1998
<i>M. ulcerans</i> Agy99	<a href="http://genolist.pasteur.fr/BuruList">http://genolist.pasteur.fr/BuruList</a> Stinear <i>et al.</i> 2007
<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	Copeland <i>et al.</i> 2006



### A.6.1. Mètodes d'expressió de gens en el gènere *Mycobacterium*

Els mètodes d'expressió de gens en el gènere *Mycobacterium* van començar a sorgir en els anys 90, quan diferents investigadors van desenvolupar diferents eines genètiques adequades per a la transformació d'aquest gènere. La complexitat de la paret cel·lular d'aquest gènere ha estat un dels obstacles principals per al desenvolupament de mètodes eficients de transformació.

Entre els majors assoliments en genètica de micobacteris dels anys 90, cal destacar l'obtenció de la soca mutant *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, la qual presenta una eficiència de transformació entre 4–5 ordres superior que la soca parental mc<sup>2</sup>6 (Snapper, 1990), la descripció del plasmidi pAL5000 de *M. fortuitum* capaç de replicar-se eficientment en una gran varietat d'espècies micobacterianes (Ranes, 1990) i el desenvolupament de mètodes eficients d'aïllament de l'ADN micobacterià (González–Merchand, 1996).

Actualment l'electroporació és l'eina més utilitzada per a la transformació de micobacteris (Goude i Parish, 2008).

### A.6.2. Estudis genètics dels canvis en la morfologia colonial dels micobacteris

Durant els últims anys han augmentat molt els estudis genètics per determinar les bases moleculars relacionades amb els canvis de morfologia colonial. Entre les espècies micobacterianes més estudiades destaquen, *M. avium* i *M. smegmatis*. Diferents articles mostren com la deleció de regions genòmiques involucrades en la biosíntesi de GPL, mitjançant transposició, dona lloc a un canvi de morfologia colonial de llisa a rugosa, en aquests micobacteris (Belisle, 1993; Billman–Jacobe, 1999; Recht, 2000; Etienne, 2002; Laurent, 2003; Kocíncová, 2008).

En *M. avium*, cal destacar els treballs realitzats per Belisle i col·laboradors el 1993. Aquests autors van fer un ampli estudi en el qual van definir els mecanismes genètics responsables de la pèrdua de l'expressió de GPL entre les variants morfològiques rugoses en *M. avium*. En aquest estudi, examinant i comparant els genomes de les diferents variants morfològiques mitjançant mapejat genòmic i hibridació, van trobar que els mutants rugosos de *M. avium* diferien genèticament de les colònies llises per la presència en els mutants de deleccions (d'aproximadament 28 Kb) en la regió genòmica *ser2*, regió involucrada de la síntesi de GPL.

Una dècada més tard, Laurent i col·laboradors (Laurent, 2003) van identificar dos gens (*pstA* i *pstB*) involucrats en la biosíntesi de la paret cel·lular i en la morfologia colonial en *M. avium*. Aquest estudi es va dur a terme

mitjançant l'alteració genètica per transposició i el posterior anàlisi genètic dels mutants rugosos obtinguts. Els resultats d'aquest estudi van mostrar que tots els mutants obtinguts presentaven grans delecions en el seu genoma i que aquestes delecions codificaven per a un enzim de la família de les pèptid sintetases. Els autors van concloure que aquests gens es trobaven directament relacionats amb l'alteració de l'expressió de GPL i amb el canvi de morfologia colonial en *M. avium*.

Altres estudis genètics, aquest cop en *M. smegmatis* van mostrar que mutants rugosos espontanis d'aquesta espècie eren defectius en la síntesi de GPL. Aquesta inhibició era deguda a una alteració del gen *mps* que codifica per a un enzim de la família de les pèptid sintetases, implicat en la síntesi. La interrupció d'aquest gen en la soca original mitjançant transposició, va donar lloc a colònies amb un fenotip rugós similar al mutant obtingut de forma espontània, a més a més de la pèrdua de l'expressió dels GPL (Billman-Jacobe, 1999; Recht, 2000; Etienne, 2002).

Kocíncová i col·laboradors (2008) van mostrar com els canvis de morfologia colonial que tenen lloc de forma espontània en *M. smegmatis* són deguts a la transposició de dues seqüències d'inserció mòbils, IS1096 i ISMsm3. Els resultats obtinguts mostren com aquestes dues seqüències d'inserció mòbils es troben presents en regions genòmiques, en les variants morfològiques llises de *M. smegmatis*, les quals es troben involucrades en la biosíntesi de GPL (gens *mps* i *Isr2*). Aquest fet fa que les variants espontànies llises produeixin grans quantitats de GPL respecte a la soca original de morfologia rugosa, que no presenta aquestes seqüències d'inserció en aquestes regions del genoma (Kocíncová, 2008).

Un estudi recent en *M. abscessus*, on per primer cop es van obtenir mutants estables i ben definits en aquesta espècie, mostra també eines genètiques eficients en l'estudi de l'alteració del patró de GPL en aquesta espècie. En aquest estudi es van comparar diferents mètodes genètics a fi d'alterar l'expressió del gen *mmpL4b*, gen involucrat en la síntesi de GPL. Els resultats obtinguts van mostrar que el sistema de recombinació era el mètode més eficaç per a aquesta espècie, encara que l'eficiència de transformació era dues ordres de magnitud inferior que l'obtinguda en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 o *M. tuberculosis*. De tots els transformants obtinguts pel mètode de recombinació es van seleccionar els mutants rugosos i es va analitzar el seu patró de GPL per cromatografia en capa fina (CCF). Els resultats obtinguts van mostrar com l'alteració d'aquest gen en *M. abscessus* donava lloc a un canvi de morfologia colonial, de llisa a rugosa, a més a més d'un descens de la producció de GPL entre els mutants (Medjahed, 2009).

### A.6.3. Genètica en *Mycobacterium vaccae*

*M. vaccae* és un micobacteri ambiental de creixement ràpid, que ha estat aïllat del sòl, de l'aigua estancada, de glàndules mamaries i de lesions de pell de vaques (Wayne i Kubica 1986). *M. vaccae* ha estat molt estudiat pel seu possible ús immunoterapèutic juntament amb la quimioteràpia en el tractament de la tuberculosi. Diferents estudis amb animals demostren que *M. vaccae* inactivat per calor té capacitat d'induir una resposta tipus Th1 mitjançant la producció de INF- $\gamma$ . *M. vaccae* indueix un increment de cèl·lules *natural killer* i activa les cèl·lules presentadores d'antigen (Wang i Rook 1998; Mendes, 2002).

A més a més de presentar aquestes propietats immunoestimuladores, s'ha determinat que *M. vaccae* representaria una alternativa com a vector de clonatge per a l'estudi genètic en micobacteris, encara que fins ara ha estat poc estudiat i són pocs els articles en què es fa servir aquesta espècie per aquesta finalitat.

Inicialment va ser utilitzada la soca de *M. vaccae* NCTC 11659 com a vector de clonatge. Aquesta soca presentava una gran dificultat per transformar, a més d'una baixa eficiència en l'expressió de proteïnes recombinants micobacterianes quan s'utilitzaven vectors amb cassetes de resistència a la kanamicina (Km) (Garbe, 1994). Aquestes deficiències van fer limitar l'ús de *M. vaccae* com a vector de clonatge.

Amb el temps, Medeiros i col·laboradors (2002) van determinar que la soca de *M. vaccae* ATTC 15483<sup>T</sup> era eficient transformant en un gran rang de vectors els quals tenien com a marcadors de selecció la Km. Aquests autors, estudiant l'eficiència de transformació del gen *lacZ*, utilitzant diferents vectors i en diferents micobacteris (*M. bovis* BCG, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 i *M. vaccae* ATTC 15483<sup>T</sup>), van demostrar que *M. vaccae* era una bona alternativa com a vector de clonatge. Els resultats obtinguts van mostrar que amb *M. vaccae* ATTC 15483<sup>T</sup> s'obtenien unes eficiències de transformació i uns nivells d'expressió d'aquest gen molt similars a la de la resta de micobacteris estudiats, en tots els vectors utilitzats (Medeiros, 2002).



## B. OBJECTIUS

En aquesta tesi hem treballat amb *Mycobacterium aurum* NCTC 10437<sup>T</sup>, *Mycobacterium chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup>, *Mycobacterium gilvum* DSM 43547, *Mycobacterium obuense* ATCC 27023<sup>T</sup>, *Mycobacterium parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> i *Mycobacterium vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> amb els objectius següents:

- I. Obtenir i aïllar, a partir de les colònies llises, variants colonials de morfologia rugosa.
- II. Analitzar i comparar el contingut de lípids i glicolípid de la paret cel·lular de les morfologies colonials llises i rugoses mitjançant cromatografia de capa fina.
- III. Analitzar i comparar la capacitat de motilitat, les característiques hidrofòbiques, la capacitat d'adhesió a diferents superfícies i la capacitat de formació de biopel·lícules en la interfase de les morfologies colonials llises i rugoses.
- IV. Determinar la regió del genoma o els gens implicats en la síntesi del nou compost present a la paret cel·lular de les colònies llises de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup>.



## C. MATERIAL I MÈTODES

### C.1. Microorganismes i condicions de cultiu

Per fer aquest estudi van ser seleccionades les soques següents, originàriament de morfologia colonial llisa:

*Mycobacterium aurum* NCTC 10437<sup>T</sup>

*Mycobacterium chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup>

*Mycobacterium gilvum* DSM 43547

*Mycobacterium obuense* ATCC 27023<sup>T</sup>

*Mycobacterium parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup>

*Mycobacterium vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup>

*M. vaccae* va ser cultivat a 30 °C en medi de cultiu sòlid Middlebrook 7H10 agar (Difco Laboratories) suplementat amb àcid oleic–albumina–dextrosa–catalasa (OADC), Sauton i TSA (Tryptone Soy Agar, Scharlau). Aquesta soca es va sembrar a les plaques mitjançant sembra per esgotament. El temps d'incubació de les plaques va ser diferent pels diferents medis: sis setmanes per Sauton i dues setmanes per Middlebrook 7H10 i TSA.

Les altres cinc soques només es van fer créixer en medi TSA, mitjançant sembra per esgotament. Es van deixar créixer durant dues setmanes i es van aïllar les variants morfològiques rugoses que van anar apareixent en les successives ressembres. En tots els casos la temperatura d'incubació va ser de 30 °C.

La composició dels diferents medis esmentats, així com la seva preparació es detalla a continuació:

#### Medi Middlebrook 7H10

Preparació de l'OADC. A 100 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

BSA (albumin fraction V)	5 g
Glucosa	2 g
NaCl	0,85 g
Catalasa	4 mg
Àcid Oleic	0,05 g

Els components es van mesclar fins que es van dissoldre i es van esterilitzar per filtració. Se'n va comprovar la seva esterilitat, no creixement microbiològic, incubant-lo durant 24 h a 37 °C.

Un cop comprovada l'esterilitat de l'OADC, es va preparar el medi Middlebrook 7H10. A 900 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Medi 7H10	19 g
Glicerina	5 ml

Cal mesclar i esterilitzar en l'autoclau a 121 °C durant 10 minuts. Es deixa refredar el medi per sota els 60 °C, s'hi afegeix els 100 ml d'OADC estèril i es dispensa en plaques.

### **Medi Sauton**

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

L-Asparragina	4 g
Àcid cítric	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
Citrat de ferro i amoni	0,05 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,4 mg
Glicerol	38,7 ml

Es mescla fins que els nutrients s'hagin dissolt. S'ajusta el pH a 7,2–7,3 amb una solució NH<sub>4</sub>OH al 25% en H<sub>2</sub>O. Després d'ajustar el pH, s'hi afegeix 20 g d'agar per litre de medi. Es posa a l'autoclau a 121 °C durant 20 minuts. Es dispensa en plaques.

### **Medi TSA**

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Peptona	5 g
NaCl	5 g
Triptona	15 g
Agar	15 g

S'agita fins que els nutrients s'hagin dissolt. S'esterilitza mitjançant autoclau a 121 °C durant 20 minuts. Es dispensa en plaques.



## **C.1.2. Conservació i manteniment de les soques**

### **C.1.2.1. Conservació**

Les sis soques llises seleccionades per a l'estudi i, posteriorment, les sis soques rugoses obtingudes espontàniament van ser conservades a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en vialets que contenien 1 ml del medi de conservació que es descriu a continuació.

#### **Medi de conservació**

A 100 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen 20 g de llet desnatada en pols. S'agita fins que la llet s'hagi dissolt. Es posa a l'autoclau la mescla a  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 15 minuts. Un cop autoclavat, es dispensa 1 ml del medi de conservació en microtubs tipus Eppendorf estèrils. Es deixa refredar el contingut dels tubs i es conserva el medi a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  fins a la seva utilització.

### **C.1.2.2. Manteniment**

Les soques un cop crescudes en el medi sòlid, es mantenen a les plaques de Petri, les quals es segellen mitjançant Parafilm per evitar la dessecació, i es conserven a temperatura ambient durant 15–30 dies. Passat aquest temps es torna a fer una ressebra.

## **C.2. Anàlisi macroscòpica i microscòpica de la morfologia colonial**

### **C.2.1. Lupa estereoscòpica**

Per a l'anàlisi macroscòpica de la morfologia colonial es van cultivar els micobacteris en plaques TSA a  $30^{\circ}\text{C}$  durant 14 dies. Un cop crescudes, les colònies es van observar mitjançant una lupa estereoscòpica Leica MZFLIII amb una càmera digital DC 250 acoblada per a la captació d'imatges.

### **C.2.2. Microscopi electrònic de rastreig**

Per a l'anàlisi de les dues variants morfològiques per microscòpia electrònica de rastreig els materials i el procediment emprats es detallen a continuació.

**MATERIAL****Tampó cacodilat sòdic (0,1 M, pH 7,4)**

Cacodilat de sodi	2,14 g
Aigua milliQ	100 ml

Es mescla i s'ajusta el pH a 7,4 amb una solució de HCl. Es guarda a 4 °C a la foscor fins a la seva utilització.

**Glutaraldehyd en tampó cacodilat sòdic**

Glutaraldehyd al 25 %	10 ml
Tampó cacodilat de sodi	20 ml
Aigua milliQ	70 ml

Es mescla i es guarda a 4 °C en la foscor fins a la seva utilització.

**PROCEDIMENT**

1. Per a l'anàlisi en el microscopi electrònic de rastreig, es van fer créixer les diferents soques a 30 °C en plaques TSA durant 14 dies.
2. Passat aquest temps, es va retallar, mitjançant una fulla de bisturí estèril, una zona d'agar que contenia una colònia ben aïllada.
3. La colònia amb l'agar es va posar en criotubs (Micrewtube<sup>R</sup>, Simport) que contenien 1 ml de glutaraldehyd en tampó cacodilat sòdic.
4. La fixació de les mostres es va fer durant 2 h a 4 °C.
5. Es van fer tres rentats de 5 minuts amb tampó cacodilat sòdic.
6. Un cop rentades, es van deshidratar les mostres mitjançant un gradient de concentracions d'etanol en aigua (30, 50, 70, 80 i 90 % etanol, un cop i 100 % etanol, dues cops) i es va deixar actuar cada solució 10 minuts.
7. Les mostres es van assecar mitjançant punt crític amb CO<sub>2</sub>
  1. Es van posar les mostres dissoltes en metanol dins l'aparell del punt crític Bal–Tec CPD 030.
  2. Es va afegir CO<sub>2</sub> líquid a l'aparell.
  3. L'aparell inicia l'intercanvi d'etanol a CO<sub>2</sub> líquid.
  4. Es va fer el punt crític del CO<sub>2</sub> (31,1 °C i 72 atm.) en l'aparell a 37 °C.
  5. Es van treure les mostres un cop tot el CO<sub>2</sub> líquid va passar a CO<sub>2</sub> gas.

8. Un cop les mostres van estar seques, es va fer el muntatge de les mostres en un suport d'alumini on prèviament se li ha afegit una cinta de carbó la qual manté unida la mostra al suport.

9. Es van cobrir les mostres amb una pel·lícula de 5 nm d'or.

1. Es van posar les mostres a l'aparell de recobriment d'or Emitech K550X.
2. Es va fer el buit amb argó durant 8 min.
3. Es van cobrir les mostres amb or.
4. Posteriorment, es va evaporar l'or durant 4 min a 25 mA.

Les colònies es van observar amb un microscopi electrònic de rastreig Hitachi S-570 (Hitachi LTD) a un voltatge d'acceleració de 15 kV.

### C.3. Anàlisi de la capacitat de motilitat

L'estudi de la capacitat de motilitat de les variants morfològiques llises i rugoses dels diferents micobacteris es va dur a terme mitjançant el creixement dels micobacteris estudiats en diferents medis de motilitat (Martínez, 1999).

Els medis utilitzats van ser: TSA, Sauton modificat (amb baixa concentració de font de carboni), M63 i Middlebrook 7H9 sense complementar. Tots aquests medis es van preparar amb diferents concentracions d'agar i agarosa (0,1; 0,3; 0,6 i 0,8 %).

#### MATERIAL

##### Medi Middlebrook 7H9 + agarosa o agar

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Medi 7H9		19 g
Agarosa o agar	0,1 %	1 g
	0,3 %	3 g
	0,6 %	6 g
	0,8 %	8 g

Es mescla, i s'esterilitza en l'autoclau a 121 °C durant 10 minuts. Es dispensa en plaques.

**Medi M63 + agarosa o agar**

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		13,6 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1,9 g
MgSO <sub>4</sub>		0,12 g
FeSO <sub>4</sub>		0,56 mg
Agarosa o agar	0,1%	1 g
	0,3%	3 g
	0,6%	6 g
	0,8%	8 g

Es mescla fins a la total dissolució i s'esterilitza en l'autoclau a 121 °C durant 15 minuts. Es dispensa en plaques.

**Medi Sauton modificat + agarosa o agar**

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		13,6 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		1,9 g
Citrat de ferro i amoni		0,12 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0,56 mg
Agarosa o agar	0,1 %	1 g
	0,3 %	3 g
	0,6 %	6 g
	0,8 %	8 g

Es mescla fins a la total dissolució i s'esterilitza en l'autoclau a 121 °C durant 15 minuts. Es dispensa en plaques.

**PROCEDIMENT**

1. Un cop es van tenir els medis preparats, es van dispensar els medis de forma estèril en plaques de Petri, es van deixar refredar i assecar les plaques a temperatura ambient tota la nit.
2. Un cop seques les plaques, es va agafar mitjançant una nansa de picadura una petita porció d'una colònia ben aïllada, prèviament crescuda en medi TSA a 30 °C.
3. Es va sembrar per picadura en el centre de la placa d'agar, anant en compte de deixar dipositada la colònia en la superfície del medi.

4. Posteriorment, es van cultivar els diferents micobacteris cap per amunt i a 30 °C durant 14 dies.

### **C.3.1. Tinció Ziehl–Neelsen (ZN)**

Per confirmar la presència de bacils en les prolongacions i en la perifèria de les colònies de morfologia llisa crescudes en els medis de motilitat, es va fer una tinció ZN amb els bacteris crescuts a les plaques 7H9 + 0,3 % d'agarosa incubades durant 14 dies a 30 °C.

1. Es va posar en un portaobjectes una gota d'aigua destil·lada.
2. Es va agafar mostra de les prolongacions, intentant no agafar medi i es va dipositar en el portaobjectes.
3. Es va fixar les mostres sota la flama, evaporant l'aigua i procurant de no cremar la mostra.
4. Un cop fixades, les mostres es van tenyir durant 7 min mitjançant fucsina–fenicada la qual s'havia d'anar escalfant a la flama fins a l'emissió de vapors però evitant que la fucsina bullís.
5. Un cop passats els 7 min, es va eliminar la fucsina abocant-la i es va tornar a afegir nova fucsina per tal de repetir el procés anterior dos cops més.
6. Posteriorment, es va eliminar suaument el colorant de cada portaobjectes mitjançant aigua.
7. Es va cobrir cada portaobjectes amb solució decolorant, etanol:àcid hipoclorídric (97:3, v:v), procurant de recobrir tot el portaobjectes.
8. Es va deixar que actués 1 min i posteriorment, es va eliminar abocant-ho.
9. Tot seguit es va afegir blau de metilè, el qual es va deixar actuar durant 2 min.
10. Es va rentar el portaobjectes amb aigua i es va assecar mitjançant paper de filtre.
11. Els bacils van ser observar mitjançant un microscopi òptic a 100x. Els bacteris àcid–alcohol resistents es veien de color vermell, mentre que els bacteris no àcid-alcohol resistents es tenyien de blau.

## **C.4. Anàlisi dels lípids i glicolípid**

### **C.4.1. Extracció i anàlisi dels lípids, glicolípid i fosfolípids lliures**

#### **C.4.1.1. Obtenció de l'extracte cru (EC) mitjançant extracció amb solvents orgànics**

1. Es van recollir de la superfície de l'agar les cèl·lules micobacterianes crescudes en medi TSA i es van dipositar en erlenmeyers.
2. Es van resuspendre les cèl·lules mitjançant una solució cloroform:metanol (1:2, v:v). Es va mantenir la mescla en agitació constant i a temperatura ambient, 24 hores per facilitar l'extracció dels lípids i glicolípid lliures presents a la paret cel·lular.
3. Posteriorment, el contingut es va filtrar per separar les restes cel·lulars de la solució.
4. Es va evaporar la fase líquida obtinguda mitjançant un rotavapor i es van tornar a resuspendre les restes cel·lulars en una solució cloroform:metanol (2:1, v:v), que es va mantenir en agitació constant durant 24 hores més.
5. Les restes cel·lulars es van tornar a filtrar, la fase líquida obtinguda es va ajuntar amb l'anterior i el contingut va ser evaporat mitjançant rotavapor; d'aquesta manera es va obtenir l'extracte lipídic total.
6. Aquest extracte lipídic va ser sotmès a una partició amb una mescla de cloroform:metanol:aigua (8:4:2, v:v:v). L'aigua contenia un 0,04 % de clorur de calci per minimitzar la formació d'una interfase entre les fases orgànica i l'aquosa.
7. Es va recuperar la fase orgànica i va ser evaporada sota corrent de nitrogen; així es va obtenir l'EC.
8. Aquest EC obtingut es va guardar a 4 °C fins a la seva utilització.

#### **C.4.1.2. Anàlisi per CCF analítica unidimensional**

Els lípids, els glicolípid i els fosfolípids lliures extrets anteriorment i presents en l'EC es van analitzar per CCF unidimensional en plaques de CCF sílica gel 60 (0,25 mm de gruix, 20 cm x 20 cm; Merck).

1. Es va resuspendre l'EC amb 0,5–1 ml de cloroform i es va aplicar 10 µl d'aquest a la superfície de les plaques mitjançant un capil·lar de vidre calibrat.
2. Un cop seques les mostres aplicades a la placa, es va posar la placa dins la cubeta saturada amb els solvents i es va deixar que l'eluent pugés per la placa.

3. Per a l'anàlisi dels lípids i els glicolípidis les plaques es van eluir amb cloroform:metanol (10:90 i 85:15, v:v) i cloroform:metanol:aigua (90:10:1, 30:8:1 i 60:35:8, v:v:v).

4. Es van revelar les plaques eluïdes i seques mitjançant la polvorització amb el revelador corresponent. Pels glicolípidis, antrona (Sigma) a l'1% (p:v) en àcid sulfúric i escalfament a 120 °C durant uns minuts mitjançant una placa calefactora. Per visualitzar els fosfolípids, les plaques es van ruixar amb Dittmer (Molybdenum blue spray reagent, Sigma) i es van deixar a temperatura ambient durant uns quants minuts a fi de que apareguessin les taques corresponents als fosfolípids.

Els lípids, glicolípidis i fosfolípids es van identificar comparant el seu recorregut cromatogràfic amb compostos coneguts i purificats prèviament a partir de *M. tuberculosis*.

## **C.4.2. Extracció i anàlisi de MK i DIM**

### **C.4.2.1. Extracció amb solvents orgànics**

1. Es van posar en tubs de vidre, amb taps amb recobriment intern de tefló, 2 ml d'una solució de metanol:clorur de sodi 0,3% (p:v) en aigua (100:10, v:v) i 1 ml d'hexà i es va afegir uns 50 mg (pes humit) de material cel·lular.
2. Es va mantenir 15 min en agitació per aconseguir que tot el material entrés en contacte amb la solució.
3. La mescla es va deixar reposar per què es formessin dues fases diferenciades i així recuperar la fase superior, corresponent a l'hexà.
4. Es va tornar a afegir 1 ml d'hexà a la fase inferior i es va repetir el procediment.
5. Les dues fases d'hexà recuperades en un tub es van unir i van ser evaporades sota corrent de nitrogen a 35 °C.

### **C.4.2.2. Anàlisi per CCF analítica bidimensional**

L'extracte obtingut es va analitzar mitjançant CCF analítica bidimensional en plaques CCF Sílica gel 60 (0,25 mm gruix, 20 cm x 20 cm, Merck).

1. Es va tallar una placa de CCF en quatre trossos iguals.
2. Els lípids van ser resuspesos en 0,5–1 ml de cloroform i es va aplicar 10 µl a la superfície d'un quart de placa mitjançant un capil·lar de vidre calibrat.

3. Es va fer l'elució en dues direccions. En la primera direcció, es va eluir la mateixa placa tres cops amb hexà:acetat d'etil (98:2, v:v); i en la segona direcció, es va eluir la placa una vegada amb hexà:acetona (98:2, v:v).
4. Un cop les plaques van estar eluïdes i seques, es van revelar ruixant-les amb àcid fosfomolibdic al 10 % (p:v) en etanol absolut. Posteriorment van ser escalfades a 120 °C mitjançant una placa calefactora durant uns quants minuts.

### **C.4.3. Extracció i anàlisi dels àcids micòlics**

#### **C.4.3.1. Metanòlisi àcida**

1. Es va posar en tubs de vidre, amb taps amb recobriment intern de tefló, 2 ml d'una solució de metanol:toluè:àcid sulfúric (30:15:1, v:v:v) i es va afegir uns 50 mg (pes humit) de material cel·lular.
2. Es va mesclar en un agitador per aconseguir que tot el material entrés en contacte amb la solució.
3. Aquesta mescla va ser introduïda en un bany sec a 80 °C durant 16 h.
4. Posteriorment es van treure els tubs del bany i es van deixar refredar.
5. Es van afegir 2 ml d'hexà, es va mesclar utilitzant el vòrtex, es va deixar que es formessin dues fases i es va recuperar la fase superior corresponent a l'hexà.
6. Per tenir un millor rendiment del procés es va tornar a afegir hexà i es va tornar a recuperar de la mateixa manera i en el mateix tub la fase corresponent a l'hexà.
7. El contingut dels tubs va ser evaporat sota corrent de nitrogen a 35 °C.

#### **C.4.3.2. Anàlisi dels àcids micòlics per CCF analítica unidimensional**

El patró d'èsters metílics dels àcids micòlics es va analitzar mitjançant CCF analítica unidimensional en plaques CCF Silica gel 60 (0,25 mm gruix, 20 cm x 20 cm, Merck).

1. Es van resuspendre els esters metílics obtinguts de la metanòlisi àcida en 0,5 ml d'hexà.
2. Van ser aplicats 10 µl a la superfície de les plaques mitjançant un capil·lar de vidre calibrat.
3. Les plaques es van eluir tres cops amb una mescla d'hexà:èter etílic (85:15, v:v).



4. Es van revelar els àcids micòlics separats per CCF, ruixant les plaques amb àcid fosfomolíbdic al 10 % (p:v) en etanol absolut. Posteriorment, les plaques van ser escalfades a 120°C durant uns quants minuts mitjançant una placa calefactora.

## **C.5. Estudi de la TV**

### **C.5.1. Detecció de l'1-tetradecanol mitjançant CG-EM**

Mitjançant CG-EM es va dur a terme l'estudi de la presència del compost 1-tetradecanol en les variants llises i rugoses. Part dels EC obtinguts anteriorment van ser saponificats per a aquest estudi. El protocol de saponificació d'aquests EC es detalla a continuació.

1. Es va evaporar el contingut de solvent dels extractes i es va afegir als tubs 2 ml d'una solució de KOH al 10 % (p:v) en metanol.
2. Es va agitar bé el contingut de cada tub per tal que els extractes entressin en contacte amb el reactiu.
3. Els tubs es van deixar a temperatura ambient tota la nit.
4. Posteriorment, es va afegir a cada tub 1 ml d'aigua i 2 ml d'hexà es va mesclar bé, es va deixar reposar uns 5 min perquè es formessin dues fases i es va recuperar la fase superior corresponen a l'hexà.
5. Es va evaporar completament el contingut d'hexà dels tubs sota corrent de nitrogen i en el bany sec a 35 °C.

Els extractes saponificats van ser analitzats mitjançant un cromatògraf de gasos Agilent 6890 II acoblat a un espectròmetre de masses 5973 (Agilent, California).

La columna utilitzada va ser una "cross-linked methyl silicone" (HP-1, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm gruix). La columna va ser programada per anar de 60 a 300 °C amb una velocitat de 15 °C/min. La temperatura de l'injector va ser 250 °C.

La identificació de l'1-tetradecanol es va fer comparant el temps de retenció i l'espectre de massa del pic obtingut amb el compost comercial 1-tetradecanol (Merck).

### **C.5.2. Extracció i anàlisi estructural de la TV**

#### **C.5.2.1. Extracció de la TV mitjançant diferents solvents**

Es va procedir a determinar la millor solució per a l'extracció de la TV de la paret cel·lular micobacteriana. El protocol usat va ser el següent:

1. Es van recollir les cèl·lules micobacterianes crescudes en medi sòlid TSA i es van posar en erlenmeyers.
2. Les cèl·lules van ser resuspeses en diferents solucions: cloroform:metanol (2:1), cloroform:metanol:aigua (8:4:2), 1-butanol i Triton-X114 al 4% en solució aquosa (v:v).
3. Es van deixar aquestes mescles en agitació constant i a temperatura ambient durant 2–3 dies.
4. Posteriorment, es va filtrar el contingut i van ser recuperades les diferents fases líquides.
5. Es van concentrar aquestes fases líquides per assecament a 40 °C i sota corrent de nitrogen.
6. El contingut lipídic va ser analitzat mitjançant CCF amb el sistema d'elució metanol:cloroform (90:10, v:v). Es van revelar les plaques, un cop seques, amb antrona (Sigma) a l'1% (p:v) en àcid sulfúric.

#### **C.5.2.2. Purificació de la TV per HPLC**

1. Per a la purificació de la TV, les cèl·lules es van disposar en erlenmeyers i van ser resuspeses en 1-butanol.
2. Es va mantenir aquest mescla en agitació constant 24 h a temperatura ambient.
3. Posteriorment es va filtrar la fase líquida obtinguda i va ser evaporada mitjançant un rotavapor.
4. Aquest extracte es va sotmetre a una partició amb una mescla de cloroform:metanol:aigua (8:4:2, v:v:v). L'aigua contenia un 0,04 % de clorur de calci per minimitzar la formació d'una interfase entre la fase orgànica i l'aquosa.
5. Es va recuperar la fase orgànica, es va evaporar sota corrent de nitrogen i es va resuspendre en 3–5 ml de 2-propanol.
6. Per a la purificació de la TV es van injectar fraccions de 200 µl d'aquest extracte en un HPLC equipat amb una columna hidrofòbica semipreparativa d'HPLC (TR-HPLC; Tracer extrasil NH<sub>2</sub> 5 mm 25 x 2,1; TeKmokroma). Aquest HPLC també tenia acoblat un detector d'absorbàncies Waters 486 (Millipore). La fase mòbil utilitzada va ser 100 % 2-propanol i la velocitat del flux de 2 ml/min.
7. Es van recollir les diferents fraccions eluïdes en volums de 2 ml.

8. Es van evaporar aquestes fraccions recollides sota corrent de nitrogen i es va determinar la presència de la TV mitjançant CCF. Va ser utilitzar com a sistema d'elució metanol:cloroform (90:10, v:v) i les plaques van ser revelades amb antrona (Sigma) a l'1 % (p:v) en àcid sulfúric.

### **C.5.2.3. Anàlisi estructural de la TV**

#### **C.5.2.3.1. Espectroscòpia d'infraroig (IR)**

L'IR de la TV es va dur a terme en un disc de KBr utilitzant un espectrofotòmetre Bomem MB-120 i a un rang de longitud d'ona de 750–4.000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **C.5.2.3.2. CG-EM**

1. Es va afegir aproximadament 0,5 mg de TV purificada en tubs de vidre amb taps amb recobriment intern de tefló.
2. Es va procedir a saponificar la mostra afegint 2 ml d'una solució de metanol al 10 % (w:v) de KOH a temperatura ambient durant una nit.
3. Passat aquest temps es va afegir als tubs 1 ml d'aigua i 2 ml d'n-hexà.
4. Seguidament els tubs es van mesclar mitjançant un vòrtex i es van deixar reposar durant 5 min perquè es formessin dues fases.
5. La fase superior corresponent al n-hexà es va recuperar, i es va posar en un nou tub de vidre amb tap intern de tefló; així es va obtenint la fracció neutral (els alcohols).
6. El n-hexà del tub va ser evaporat mitjançant flux de nitrogen
7. Posteriorment es va sililar el contingut del tub mitjançant l'agent sililant N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (Fluka) seguint el mètode descrit per Chambaz i Horning (1969).
8. Es va injectar 1 ml d'aquesta fracció neutral sililada en el CG-EM.
9. D'altra banda, es va acidificar la fase inferior del tub corresponent a la fracció bàsica, metanol-aigua, mitjançant 1M HCl fins a pH 2.
10. Es va afegir 2 ml d'n-hexà i, a continuació, van ser mesclats els tubs mitjançant vòrtex i es van deixar reposar 5 min perquè es formessin dues fases.
11. Va ser recuperada la fase superior corresponent a l'n-hexà, i es va posar en un nou tub de vidre amb tap intern de tefló; així es va obtenir la fracció acídica (els àcids grassos).

12. Es va evaporar l'n-hexà del tub mitjançant flux de nitrogen.
13. El contingut del tub va ser metilat mitjançant una solució de metanol al 10 % de trifluorur de bor (Rotzsche, 1991).
14. Es va afegir 1 ml d'aigua per eliminar l'excés de trifluorur de bor.
15. Després, es va afegir 2 ml d'n-hexà i el contingut va ser mesclat mitjançant vòrtex.
16. Es va deixar que es formessin dues fases i va ser recuperada la fase superior corresponent a l'hexà.
17. Es va injectar 1 ml d'aquesta solució d'hexà en el CG-EM.

L'anàlisi de les dues fraccions obtingudes mitjançant saponificació i derivatització es va dur a terme mitjançant un cromatògraf de gasos GC8000 acoblat a un espectròmetre de masses MD800 (Thermo Finnigan). La columna utilitzada va ser una *cross-linked methyl silicone* (HP-5, 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 mm gruix). La columna va ser programada per anar de 60 a 300 °C amb una velocitat de 15 °C/min. La temperatura de l'injector va ser 280 °C.

La identificació de l'espectre es va fer mitjançant les llibreries NIST, NBS i WILEY.

### C.5.2.3.3. RMN

L'anàlisi per RMN de la TV es va fer en un espectròmetre Bruker, model AVANCE-500 que treballa a una freqüència de 500,13 MHz per  $^1\text{H}$ . L'aparell estava equipat amb una sonda inversa TXI de 5 mm i gradients en la direcció z.

La mostra analitzada es va preparar dissolent 3 mg de TV purificada en 0,6 ml de  $\text{CDCl}_3$ . Tots els espectres de RMN es van fer a 300 K.

Els experiments 2D es van fer en les condicions estàndards: 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY en mode magnitud, 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY sensible a la fase, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC sensible a la fase i 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC en mode magnitud.

La mesura del coeficient de difusió es va fer mitjançant tècniques de gradient de camp polsant (PFGSE) i utilitzant l'experiment LED amb gradients bipolars (LEDBP). El temps de difusió i el filtre-z es van fixar a 150 i 5 ms, respectivament, i la durada del gradient va ser de 2 ms. Els gradients utilitzats tenien forma sinoïdal i es van fer setze espectres on la intensitat del gradient es va variar linealment del 2 al 95 % del seu valor màxim. Tant per a l'adquisició com per al processament de les dades es va utilitzar el paquet DUESY inclòs en la versió v.1,3 del programari TOPSPIN.

Totes les anàlisis de la TV per RMN es van fer al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de l'Universitat Autònoma de Barcelona pel Dr. Teodor Parella, director del servei de RNM d'aquesta Universitat.

## C.6. Estudi de la hidrofobicitat

### C.6.1. Anàlisi mitjançant hexadecà

Per a l'estudi de la hidrofobicitat de superfície de les diferents morfologies colonials es va utilitzar la tècnica d'adhesió microbiana a hidrocarburs (MATH), descrita prèviament per Reid i col·laboradors (1992) i proposada originàriament per Rosenberg i col·laboradors (1981).

Per a aquest estudi es va mesurar la propensió dels bacils a associar-se a una fase orgànica, hidrofòbica, o a una fase aquosa, hidrofílica, després d'agitar vigorosament la suspensió micobacteriana en una mescla de tampó fosfat i hexadecà.

Per a aquest estudi es van utilitzar soques d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Sacharomyces cerevisiae* com a soques control.

El protocol utilitzat es detalla a continuació i a la figura següent (fig. 12):

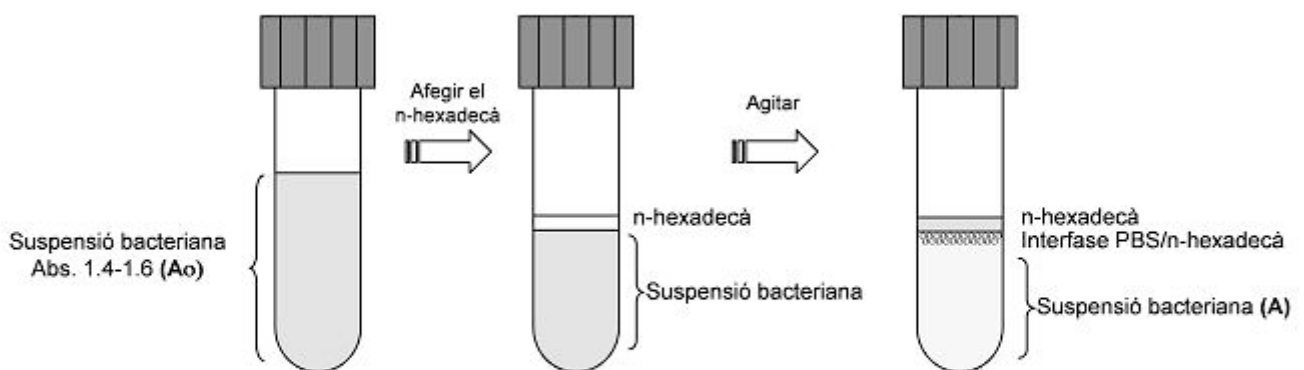
1. Es van fer créixer les dues variants morfològiques de *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae* en medi TSA a 30 °C durant dues setmanes. Les soques d'*E. coli*, *S. aureus* i *S. cerevisiae* es van fer créixer en TSA però durant 1–2 dies *E. coli* i *S. aureus*, i 3–4 dies *S. cerevisiae*.
2. Passat aquest temps, es van recollir les cèl·lules en tubs de vidre amb tap amb recobriments intern de tefló i es van resuspendre en PBS fins a aconseguir una absorbància a 400 nm de 1,4–1,6 ( $A_0$ ).
3. Posteriorment, es va afegir 200  $\mu$ l de n-hexadecà a 1,2 ml de la suspensió bacteriana i es van agitar els tubs 2 min mitjançant un vòrtex.
4. Es van deixar que es separessin les dues fases 10 min a temperatura ambient i es va tornar a mesurar l'absorbància de la fase aquosa a 400 nm mitjançant un espectrofotòmetre (A).
5. Els valors van ser expressats com a percentatge d'hidrofobicitat, percentatge de cèl·lules en la fracció d'hexadecà, i es van calcular d'acord amb la fórmula següent de Fedtke i col·laboradors (2007):

$$\% \text{ hidrofobicitat} = [1 - (A/A_0)] \times 100$$

On A és l'absorbància de la fase aquosa després d'afegir l'hexadecà i agitar; A<sub>0</sub> és l'absorbància de la suspensió bacteriana abans d'afegir l'hexadecà.

L'estudi de cada mostra es va fer per triplicat i els resultats expressats són la mitjana dels tres valors obtinguts.

**Figura 12.** Protocol d'estudi de la hidrofobicitat mitjançant n-hexadecà proposat per Rosenberg i col·laboradors en els anys 80 (Rosenberg, 1981).



### C.6.2. Observació microscòpica de la interfase PBS/n-hexadecà

Per a l'estudi de l'afinitat d'unió dels micobacteris estudiats cap a l'hexadecà es va procedir a l'observació dels dobles formats per l'hidrocarbur i les cèl·lules micobacterianes adherides a aquest.

Es va analitzar la interfase PBS/n-hexadecà de l'apartat anterior, corresponent a l'anàlisi d'hidrofobicitat mitjançant l'hexadecà (Rosenberg, 1991), seguint el procediment següent:

1. Van ser dipositats 20  $\mu$ l d'aquestes interfases PBS/n-hexadecà en un portaobjectes.
2. Es va cobrir la mostra amb un cobreobjectes.
3. Es van visualitzar les interfases mitjançant un microscopi òptic Leica DMRB (Leica). Les imatges es van obtenir mitjançant una càmera digital Leica DC 250 (Leica) acoblada al microscopi òptic.

## **C.7. Anàlisi de la capacitat de formació de biopel·lícules en la interfase i adhesió cel·lular**

### **C.7.1. Anàlisi de la formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid–aire**

Es va estudiar la capacitat de formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid–aire de les colònies de morfologia llisa i les de morfologia rugosa dels diferents micobacteris (Hunter, 2006; Ojha, 2008).

Aquest estudi es va fer simultàniament en tubs de vidre i pouets de plaques de cultiu.

1. Es va afegir als tubs de vidre i als pouets de plaques de cultiu 15 ml i 2 ml de medi TSB, respectivament.
2. Van ser inoculats els tubs i els pouets dispensant en la interfase líquid–aire una colònia ben aïllada, de cada micobacteri, crescuda en placa TSA a 30 °C.
3. Es van cultivar els cultius a 30 °C durant tres setmanes sense agitació.

#### **Medi TSB (Tryptone Soy Broth)**

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Peptona	5 g
NaCl	5 g
Triptona	15 g

Cal agitar fins que els nutrients s'hagin dissolt. S'ha d'esterilitzar mitjançant autoclau a 121 °C durant 20 minuts.

### **C.7.2. Anàlisi de l'adhesió a vidre i poliestirè (PS)**

Per dur a terme aquest estudi, les diferents soques van ser cultivades en plaques TSA 14 dies a 30°C. Posteriorment es va preparar una suspensió en PBS per a cada micobacteri estudiat, ajustant l'inòcul a 0,5 de l'escala de McFarland.

La suspensió bacteriana a 0,5 de l'escala McFarland (densitat òptica de 0,08–0,10 a 625 nm, equivalent a  $1\text{--}2 \times 10^8$  CFU/ml per a la majoria dels microorganismes) s'obté de la comparació d'absorbància de la nostra suspensió amb un patró.

**PROCEDIMENT**

1. Preparar el patró (suspensió McFarland):

**SOLUCIÓ A.**

0,048 M de $\text{Cl}_2\text{Ba}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,12 g
$\text{H}_2\text{O}$	10 ml

**SOLUCIÓ B.**

0,18 M $\text{H}_2\text{SO}_4$	1 ml
$\text{H}_2\text{O}$	99 ml

Per a un McFarland de 0,5 afegim:

Solució A	0,5 ml
Solució B	99,5 ml

2. Es va corroborar que l'absorbància del patró a 625 nm es trobés entre 0,08 i 0,10.

3. El patró es va distribuir en alíquotes de 4 a 6 ml en tubs de rosca i amb tap intern de tefló i van ser guardats a la foscor a temperatura ambient.

Un cop les suspensions bacterianes van estar preparades es va procedir amb l'estudi de l'anàlisi de l'adhesió en els diferents materials.

4. Es van inocular tubs estèrils de vidre i de PS que contenien 6 ml de TSB amb 15  $\mu\text{l}$  d'aquestes suspensions micobacterianes a 0,5 de l'escala McFarland.

5. Aquests tubs es van deixar incubar en agitació constant a 30 °C durant 1, 2, 3, 4 i 7 dies. En aquests temps es va mesurar l'adhesió cel·lular. Van ser utilitzats com a controls negatius tubs de vidre i PS amb TSB però sense micobacteris.

Aquest estudi es va fer per triplicat per a cada un dels micobacteris estudiats i els resultats s'expressen com la mitjana de les dades obtingudes en aquests tres experiments.

**C.7.2.1. Quantificació de l'adhesió a vidre i PS**

Per quantificar la capacitat d'adhesió al vidre i al PS, als dies escollits, es va procedir a fer el següent protocol:

1. Es van descartar els sobrenedants dels tubs de vidre i de plàstic mitjançant decantació.



2. Els tubs van ser rentats tres vegades amb 6 ml de PBS estèril per eliminar els bacteris no adherits.

### **PBS (phosphate buffer saline)**

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

NaCl	5 g
KCl	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g

Cal agitar fins que els nutrients s'hagin dissolt. S'ajusta el pH a 7,4 amb una solució NH<sub>4</sub>OH al 25 % en H<sub>2</sub>O. S'esterilitza mitjançant autoclau a 121 °C durant 15 minuts.

3. Un cop rentats es va afegir a cada tub 5 boletes de vidre estèrils i 4 ml de PBS estèril.

4. Es van agitar els tubs uns quants segons en el vòrtex.

5. Després, van ser sonicats mitjançant ultrasons per desenganxar els bacils adherits a les parets dels tubs. El protocol de sonicació es va fer tenint en compte la baixa viabilitat que presenten els micobacteris quan són sonicats (Stokes, 2004). D'aquesta manera es va determinar el protocol de sonicació pels diferents micobacteris, tal com es detalla a continuació:

Per a les variants llises:

sonicació	1 min
repòs	1 min
sonicació	1 min

Per a les variants rugoses:

sonicació	2 min
repòs	1 min
sonicació	1 min
repòs	1 min
sonicació	15 seg

6. A partir del sonicat es van fer dilucions seriades i van ser sembrats 100 µl de les dilucions en plaques de TSA.
7. Les plaques van ser incubades 14 dies a 30 °C i posteriorment es va fer el recompte de les colònies crescudes.

La determinació de la capacitat d'adhesió cel·lular de les dues variants morfològiques dels diferents micobacteris estudiats es va dur a terme per triplicat mitjançant recompte en placa. Els resultats obtinguts van ser expressats en cfu/cm<sup>2</sup>.

## C.8. Estudis genètics en *M. vaccae*

### C.8.1. Soques bacterianes i vectors utilitzats

Les diferents soques de *Mycobacterium* i *E. coli* utilitzades en aquest treball es mostren a la taula 6.

**Taula 6.** Soques bacterianes utilitzades.

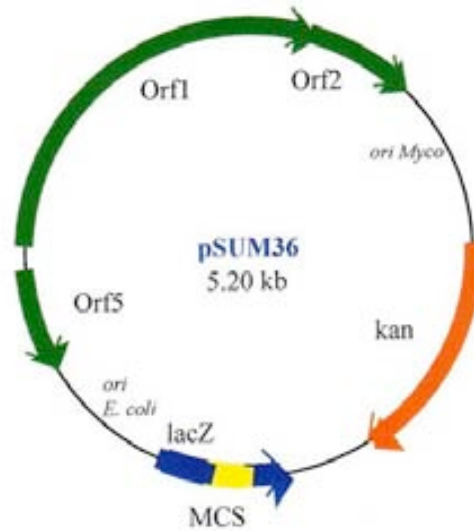
Soca	Procedència
<i>M. vaccae</i> ATCC 15483 <sup>T</sup>	(American Type Culture Collection)
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	(Snapper, 1990)
<i>E. coli</i> XL1–Blue MRF	(Stratagene)

Els vectors utilitzats en aquest treball van ser pEZ123, plasmidi utilitzat per a la transformació en *M. vaccae* llis, i pSUM36 (Aínsa, 1996), plasmidi utilitzat en la construcció d'una llibreria genòmica en *M. vaccae* rugós (figura 13).

El pEZ123 es un plasmidi termosensible, és portador del gen *sacB* i és un plasmidi del grup ts/sac (Pelicic, 1997). Presenta un gen de resistència a gentamicina (Gm) funcional tant en *E. coli* com en micobacteris. A més pEZ123, inclou un transposó Tngfp, construït a partir de la seqüència d'inserció IS1096, seqüència provinent de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, i que inclou el gen *gfp* sense la regió promotora i un gen de resistència a Km funcional tant en *E. coli* com en micobacteris (Cirillo, 1991).

El plasmidi pSUM36 és un plasmidi replicatiu de micobacteris derivat del plasmidi pAL5000 (Ranes, 1990) i amb el gen de resistència a la Km (figura 13).

**Figura 13.** Plasmidi pSUM36 (modificada d'Aínsa, 1996).



### C.8.1. Estudis previs en *M. vaccae*

#### C.8.1.1. Estudi de la corba de creixement de *M. vaccae* llis i *M. vaccae* rugós en medi líquid TSB

Es va mesurar la densitat òptica ( $D.O_{600}$ ) d'un cultiu de *M. vaccae* llis i *M. vaccae* rugós en medi líquid TSB a diferents temps. Aquest estudi es va fer per duplicat.

El protocol utilitzat per aquest estudi va ser:

1. Es va inocular una colònia de *M. vaccae*, crescuda prèviament en medi TSA a 30 °C durant 7 dies, en un erlenmeyer que contenia 10 boletes de vidre i es va agitar per tal de disgregar completament la colònia que s'havia afegit.
2. Un cop disgregada la colònia, van ser afegits 3 ml de medi TSB i es va deixar incubant el cultiu a 30 °C en agitació constant, durant 2–3 dies.
3. Passats els 2–3 dies, 2 ml es van reinocular en 100 ml de medi TSB fresc, i es va mesurar la  $D.O.$  inicial a 600 nm del cultiu en un espectrofotòmetre.
4. Es va deixar incubant el cultiu a 30 °C, en agitació constant.
5. Va ser mesurada la  $D.O_{600}$  cada 2 hores, fins que el cultiu va arribar a la fase estacionària.

### C.8.1.2. Determinació de la CMI de *M. vaccae* llis i *M. vaccae* rugós en diferents antibiòtics

Es va determinar la CMI de *M. vaccae* llis i rugós en diferents antibiòtics, Gm (Gentamicina), Km, Sm (Estreptomicina) i Hyg (Higromicina).

Les concentracions d'antibiòtics provades en cultius de *M. vaccae* llis i rugós es detallen a continuació:

Antibiòtic	Concentració (µg/ml)
Gm	200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125
Km	40; 20; 15; 10; 7,5; 5; 2,5; 1,25
Sm	60; 40; 20; 15; 7,5; 5; 2,5
Hyg	200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125

Aquest estudi es va fer mitjançant dos mètodes diferents: mitjançant recompte en placa de TSA (cfu/ml) amb l'antibiòtic corresponent i mitjançant l'indicador resazurina. La resazurina actua com un indicador de l'oxidoreducció, quan disminueix la concentració d'oxigen en la mostra, la resazurina es redueix passant del color blau original a tonalitats vermell-rosa. En aquest cas es detecta el creixement i la inhibició del creixement en cultiu líquid mitjançant un viratge de color. Com a control de l'estudi es va estudiar la CMI de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Aquests estudis es van fer per triplicat.

#### C.8.1.2.1. Recompte en placa

1. Van ser preparades plaques de TSA per a cada concentració d'antibiòtic.
2. A partir d'un cultiu ben crescut ( $D.O_{600} = 1,5$ ) de *M. vaccae* llis, *M. vaccae* rugós i *M. smegmatis*, es va inocular 100 µl en cada placa.
3. Com a control positiu, es van inocular plaques de TSA sense antibiòtic amb 100 µl dels diferents cultius.
4. Les plaques es van incubar a 30 °C durant 14 dies.

#### C.8.1.2.2. Estudi CMI mitjançant la resazurina

1. Es va obtenir un cultiu de *M. vaccae* llis, *M. vaccae* rugós i *M. smegmatis*, a una D.O. a 600 nm entre 0,2–0,6.
2. Es van dipositar a cada pouet d'una placa de cultiu cel·lular de 96 pouets:

Antibiòtic diluït en TSB	100 µl
Cultiu de micobacteris	100 µl

3. Es va deixar incubant la placa a 30 °C durant 6 dies.
4. Posteriorment es va afegir a cada pouet 20 µl de resazurina.
5. Es va seguir incubant la placa a 30 °C, 24 h més.
6. Finalment, es va determinar el viratge de la resazurina (de color blau a vermell–rosa) visualment o mitjançant la quantificació del viratge de forma precisa mitjançant un fluorímetre.

#### **C.8.1.2.2.1. Preparació de la resazurina**

1. A 100 ml d'aigua destil·lada es va afegir 0,01 g de resazurina (Sigma).
2. Es va homogeneïtzar bé la mescla i aquesta va ser filtrada, de forma estèril, mitjançant una xeringa i un filtre de 0,22 µm.
3. Es va repartir el volum filtrat en 2 tubs Falcon de 50 ml estèrils.
4. Es va guardar la resazurina a 4 °C i resguardada de la llum, fins a la seva utilització.

#### **C.8.1.3. Estudi del tant per cent de reversió de llis a rugós de les colònies de *M. vaccae* llis i del tant per cent de reversió de rugós a llis de les colònies de *M. vaccae* rugós**

1. Es va inocular 100 µl d'un cultiu ben crescut de *M. vaccae* llis i *M. vaccae* rugós en 100 ml de medi TSB.
2. El cultiu es va deixar en agitació constant i durant 2–3 dies a 30 °C, fins a obtenir una D.O. del cultiu, a 600 nm, aproximada de 1,5.
3. Un cop crescut el cultiu, es van fer dilucions seriades.
4. Van ser sembrats 100 µl de les dilucions 10<sup>-5</sup> i 10<sup>-6</sup> en plaques TSA.
5. Es van deixar incubar les plaques TSA a 30 °C durant 4–5 dies.
6. Posteriorment es va fer el recompte del nombre de colònies llises que havien revertit a rugoses i del nombre de rugoses que havien revertit a llises.

## C.8.2. Estudi de l'eficiència de transformació de *M. vaccae* lliis en pEZ123 i pSUM36

### C.8.2.1. Microdialització plasmídica

Els diferents plasmidis es van sotmetre a la microdialització abans de l'electroporació per netejar d'electròlits el tampó.

1. Es va afegir 20 ml d'aigua destil·lada estèril en una placa de Petri.
2. Sobre la superfície de l'aigua es va deixar una membrana Millipore de 0,05 µm de porus i 1,5 cm de diàmetre.
3. Posteriorment, va ser col·locat l'ADN plasmídic sobre la superfície de la membrana i es va deixar 20 min.
4. Es va recuperar l'ADN plasmídic mitjançant una micropipeta.
5. Es va calcular la concentració del ADN plasmídic de la mostra mitjançant un espectrofotòmetre Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).
6. Finalment, es va guardar la mostra a -20 °C fins a la seva utilització.

### C.8.2.2. Preparació de cèl·lules electrocompetents, transformació i electroporació

Per a la transformació d'*E. coli*, *M. vaccae* i *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 amb els diferents plasmidis es va utilitzar la tècnica d'electroporació.

#### C.8.2.2.1. Obtenció de cèl·lules electrocompetents d'*E. coli*

1. Es va inocular 50 µl d'un cultiu *overnight* d'*E. coli* en 250 ml de medi LB.

#### Medi LB (Luria–Bertoni)

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Extracte de llevat	5 g
NaCl	10 g
Triptona	10 g

Cal mesclar fins que els nutrients s'hagin dissolt. S'ha d'ajustar el pH a 7,5 amb NaOH. Després d'ajustar el pH, cal afegir 20 g d'agar per litre de medi, si volem el medi sòlid. Autoclavar a 121°C durant 20 minuts.

2. Es va deixar incubar el cultiu una nit a 37 °C i en agitació constant.
3. Es va llegir la D.O.<sub>600</sub> del cultiu i es va deixar d'incubar el cultiu quan aquest es trobava a una D.O.<sub>600</sub> entre 0,4 i 0,5.
4. Un cop el cultiu arribà a la D. O. desitjada, es va refredar, mantenint-lo un mínim de 30 min a 4 °C.
5. Un cop fred, va ser dispensat en tubs Falcon de 50 ml.
6. Es van centrifugar els tubs durant 10 min a 5000 r.p.m. a 4 °C.
7. Es va procedir a retirar acuradament el sobrenedant, decantant-lo, i el precipitat va ser resuspès en 50 ml d'aigua destil·lada estèril freda.
8. Els passos 6 i 7 es van repetir dos cops més.
9. El precipitat obtingut es va resuspendre en 1 ml d'una solució de glicerol al 10 % en aigua.
10. Va ser repartit el sobrenedant final en alíquotes de 40 µl .
11. Les alíquotes es van guardar a –80 °C fins a la seva utilització.

#### **C.8.2.2.2. Obtenció de cèl·lules electrocompetents de *M. vaccae* i *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155**

1. Es va inocular 50 µl d'un cultiu de *M. vaccae* llis, *M. vaccae* rugós i *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 en 250 ml de medi fresc TSB.
2. Es van deixar incubar els cultius 3–4 dies a 30 °C i en agitació constant.
3. La D.O.<sub>600</sub> del cultiu va ser llegida per comprovar que estigués entre 0,5 i 1.
4. Es va refredar el cultiu, mantenint-lo un mínim de 30 min. a 4 °C.
5. Un cop fred, va ser dispensat el cultiu en tubs Falcon de 50 ml.
6. Els tubs es van centrifugar durant 15 min a 3500 r.p.m. a 4 °C.
7. Va ser retirat amb cura el sobrenedant, es va decantar i es va resuspendre el precipitat amb 25 ml d'una solució freda d'aigua destil·lada estèril la qual contenia 0,05 % Tween (v:v).
8. Es va centrifugar 15 min a 3500 r.p.m. a 4 °C.
9. Els passos 7 i 8 es van repetir dos cops més.
10. Posteriorment, va ser resuspès el precipitat obtingut, en 25 ml de glicerol al 10 % en aigua + 0,05 % Tween (v:v).

**Glicerol al 10 % en aigua + 0,05 % Tween**

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Glicerol	100	ml
Tween	0,5	ml

11. Es va centrifugar 15 min a 3500 r.p.m. a 4 °C
12. Es va retirar el sobrenedant, decantant-lo i es va resuspendre el precipitat en 2 ml de glicerol al 10 % en aigua + 0,05 % Tween (v:v).
13. El sobrenedant final va ser repartit en alíquotes de 400 µl .
14. Es van guardar les alíquotes a –80 °C fins a la seva utilització.

**C.8.2.2.3. Electroporació de *M. vaccae* i *E. coli***

1. Es va descongelar en gel una alíquota de 400 µl de cèl·lules electrocompetents de *M. vaccae* i una alíquota amb 40 µl, en el cas de *E. coli*.
2. Es va afegir 500–1.000 ng d'ADN plasmídic a cada alíquota descongelada. En el cas d'*E. coli*, es va afegir també 40 µl d'aigua desionitzada freda.
3. La mescla de cèl·lules i ADN plasmídic es va passar a una cubeta d'electroporació de 2 mm (BioRad), evitant la formació de bombolles.
4. Es va sotmetre la cubeta a un equip de "GenPulser™" (BioRad), a una descàrrega de 2500 volts i sota condicions de 25 µF de capacitància i 1000 □ de resistència en *M. vaccae*, i 200 □ en *E. coli*.
5. Va ser afegit, tot seguit, a la cubeta 1 ml de TSB fresc i es va passar ràpidament tot el volum de la cubeta a un tub de vidre estèril.
6. El tub es va deixar incubant a 30 °C, en agitació constant, durant 1 h en el cas d'*E. coli* i 4 h en el cas de *M. vaccae*.
7. Passat aquest temps es van sembrar les cèl·lules electroporades en medi TSA amb el corresponent antibiòtic.

		<i>M. vaccae</i>	<i>E. coli</i>
pEZ123	Km	(5 µg/ml)	(20 µg/ml)
	Gm	(20 µg/ml)	(5 µg/ml)
pSUM36	Km	(5 µg/ml)	(20 µg/ml)



8. Es van deixar incubant les plaques a 30 °C durant 48 h per a *E. coli* i 12–14 dies per a *M. vaccae*.

Com a control de l'electroporació es van electroporar cèl·lules electrocompetents de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 per a cada plasmidi, seguint el mètode d'electroporació utilitzat per a *M. vaccae* i sembrant les cèl·lules electroporades en medi TSA amb el corresponent antibiòtic, a les mateixes concentracions que les utilitzades per a *E. coli*.

### **C.8.2.3. Extracció d'ADN plasmídic, digestió amb enzims de restricció i electroforesi en gel d'agarosa en *E. coli***

#### **C.8.2.3.1. Extracció d'ADN plasmídic d'*E. coli* mitjançant clorur de liti**

1. Es va fer créixer *E. coli* en un cultiu de 5 ml de medi LB el qual contenia el corresponent antibiòtic, a 30 °C i durant tota la nit.
2. El cultiu crescut es va distribuir en dos microtubs tipus Eppendorf de 2 ml.
3. Es van centrifugar els tubs durant 5 min a 10000 r.p.m.
4. Posteriorment va ser eliminat el sobrenedant, decantant-lo. Es van introduir el microtub tipus Eppendorf en gel.
5. Es va resuspendre en vòrtex el precipitat amb 200 µl de solució 1 freda (50 mM glucosa, 25 mM Tris–HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 4 mg/ml liozím).

#### **Solució 1**

A 50 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Glucosa 0,5 M	5 ml
Tris–HCl pH 8; 1 M	1,25 ml
EDTA 0,5 M	1 ml
Liozím	200 mg

6. Es va afegir 400 µl de solució 2, guardada a temperatura ambient (0,2 N NaOH, 1% SDS) i es va deixar incubant durant 5 minuts en gel.

**Solució 2**

Per a 50 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

NaOH 1 N	10 ml
SDS (10%)	5 ml

7. Es va afegir 300  $\mu$ l de solució 3 freda (3 M acetat de potassi, 11,5 % d'àcid acètic glacial) i es va incubar durant 5 minuts en gel.

**Solució 3**

Per a 50 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Acetat de potassi 3 M	30 ml
Àcid acètic	5,75 ml

8. Es va centrifugar 5 min a 10000 r.p.m. i es va recuperar el sobrenedant amb micropipeta.

9. Va ser precipitat l'ADN amb 600  $\mu$ l de isopropanol fred a  $-20$  °C durant 10 min.

10. Posteriorment, es va centrifugar la mostra 5 min a 10000 r.p.m. i el sobrenedant va ser eliminat decantant-lo.

11. Es va resuspendre el precipitat en 200  $\mu$ l de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0).

**Solució TE**

A 50 ml d'aigua destil·lada s'afegeixen:

Tris-HCl pH 8 1 M	0,5 ml
EDTA 0,5 M	0,1 ml

12. Es van afegir 200  $\mu$ l de CILi 5 M, es va resuspendre amb vòrtex i es va deixar 10 min a  $-20$ °C

13. Es va centrifugar 5 min a 10000 r.p.m. i el sobrenedant va ser recuperat amb micropipeta.

14. Es va precipitar el sobrenedant amb 360  $\mu$ l d'isopropanol a  $-20$  °C durant 10 min.

15. Posteriorment va ser centrifugat 5 min a 10000 r.p.m. i es va eliminar el sobrenedant decantant-lo.
16. El precipitat es va rentar amb 100 µl d'etanol al 70 %.
17. Es va centrifugar 2 min a 10000 r.p.m. i va ser eliminat el sobrenedant decantant-lo.
18. Es va assecar el precipitat i aquest es va resuspendre en 30 µl de TE.
19. Finalment, es va tractar la mescla amb 1 µl d'ARNasa (10 mg/ml) a 37 °C durant 15 min.

#### **C.8.2.3.2. Digestió de l'ADN plasmídic d'*E. coli* mitjançant enzims de restricció**

Per a l'estudi dels transformants d'*E. coli* es van utilitzar els següents enzims de restricció (*Boehringer–Mannheim*):

pEZ123	<i>Sa</i> I
pSUM36	<i>Bam</i> HI

En les digestions d'ADN plasmídic,

1. Es va afegir 2 U enzim/ µg ADN.
2. La mescla es va deixar incubant 1 h a 37 °C.
3. Es van comprovar els fragments digerits del plasmidi per electroforesi en gel d'agarosa al 0,8 %.

#### **C.8.2.3.3. Electroforesi en gel d'agarosa**

1. Va ser dissolta l'agarosa, a una concentració del 0,8 %, escalfant-la en tampó TBE 1X.
2. Un cop dissolta l'agarosa, es va afegir el bromur d'etidi

Tampó TBE 1X	35 ml
Agarosa	0,28 gr
Bromur d'etidi	10 µl

3. Es va afegir l'agarosa dissolta, sobre un motlle de gels i es va deixar que es gelifiqués.

4. Un cop gelificada, es va passar el gel a una cubeta d'electroforesi amb tampó TBE 1X.
5. Les mostres dissoltes en solució blau de bromofenol van ser aplicades en els pouets del gel.
6. Es va fer l'electroforesi a 100 V/cm durant 30 min.
7. Posteriorment, va ser visualitzat l'ADN amb un transil·luminador de UV.

Com a control del pes molecular de l'ADN es va utilitzar el fag  $\lambda$  (*Boehringer–Mannheim*) digerit amb *Pst* I.

Per a visualitzar les bandes d'ADN es va utilitzar un transil·luminador TFX–20C (Vilver Lourmet) a una longitud d'ona de 254 nm. Els gels es van fotografiar amb una càmera "MP4–Land Camera" (Polaroid) utilitzant una pel·lícula *Polaroid 667*, o amb el sistema "Gel Doc 2000" (BioRad).

#### **C.8.2.4. Anàlisi de la presència dels diferents plasmidis electroporats en *M. vaccae* mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

Es van analitzar quatre colònies electroporades per a cada plasmidi. L'anàlisi es va dur a terme mitjançant extracció d'ADN total, amplificació per PCR i posterior anàlisi de les bandes amplificades en la PCR mitjançant electroforesi d'ADN.

##### **C.8.2.4.1. Extracció d'ADN total de *M. vaccae***

1. Es va fer créixer *M. vaccae* en un cultiu de 5 ml de medi TSA que contenia el corresponent antibiòtic, a 30 °C i durant 7 dies.
2. Posteriorment, el cultiu un cop crescut, va ser distribuït en dos microtubs tipus Eppendorf de 1,5 ml.
3. Es van centrifugar els tubs durant 5 min a 10000 r.p.m. Se'n va eliminar el sobrenedant.
4. El pèl·let va ser resuspès en 400  $\mu$ l de una solució de TE.
5. Es va inactivar la mostra durant 10 min a 85 °C en un bloc tèrmic (Bioblock Scientific).
6. Es va afegir 50  $\mu$ l de lisozim (10 mg/ml) i els tubs posteriorment, van ser incubats durant 1 h a 37°C.
7. Es va afegir 75  $\mu$ l d'una mescla de 72,5  $\mu$ l d'SDS 10% i 2,5  $\mu$ l de proteïnasa K (20 mg/ml).

8. La solució van ser mesclada en vòrtex 3 seg i es va incubar a 65 °C durant 10 min.
9. Es van afegir 100 µl de NaCl 5M.
10. Es va afegir, posteriorment, 100 µl de solució CTAB/NaCl, prèviament escalfada uns quants minuts a 65 °C, i a continuació es va mesclar amb un vòrtex fins que la solució va presentar aspecte lletós.
11. Es va incubar la mescla 10 min a 65 °C.
12. Es va afegir 750 µl de cloroform:alcohol isoamílic (24:1, v:v) i es va mesclar en vòrtex durant 10 seg.
13. Es va centrifugar a temperatura ambient 5 min a 12000 r.p.m..
14. De la centrifugació es van obtenir dues fases ben diferenciades i separades per un tel blanc. Es va passar la fase superior a un nou microtub tipus Eppendorf.
15. Posteriorment, es va afegir 420 µl d'isopropanol i es van deixar els Eppendorfs a -20 °C durant 30 min.
16. Es va procedir a centrifugar a temperatura ambient 5 min a 12000 r.p.m.
17. El sobrenedant va ser eliminat, decantant-lo.
18. Es va afegir 1 ml d'etanol al 70 % en aigua. Es va invertir el microtub tipus Eppendorf suaument diversos cops.
19. Posteriorment els microtubs tipus Eppendorf van ser centrifugats a temperatura ambient 5 min a 12000 r.p.m.
20. Es va decantar el sobrenedant i es va deixar assecar el pèl·let.
21. Finalment la mostra va ser resuspesa en 20 µl d'aigua destil·lada estèril o tampó TE.
22. Es va estimar la concentració d'ADN mitjançant un espectrofotòmetre Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific).

#### C.8.2.4.2. PCR

Es va utilitzar la tècnica de la PCR per amplificar la seqüència del plasmidi incorporat en les colònies obtingudes de *M. vaccae*.

Per a les diferents PCR es van utilitzar els següents *primers*:

pEZ123	→	pALMBZ-1	903 up
pSUM36	→	TN5A	TN5B

Les seqüències dels *primers* s'indiquen a continuació:



La reacció de PCR es va fer mitjançant:

ADN	1–5 µl
Tampó reacció	5 µl
DMSO	5 µl
dNTPs	0,4 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
Taq Gold	0,2 µl

Es va afegir aigua destil·lada estèril fins a un volum final de 20 µl

Les reaccions d'amplificació es van dur a terme en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) i es van sotmetre al programa següent:

#### pEZ123

Desnaturalització	94 °C	30 seg	1x
Anellatge	62 °C	30 seg	} 35x
Extensió	72 °C	1 min 30 seg	
Extensió final	72 °C	10 min	1x

#### pSUM36

Desnaturalització	94 °C	30 seg	1x
Anellatge	64 °C	30 seg	} 35x
Extensió	72 °C	1 min 30 seg	
Extensió final	72 °C	10 min	1x

Un cop amplificades les mostres es va fer una electroforesi en gel al 0,8 % d'agarosa, tal com es detalla a l'apartat 8.2.3.3, per observar el fragment amplificat.

**C.8.2.5. Estudi de l'estabilitat plasmídica de pEZ123 en *M. vaccae* llis**

1. Van ser inoculats 250 µl de *M. vaccae* llis transformat amb pEZ123 en 100 ml de medi TSB sense Km.
2. Es van deixar incubant els cultius 3–4 dies a 30 °C i en agitació constant.
3. Un cop crescuts els cultius, en van ser plaquejades dilucions en plaques TSA i TSA amb Km (5 µg/ml). Es van deixar incubant les plaques a 30 °C durant 6–7 dies.
4. Amb les dilucions plaquejades, es van inocular 250 µl del cultiu anterior en 100 ml de medi TSB fresc.
5. Es van tornar a incubar els nous cultius 3–4 dies a 30 °C i en agitació constant.
6. Es va repetir l'apartat 3.
7. Es va tornar a inocular un altre medi fresc de TSB amb 250 µl del segon cultiu.
8. Es van deixar incubar els cultius 3–4 dies a 30 °C i en agitació constant.
9. Es va tornar a repetir l'apartat 3.
10. Un cop crescudes totes les plaques, van ser calculats els valors de cfu/ml obtinguts pels tres cultius.

**C.8.3. Estudi de la integració del transposó Tngfp del plasmidi pEZ123 en el genoma de *M. vaccae* llis**

Per a la integració del Tngfp del plasmidi pEZ123 en el genoma de *M. vaccae* llis es va utilitzar una colònia del total de colònies que havien incorporat el plasmidi pEZ123 en el seu interior (*M. vaccae* llis+pEZ123), la qual va ser analitzada a l'apartat anterior (8.2.4).

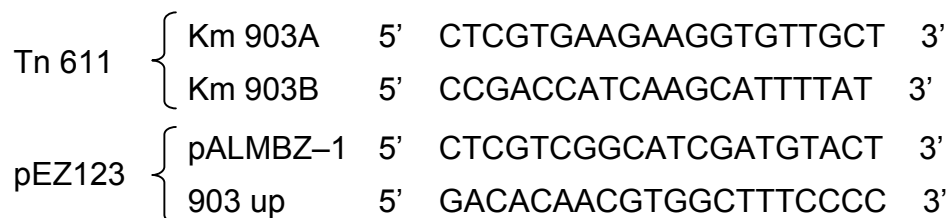
1. Es va preparar medi TSB amb Km a una concentració final de 5 µg/ml.
2. Van ser inoculats 100 µl d'un cultiu ben crescut de *M. vaccae* llis+pEZ123 en 100 ml de medi TSB+Km (5 µg/ml).
3. El medi inoculat es va deixar incubar a 30°C i en agitació constant durant 10–12 dies.
4. Amb el cultiu ben crescut, es van sembrar i incubar 100 µl d'aquest cultiu en els medis de cultiu següents:

Plaques	T <sup>a</sup> incubació
TSA	30°C
TSA	39°C
TSA+ Km (5 µg/ml)	30°C
TSA+ Km (5 µg/ml)	39°C
TSA+ Km (5 µg/ml)+ Sac 5%	30°C
TSA+ Km (5 µg/ml)+ Sac 5%	39°C

5. Les plaques van ser incubades en les seves corresponents temperatures durant 14 dies.
6. Posteriorment es van sembrar, per duplicat, les colònies crescudes en les plaques TSA+ Km (5 µg/ml) i TSA+ Km (5 µg/ml)+ Sac 5% i incubades a 39°C, en plaques TSA+ Km (5 µg/ml) i TSA+ Gm (20 µg/ml).
7. Es van deixar incubant les plaques a 30°C durant 7 dies.

Un cop crescudes les plaques es va fer l'extracció de l'ADN total de les colònies que van créixer en les plaques de TSA+ Km (5 µg/ml) i que no van créixer en les de TSA+ Gm (20 µg/ml), a igual condicions que a l'apartat 8.2.4.1.

Posteriorment, es va fer la PCR dels ADN extrets, utilitzant els *primers* següents:



La reacció de PCR es va fer mitjançant:

ADN	1–5 µl
Tampó reacció 10x	5 µl
DMSO	5 µl
dNTPs	0,4 µl
Primer 1	0,5 µl
Primer 2	0,5 µl
Taq Gold	0,2 µl

Es va afegir aigua destil·lada i estèril fins a un volum final de 20 µl.



Es van dur a terme les reaccions d'amplificació en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) i es van sotmetre al programa següent:

Desnaturalització		94 °C	30 seg	1x
Anellatge	Tn 611	58 °C	30 seg	45x
	pEZ123	62 °C	30 seg	35x
Extensió	Tn 611	72 °C	1 min 30 seg	45x
	pEZ123	72 °C	1 min 30 seg	35x
Extensió final		72 °C	10 min	1x

Un cop amplificades les mostres es va fer una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8 % per tal d'observar el fragment amplificat, seguint el protocol especificat a l'apartat 8.2.3.3.

Les colònies de *M. vaccae* llis que havien integrat el Tngfp en el genoma i que no tenien el pEZ123 integrat (*M. vaccae* llis + Tngfp), es van guardar en glicerol a -80 °C, per a la seva posterior utilització.

#### C.8.3.1. Ligation-mediated PCR (LMPCR)

La LMPCR és una tècnica d'amplificació per a la caracterització de seqüències d'ADN genòmic que es troben flanquejant seqüències d'inserció conegudes (Prod'hom, 1998).

1. Van ser inoculats 100 µl d'un cultiu ben crescut de *M. vaccae* llis + Tngfp en 100 ml de medi TSB+Km (5 µg/ml).

2. Es va fer l'extracció de l'ADN genòmic d'aquests cultius crescuts d'igual forma que en l'apartat 8.2.4.1.

3. Es va fer una digestió de l'ADN genòmic amb l'enzim de restricció *SaI*

ADN genòmic	1 µl
Tampó NEB4	2 µl
Enzim <i>SaI</i> (10U/µl)	1 µl
Aigua	16 µl

4. Es va deixar la mescla 1 h a 37 °C.

5. Posteriorment, es va passar a 0 °C.

6. Sobre els 20  $\mu\text{l}$  de la digestió, van ser afegits:

Adaptador Sal	1 $\mu\text{l}$
T4 ADN Ligasa (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,3 $\mu\text{l}$
Aigua	2,7 $\mu\text{l}$
Tampó de lligació 5x	6 $\mu\text{l}$

7. Les mostres es van posar en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) amb el programa següent:

1 hora	24 °C
10 minuts	65 °C
$\infty$	4 °C

8. Sobre els 30  $\mu\text{l}$  de la lligació, van ser afegits

Tampó de l'enzim <i>Sall</i>	1,5 $\mu\text{l}$
Enzim <i>Sall</i> (10U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Aigua	3 $\mu\text{l}$

9. Es van deixar les mostres 15 min a 37 °C i, posteriorment, es van mantenir en fred.

10. Es va fer la PCR amb els *primers* següents:

Salgd	5'	TAGCTTATTCCTCAAGGCACGAGC	3'
gfp1	5'	TCCTTCTTAAATCTAGGGCTGCAG	3'
IS2	5'	GAGGCGGCAGAAAGTCGTCAGGTCAG	3'

i amb les barreges següents de la PCR:

ADN digerit i lligat	5 $\mu\text{l}$
Tampó reacció 10x	5 $\mu\text{l}$
DMSO	5 $\mu\text{l}$
dNTPs	0,4 $\mu\text{l}$
Oligo Salgd	0,5 $\mu\text{l}$
Oligo Tn	0,5 $\mu\text{l}$
Taq Gold	0,2 $\mu\text{l}$

Es va afegir aigua fins a un volum final de 50  $\mu\text{l}$

11. Posteriorment, es van sotmetre les mostres de PCR al programa següent:

Desnaturalització	94 °C	30 seg	1x
Anellatge	62 °C	30 seg	35x
Extensió	72 °C	1 min 30 seg	35x
Extensió final	72 °C	10 min	1x

12. Un cop amplificades les mostres es va fer una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8% per observar el fragment amplificat, d'igual forma que s'especifica a l'apartat 8.2.3.3.

### **C.8.4. Construcció d'una llibreria genòmica en *M. vaccae* rugós**

#### **C.8.4.1. Digestió d'ADN mitjançant enzims de restricció**

Per a la construcció de la llibreria de *M. vaccae* rugós es van utilitzar els enzims de restricció següents: *Sau3A1* i *Bam*HI (*Boehringer–Mannheim*).

Per a la llibreria es va utilitzar el plasmidi pSUM36 (figura 13) el qual va ser digerit mitjançant l'enzim de digestió *Bam*HI i utilitzant el protocol explicat a l'apartat 8.2.3.2.

En la digestió parcial del genoma de *M. vaccae* llis es va utilitzar el mètode de dilucions seriades de l'enzim (*Sau3A1*) davant d'una concentració constant d'ADN de *M. vaccae* llis (Ausubel, 1993).

1. Es va afegir la mescla de reacció (250 µl) amb l'ADN genòmic dissolt en el tampó de digestió 1x.
2. Es va repartir la mescla en sis microtubs tipus Eppendorf d'1,5 ml: 60 µl en el primer tub i 30 µl en els tubs restants.
3. Va ser afegit 1 µl de l'enzim de digestió en el primer tub.
4. Es van passar 30 µl de la mescla del primer tub al segon tub i així successivament, fins al sisè tub.
5. Els tubs es van deixar 1 h a 37 °C.
6. Posteriorment, es va frenar immediatament la reacció passant els tubs a gel.

Finalment, es va fer una electroforesi en gel d'agarosa al 0,8 %, d'igual forma que s'especifica a l'apartat 8.2.3.3.

#### **C.8.4.2. Purificació dels fragments d'ADN mitjançant columna Qiagen**

Els fragments d'ADN digerits parcialment es van purificar mitjançant el sistema de columna "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen).

1. Els fragments d'ADN separats mitjançant un gel d'agarosa van ser visualitzats mitjançant llum UV a 360 nm.
2. Es van tallar els fragments d'ADN mitjançant un bisturí estèril intentant arrossegar el mínim d'agarosa i es van posar en un microtub tipus Eppendorf estèril. Es va intentar exposar el mínim possible l'ADN a la llum UV.
3. Es van pesar els fragments d'agarosa dins el microtub tipus Eppendorf estèril.
4. Es van afegir tres volums del tampó QG per cada volum de mostra. Es va mesclar 2–3 min mitjançant agitació.
5. La mostra va ser incubada uns 10 min a 50 °C, fins que l'agarosa va estar totalment dissolta.
6. Es va afegir un volum d'isopropanol per volum de mostra i es va mesclar.
7. La mostra va ser transferida a una columna de purificació acoplada a un microtub tipus Eppendorf de 1,5 ml.
8. Es va centrifugar la columna a 13000 r.p.m. durant 1 min.
9. Es va eliminar el filtrat i després es va afegir a la columna 700 µl de tampó de rentat PE.
10. Es va centrifugar durant 1 min a 13000 r.p.m.
11. La columna es va passar a un nou microtub tipus Eppendorf i es va afegir 50 µl de tampó d'elució EB o aigua destil·lada i desionitzada al centre de la columna.
12. Es va esperar 1 min i després es va centrifugar la columna a 13000 r.p.m. durant 1 min.
13. Va ser recuperat el volum que contenia la matriu, on es trobava l'ADN dissolt en el tampó o l'aigua.

#### **C.8.4.3. Desfosforització dels extrems de l'ADN plasmídic**

Per a la desfosforització dels extrems cohesius del plasmidi pSUM36 linealitzat, es va utilitzar fosfatasa alcalina (Roche) amb el tampó de desfosforització 10x (Roche).

1. Es va afegir a l'ADN plasmídic, prèviament tallat i dissolt en aigua destil·lada un 10 % del volum total de tampó de desfosforització.
2. Després es va afegir la fosfatasa alcalina a la concentració recomanada pel fabricant.
3. Es va deixar incubar la mescla 10 min a 37 °C.
4. Posteriorment es va inactivar l'enzim incubant la mescla 15 min a 65 °C.

#### C.8.4.4. Lligació de fragments d'ADN

Per a la lligació dels fragments d'ADN de *M. vaccae* llis en el plasmídi pSUM36 linealitzat, es va utilitzar l'enzim T4 ADN lligasa (Gibco BRL).

1. Es va mesclar el vector desfosforilat i els fragments d'ADN en tampó de lligació 5x a diferents proporcions de vector:fragment ADN, 1:3, 1:5 i 1:10, i en un volum màxim de 20 µl de reacció.
2. Es va afegir lligasa a una concentració de 0,25 U lligasa/µg de vector.
3. Es va deixar incubant la reacció a 16 °C tota la nit.

#### C.8.4.5. Transformació d'*E. coli* i *M. vaccae* rugós amb els productes de la lligació

1. Es va seguir el protocol d'electroporació de l'apartat 8.2.2.3. afegint 15 µl de la mescla de lligació al tub de cèl·lules electrocompetents.
2. Un cop electroporades les cèl·lules i incubades a 37 °C, es van sembrar en medi sòlid amb el corresponent antibiòtic.

<i>E. coli</i>	LB + Km (20 µg/ml) + iptg + Xgal
<i>M. vaccae</i> rugós	TSA + Km (5 µg/ml)

3. Es van deixar incubant les plaques a 37 °C durant 48 h i a 30 °C durant 12–14 dies, per a *E. coli* i *M. vaccae*, respectivament.
4. Del total de colònies de morfologia llisa crescudes de la transformació de *M. vaccae*, es van aïllar i resembrar en medi TSA + Km (5 µg/ml) només les colònies mutants amb morfologia rugosa.
5. Un cop crescudes, les colònies de morfologia rugosa es van guardar en glicerol a –80 °C, per a la seva posterior utilització.



## D. RESULTATS

### D.1. Condicions de cultiu i morfologia colonial

*M. vaccae* va créixer en TSA, Middlebrook 7H10 i Sauton i va donar majoritàriament colònies de morfologia llisa. A TSA i Middlebrook 7H10 s'observaven les colònies ben crescudes al cap d'una setmana, en canvi en medi Sauton les colònies no començaven a ser visibles fins al cap de 6 setmanes.

Després de fer repetides sembres (dues o tres passes) de les colònies de morfologia llisa de *M. vaccae* en medi TSA, Middlebrook 7H10 i Sauton, van aparèixer de forma espontània colònies de morfologia rugosa.

El medi en el qual es va obtenir una millor diferenciació colonial de manera macroscòpica va ser el TSA (fig. 14). En aquest medi, les colònies llises de *M. vaccae* van presentar forma arrodonida i un aspecte mucós i brillant. Les colònies de morfologia rugosa, en canvi, presentaven un aspecte més sec, no brillant i eren colònies visiblement més grans que les variants llises (fig. 15). Quan les dues morfologies colonials van ser cultivades en aquest medi i van ser exposades a la llum, les colònies van canviar de color, van passar de tenir color crema a un color groc–taronja característic de *M. vaccae*.

En els medis Middlebrook 7H10 i Sauton aquestes diferències en la morfologia colonial no van ser tan evidents. En aquests medis, les colònies de morfologia llisa no van presentar formes arrodonides sinó que presentaven marges irregulars similars als de les variants morfològiques rugoses. A més, les diferències de mucositat i brillantor entre totes dues variants van ser difícils d'apreciar. Pel que fa a la mida, es va observar que en el medi Middlebrook 7H10 les colònies de morfologia llisa eren, en general, més grans que les de morfologia rugosa, mentre que en el medi Sauton no es van observar diferències de mida entre morfologies. Una altra diferència que cal destacar va ser que cap de les dues variants morfològiques, en tots dos medis, no van sintetitzar pigment groc–taronja després d'exposar-les a la llum. En el medi Middlebrook 7H10 les colònies es van mantenir de color crema i en el medi Sauton eren de color similar al del medi de cultiu (fig. 14).

A partir d'aquests resultats obtinguts en *M. vaccae* es va escollir el TSA com el medi més discriminatiu i idoni per a obtenir colònies espontànies rugoses a partir de les colònies llises dels altres micobacteris integrants de l'estudi.

Es van obtenir en medi TSA variants morfològiques rugoses de les colònies originalment llises de: *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense* i *M. parafortuitum* (fig. 15). Utilitzant la lupa estereoscòpica, es va observar que les colònies de morfologia llisa presentaven un aspecte mucós, brillant i hidratat i

una superfície arrodonida, no plana, amb un marge rodó i sense irregularitats (fig. 15).

En canvi, totes les variants morfològiques rugoses eren colònies seques, no brillants, amb una superfície arrugada amb relleu i amb un marge irregular (fig. 15). L'única excepció va ser *M. aurum*, en el qual la superfície de les colònies rugoses va presentar una aspecte més hidratat que la de les colònies rugoses dels altres micobacteris (fig. 15, A). Es pot dir que en *M. aurum* les dues morfologies colonials van presentar una textura de superfície similar, totes dues colònies van presentar un aspecte brillant i humit, encara que aquestes característiques eren més pronunciades en la soca llisa.

Segons aquests resultats es va considerar que la variant morfològica rugosa obtinguda en *M. aurum* era una variant intermedia entre totes dues morfologies: llisa (brillant i hidratada) i rugosa (seca i amb relleu). Per tant, es va passar a anomenar aquesta morfologia colonial intermedia obtinguda en *M. aurum*, *variant rugosa brillant*.

Després de ressemmbrar les variants colonials rugoses durant un període de quatre anys, es va observar que aquestes es mantenien estables i no revertien a una morfologia llisa.

## D.2. Anàlisi microscòpica

Mitjançant el microscopi electrònic de rastreig es va observar l'organització dels bacteris en la colònia. Es va veure una diferència clara d'organització dels bacils en les colònies de morfologia llisa respecte dels de morfologia rugosa en tots els micobacteris estudiats (fig. 16– fig. 21).

En les colònies de morfologia llisa, els bacteris es trobaven disposats de forma dispersa, desorganitzada i sense cap orientació. A més es podien veure clarament espais buits entre bacil i bacil. En *M. aurum*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae* aquests espais entre bacils eren molt pronunciats de forma que permetien veure els bacils localitzats més a l'interior de la colònia. En canvi, en *M. chubuense* aquests espais eren més estrets i això feia que només es poguessin observar els bacils que formaven part de la capa més externa de la colònia (fig. 17).

En les colònies rugoses els bacteris es disposaven molt junts els uns dels altres, mostrant una orientació paral·lela i formant una estructura compacta. En *M. aurum*, *M. chubuense* i *M. vaccae* aquesta estructura compacta no tenia una forma determinada, encara que en diferents zones s'observaven petits canals o túnels (fig. 16, fig. 17 i fig. 21, respectivament). En *M. obuense* i *M. parafortuitum* els bacils s'organitzaven en grups entre les quals també



s'observava la presència de canals (fig. 19 i fig. 20, respectivament). En *M. gilvum*, en canvi, es va poder apreciar clarament la formació de cordes (fig. 18).

Una altra diferència que cal destacar és que totes les variants morfològiques llises es trobaven embolcalldes d'una matriu extracel·lular formada per filaments prims i llargs. Aquesta matriu extracel·lular no es trobava present en les colònies de morfologia rugosa estudiades, a excepció de la variant rugosa brillant de *M. aurum*. En *M. aurum* tant les colònies de morfologia llisa com les colònies de morfologia rugosa brillant van presentar aquesta matriu extracel·lular (fig. 16). Es va observar també la presència de petits filaments en les variants rugoses de *M. vaccae* (fig. 21).

### D.3. Anàlisi de la capacitat de motilitat

Es va estudiar la capacitat de motilitat de les variants morfològiques llises i rugoses dels diferents micobacteris en diferents medis semisòlids: TSA, Sauton modificat, M63 i Middlebrook 7H9 sense complementar, tots ells amb diferents concentracions d'agar i agarosa (0,1; 0,3; 0,6 i 0,8%).

Per als quatre medis de motilitat estudiats es va determinar que l'ús de l'agarosa, en comptes d'agar per a solidificar el medi, i a una concentració de 0,3 %, eren les condicions òptimes per a una bona diferenciació de colònies mòbils i immòbils.

Es va determinar també que el medi òptim per a l'estudi de la motilitat era el medi Middlebrook 7H9 al 0,3 % d'agarosa.

Es va poder observar que totes les variants llises tenien la capacitat de moure's en aquest medi semisòlid (fig. 22 i 23). La motilitat de les colònies de morfologia llisa va començar a ser visible a partir de les 24–48 hores de la inoculació. A excepció de *M. aurum* i *M. parafortuitum*, els quals van presentar una motilitat una mica més limitada, la resta de variants llises eren capaces d'envair pràcticament tota la superfície de la placa de Middlebrook 7H9 al cap de 5 o 6 dies.

En canvi, en les variants rugoses pràcticament no es van observar variacions en l'expansió de la colònia al llarg del temps, no van formar cap tipus de prolongació i es van estendre només uns quants mil·límetres des del punt d'aplicació (fig. 24 i 25). Per tant, amb aquests resultats podem dir que les variants llises eren capaces de lliscar per la superfície del medi de motilitat i que ho van fer més eficientment que les de morfologia rugosa.

Observant les plaques mitjançant una lupa estereoscòpica Leica MZFLIII, es va veure que els bacteris de morfologia llisa es movien per l'agar formant diferents tipus d'extensions, bifurcacions o branques des del punt d'inoculació fins la perifèria de la colònia (fig. 22 i 23).

Amb la finalitat d'assegurar que el que s'observava tant en les prolongacions com en la perifèria de les plaques eren micobacteris que s'havien desplaçat i no un artefacte del medi, es va agafar una mostra de les prolongacions i de la perifèria i es va fer una tinció de ZN. La tinció va confirmar la presència de bacils àcid alcohol resistents en les prolongacions i en la perifèria de les colònies llises. Es va observar també que els bacils presentaven un aspecte molt prim i que la fucsina no havia penetrat del tot bé en el seu interior.

#### **D.4. Anàlisi dels lípids i glicolípid**

Diferents estudis en micobacteris indiquen que el canvi de morfologia colonial de llisa a rugosa en una mateixa soca es deu a canvis en el patró de lípids i glicolípid de la paret cel·lular.

És per aquest motiu que es va analitzar i comparar el patró lipídic i glicolípidic per CCF analítica de l'extracte cru de totes dues variants morfològiques (llisa i rugosa) de les soques *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*.

##### **D.4.1 Patró de lípids, glicolípid i fosfolípids**

L'estudi per CCF dels EC va mostrar que les variants llises i rugoses de cada micobacteri comparteixen el mateix patró de lípids, glicolípid i fosfolípids. Totes les variants llises i rugoses presenten DMT, MMT i PIM (fig. 26, 27 i 28, respectivament).

El patró de fosfolípids va ser el mateix a totes les soques (fig. 29). No es van observar GPL (fig. 30). No es va detectar DIM, encara que sí traces de compostos que migraven de forma similar a les menaquinones (fig. 31, 32 i 33).

També es va analitzar el patró d'àcids micòlics de cada una de les dues variants morfològiques. El contingut d'àcids micòlics de les variants morfològiques llises i rugoses per als diferents micobacteris estudiats va ser exactament el mateix:  $\alpha$ - ,  $\alpha'$ - , ceto- i dicarboxi-micolat (fig. 34).

El contingut lipídic, glicolípidic i fosfolípídic de les variants llises i de les variants rugoses dels diferents micobacteris es detalla a la taula 7.

**Taula 7.** Contingut en lípids, glicolípid i fosfolípids de les variants morfològiques llisa i rugosa de les diferents espècies estudiades.

	TV	DMT	MMT	GPL	PIM	Altres fosfolípids	Àcids micòlics	MK	DIM
<i>M. aurum</i> llis	+	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. aurum</i> rugós	+	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. chubuense</i> llis	+	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. chubuense</i> rugós	-	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. gilvum</i> llis	+	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. gilvum</i> rugós	-	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. obuense</i> llis	+	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. obuense</i> rugós	-	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. parafortuitum</i> llis	+	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. parafortuitum</i> rugós	-	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. vaccae</i> llis	+	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-
<i>M. vaccae</i> rugós	-	+	+	-	+	+	I,II,IV,VI	+	-

TV, Taca vermella; DMT, Dimicolat de trealosa; MMT, monomicolat de trealosa; GPL, Glicopeptidolípid; PIM, Fosfatidilinositolmanósids; MK, Menaquinones i DIM, Dimicocerosato de tiocerol.

I,  $\alpha$ -micolat; II,  $\alpha'$ -micolat; IV, ceto-micolat i VI, dicarboxi-micolat.

+, presència del lípid, glicolípid o fosfolípid; -, absència del lípid, glicolípid o fosfolípid.

## D.5. Estudi de la TV

Comparant, per CCF, el patró lipídic i glicolipídic dels extractes crus de les dues morfologies colonials, es va observar que totes les colònies de morfologia llisa presentaven un compost desconegut, no descrit anteriorment (fig. 35).

Aquest compost no es trobava present en les variants morfològiques rugoses de *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*, però sí en la variant rugosa brillant de *M. aurum* encara que a una concentració més baixa que en la seva corresponen variant llisa.

Com a conseqüència de la presència d'aquest composts tant en la morfologia colonial llisa com en la variant rugosa brillant de *M. aurum*, es va

decidir no incloure aquesta espècie micobacteriana en els posteriors estudis ja que aquests resultats obtinguts no entraven en els objectius inicials del treball.

Aquest compost es tenia de color vermell en contacte amb l'antrona, a diferència dels glicolípidis que es tenien de color blau (fig. 35). Per aquest motiu se li va donar el nom de TV.

L'antrona és un compost que s'usa com a mètode colorimètric per a la determinació de sucres en una mostra. Els sucres reaccionen amb l'antrona en condicions àcides i donen lloc a color blau-verd.

També es va observar que aquesta TV migrava al llarg de la placa cromatogràfica de forma característica i diferent de la resta de compostos analitzats i coneguts, adoptant una forma similar a una flama (fig. 35).

Amb els sistemes d'elució, 85:15 (Cloroform:Metanol) i 30:8:1 (Cloroform:Metanol:Aigua) aquest compost no migrava sinó que es quedava en el punt d'aplicació. Amb el sistema d'elució 60:35:8 (Cloroform:Metanol:Aigua) migrava amb el front del solvent.

Després d'assajar diferents sistemes d'elució es va determinar que el millor sistema d'elució per a observar aquest compost mitjançant CCF era metanol:cloroform en unes proporcions 90:10. En aquest sistema el compost s'observava sota el front d'elució, a la part superior de la placa de cromatografia i es separava bé de la resta de lípids presents en els extractes (fig. 35).

### D.5.1. Purificació de la TV per HPLC

La TV es va purificar a partir de la soca llisa de *M. vaccae*. El monitoratge mitjançant CCF va permetre determinar que la TV era fàcilment extraïble, a temperatura ambient i agitació constant durant 24–48 hores, amb cloroform:metanol, cloroform:metanol:aigua, 1-butanol o solució aquosa la qual contenia Triton-X114. L'extracció amb 1-butanol va ser la que va donar un millor rendiment tenint en compte que s'extreien grans quantitats de TV respecte a mínimes quantitats d'altres compostos procedents de la paret cel·lular micobacteriana.

Així doncs, el procés de purificació es va fer a partir d'extractes obtinguts per agitació de les cèl·lules bacterianes en 1-butanol.

Els extractes d'1-butanol que contenien la TV es van injectar en un HPLC i es van fraccionar seguint el protocol especificat al Material i Mètodes (apartat 5.2.2.). La TV es va recollir entre les fraccions 94 i 107 (fig. 36).

### D.5.2. Espectroscòpia d'IR

L'espectre d'IR del nostre compost va mostrar bandes a 2925 i 2854  $\text{cm}^{-1}$  característiques dels grups metil ( $\text{CH}_3$ ) i dels metilens ( $\text{CH}_2$ ), respectivament. A 1729  $\text{cm}^{-1}$  va aparèixer una banda d'alta intensitat característica d'un enllaç  $\text{C} = \text{O}$ , i, a 1179  $\text{cm}^{-1}$ , va aparèixer una banda d'intensitat mitjana atribuïble a un enllaç  $\text{C} - \text{O}$ . Totes dues senyals van concordar amb un èster (fig. 37).

### D.5.3. CG-EM

En l'anàlisi de la TV mitjançant CG-EM, el cromatograma obtingut corresponent a la fracció àcida, ens va permetre identificar la presència dels àcids saturats coneguts següents:  $\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{18:0}$ , i el 10-metil- $\text{C}_{18:0}$ . La resta de pics no van ser identificats i es va deduir que podrien ser fragments de la TV (fig. 38).

El segon cromatograma, corresponent a la fracció neutra, ens va indicar la presència dels següents  $n$ -alcohols saturats:  $\text{C}_{14}$ ,  $\text{C}_{16}$  i  $\text{C}_{18}$ . També es va observar la presència d'un altre alcohol saturat però en aquest cas ramificat: 6,10,14-trimetilpentadeca-2-ol (fig. 38).

Hi van aparèixer altres pics que no van ser identificats per comparació amb les llibreries d'espectre, probablement perquè eren fragments de la TV.

### D.5.4. RMN

Totes les ressonàncies en l'espectre 1D  $^1\text{H}$ -RMN apareixien a l'àrea de 0,8–5,0 ppm, fet que va indicar l'absència de protons d'origen aromàtic i olefínic. A la figura 39 s'especifiquen les correspondències entre la posició en el espectre i el tipus de protó. Els espectres de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  confirmaven la presència de molècules saturades de cadena llarga, però degut a considerables efectes de solapament va ser difícil predir la longitud d'aquestes cadenes per RMN.

Els senyals ben definits de  $\text{CH}_2$  apareguts a 4,06 ppm ( $^1\text{H}$ ) i a 65.1 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) (fig. 40) es trobaven d'acord amb el sistema  $\text{RCOOCH}_2\text{R}'$  (fig. 39), i el seu fort creuament de pics en el HMBC amb el carbó carboxil a 175 ppm va confirmar l'enllaç èster (fig. 41).

L'anàlisi dels espectres HSQC, COSY i TOCSY van confirmar la presència d'hidrocarburs saturats de cadena llarga (fig. 40, 42 i 43). A més, apareixien dos senyals clars  $^1\text{H}$  a 4,97 i 4,48 ppm (fig. 39), i la corresponent ressonància de carbonis a 73,3 i 81,2 ppm, respectivament (fig. 40). Aquestes dades concordarien amb la possible existència de cadenes hidroxil ramificades ( $\text{ROCH}(\text{R}')-\text{CH}_2\text{R}''$ ), les quals podrien estar fortament relacionades amb la presència d'un esquelet d'estructura similar a un "estolide" (Peláez, 2003).

Es van fer tècniques de gradient de camp polsant (PFGSE) i es va utilitzar l'experiment LED amb gradients bipolars (LEDBP), per tal de veure si es podia determinar la mida molecular aproximada del compost. El valor experimental del coeficient de difusió que es va obtenir d'una solució no viscosa de  $\text{CDCl}_3$  ( $1.58 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) va indicar que la complexa macroestructura de polièster de la TV podia presentar un pes molecular aparent aproximadament al voltant de 5.000–7.000 (Friebolin 1991; Sacchi, 1997; Kmothe i Nelsen, 1998; Cermak i Isbell, 2003).

Totes les interpretacions dels espectres les ha fet Teodor Parella, director del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona

## D.6. Estudi de la hidrofobicitat

### D.6.1. Anàlisi mitjançant hexadecà

Per a la determinació de la hidrofobicitat mitjançant hexadecà, es van utilitzar com a control els bacteris *E. coli* i *S. aureus* i el llevat *S. cerevisiae*, els quals van donar uns valors d'hidrofobicitat de 8; 10,5 i 46, respectivament (fig. 44).

Analitzant els valors de les diferents morfologies colonials dels diferents micobacteris, varem veure que, tal com es mostra a la figura 44, només es van observar diferències significatives d'hidrofobicitat entre morfologies en *M. parafortuitum* (\*\*,  $p < 0,01$ ) i *M. obuense* (\*,  $p < 0,05$ ).

Per als altres micobacteris estudiats els valors de percentatge d'hidrofobicitat entre les seves dues morfologies colonials van ser similars, no van presentar diferències significatives entre morfologies. Amb l'excepció de *M. parafortuitum*, els micobacteris estudiats van donar valors molt elevats d'hidrofobicitat, al voltant d'un 80–90 % (fig. 44).

### D.6.2. Observació microscòpica de la interfase PBS/n-hexadecà

L'observació de la interfase en el microscopi òptic mostrà la presència dels bacils tant de les variants llises com de les rugoses de *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense* i *M. vaccae* concentrats en la zona de l'n-hexadecà, mentre que en la zona de l'aigua pràcticament no s'observaven (fig. 45 i 46).

En canvi, en *M. parafortuitum* es van obtenir resultats contraris al de la resta de micobacteris estudiats, els bacils es van concentrar tots a la part de l'aigua i no eren presents en els doblets de l'hidrocarbur (fig. 46, G i H).

Els resultats obtinguts en els controls, mostrà en *E. coli* i *S. aureus* la presència de tots els bacteris localitzats en la zona del PBS, a diferència de *S. cerevisiae*, els quals es trovaven distribuïts tant a la zona de l'n-hexadecà com del PBS (fig. 47).

Amb aquesta observació microscòpica es van confirmar els resultats d'hidrofobicitat obtinguts a l'apartat anterior per a tots els micobacteris estudiats.

## **D.7. Anàlisi de formació de biopel·lícules en la interfase i de la capacitat d'adhesió**

### **D.7.1. Anàlisi de la formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid–aire**

Es va estudiar la capacitat de formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid–aire de les colònies de morfologia llisa i de les de morfologia rugosa dels diferents micobacteris, en tubs de vidre i en plaques de cultiu cel·lular de 24 pouets de PS, sense agitació.

Tots els micobacteris de morfologia rugosa van créixer en medi TSB formant un pel·lícula en la interfase líquid–aire visible a partir dels 7 dies (fig. 48 i 49). Aquesta pel·lícula tenia un aspecte sec i presentava una superfície compacta i irregular en forma de plecs que, amb el temps, 2–3 setmanes, es va tornar densa i arribà a englobar de forma uniforme tota la superfície de la interfase. A més s'observà com aquesta biopel·lícula envaïa les parets del tub.

Aquestes variants rugoses no només creixien a la superfície formant el tel, sinó que altres bacils també es van trobar pel medi formant agrupacions que conforme van anar creixent es van anar dipositant al fons del tub.

Els micobacteris de morfologia llisa, en canvi, no creixien en la interfase formant un tel, sinó que, mentre que alguns bacils creixien per tot el medi de forma homogènia, fent que el medi presentés un aspecte tèrbol, d'altres van precipitar quedant-se al fons del tub (fig. 48 i 49).

Una altra cosa a destacar és que els micobacteris de morfologia llisa estudiats no tendiren a agrupar-se entre ells formant grumolls, la qual cosa feia que no s'observessin agrupacions a simple vista com sí que va passar en el cas de les variants rugoses.

Comparant la capacitat de formació de la biopel·lícula entre tots dos materials emprats, vidre i PS, podem dir que no es van observar diferències a simple vista. En tots dos materials es van observar els mateixos resultats mencionats anteriorment per a cada morfologia colonial.

### D.7.2. Anàlisi de l'adhesió al vidre i al PS

Es va mesurar la capacitat de les morfologies colonials llises i rugoses per adherir-se a tubs de vidre i PS en constant agitació i a diferents dies: 1, 2, 3, 4 i 7. Els resultats van ser expressats com cfu/cm<sup>2</sup> (fig. 50 i 51).

L'anàlisi del patró d'adhesió dels diferents micobacteris al llarg del temps, en general, va ser molt similar per a cada micobacteri estudiat, exceptuant-ne *M. parafortuitum*. Per a la resta de micobacteris, els valors d'adhesió es van incrementar gradualment al llarg del temps fins el dia 7 i a partir d'aquest dia es van mantenir constants aquests valors.

Si analitzem com es van comportar les diferents variants morfològiques per a cada material, trobem que en vidre les variants llises van tendir a adherir-se més eficientment que no pas les rugoses (fig. 50).

Es van observar diferències significatives entre les variants llises i les rugoses, en la seva capacitat per adherir-se al vidre ( $p < 0,05$ ) en el cas de *M. chubuense* (entre els dies 1–4) (\*,  $p < 0,05$ ), *M. gilvum* (1–7 dies) (\*,  $p < 0,05$ ; i \*\*,  $p < 0,01$ ), i en *M. obuense* només en el dia 3 (\*,  $p < 0,05$ ), i en *M. vaccae* (dies 2 i 3) (\*,  $p < 0,05$ ; i \*\*,  $p < 0,01$ ). A més, es va observar que la variant rugosa de *M. obuense* va presentar un increment de la capacitat d'adhesió al vidre comparat amb la seva variant llisa en els dies 1 i 7 ( $\&$ ,  $p < 0,05$ ) (figura 50). En *M. parafortuitum* es van observar diferències entre totes dues variants els dies 4 (\*) i 7 ( $\&$ ) ( $p < 0,05$ ), respectivament.

També caldria destacar que en el dia 7 en totes les soques la variant rugosa va superar la llisa en el nombre de cfu/cm<sup>2</sup>, exceptuant-ne *M. gilvum*, sent aquesta diferència significativa només en el cas de *M. obuense* ( $\&$ ,  $p = 0,02$ ) i *M. parafortuitum* ( $\&$ ,  $p = 0,015$ ) (fig. 50).

Analitzant els resultats d'adhesió cel·lular en l'altre material emprat, el PS, les diferències obtingudes van ser encara més destacades, encara que, a diferència del vidre, en què les variants morfològiques llises eren les que presentaven més adhesió cel·lular, en el cas del PS els resultats van ser a la inversa. Les variants rugoses van ser les que van presentar més capacitat d'adherència ( $\&\&$ ,  $p < 0,01$ ) (fig. 51).

Es van observar diferències estadísticament significatives ( $\&\&$ ,  $p < 0,01$ ) entre els dies 1–4, en el cas de *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense* i *M. vaccae* (fig. 51).

En el cas de *M. parafortuitum*, l'adhesió cel·lular de les variants llises va ser significativament més elevada que les seves variants rugoses (\*,  $p < 0,05$ ), en els dies 1 i 2.

Segons els resultats obtinguts, podríem dir que tant les variants llises com les rugoses tenen la capacitat d'adherir-se al vidre (fig. 50) i al PS (fig. 51). Les



variants llises s'adhereixen més eficientment al vidre i les variants rugoses s'adhereixen més eficientment al PS. L'excepció és *M. parafortuitum*; en aquest micobacteri les variants llises i rugoses s'adhereixen per igual a totes dues superfícies. Al cap de 7 dies les diferències ja no són tan marcades entre totes dues variants.

## **D.8. Genètica amb *M. vaccae***

### **D.8.1. Estudis previs en *M. vaccae***

#### **D.8.1.1. Estudi de la corba de creixement de *M. vaccae* llis i *M. vaccae* rugós en medi líquid TSB**

Es va mesurar la densitat òptica ( $D.O_{600}$ ) d'un cultiu de *M. vaccae* llis i *M. vaccae* rugós en medi líquid TSB a diferents temps. Es va determinar el temps de generació, en quant de temps el cultiu iniciava la fase estacionària i en quant de temps s'obtenia un  $D.O.$  a 600 nm d'entre 0,5–1. Aquestes dades van ser importants per obtenir posteriorment cèl·lules electrocompetents de *M. vaccae*.

La corba de creixement obtinguda en l'estudi de totes dues morfologies colonials de *M. vaccae* en medi TSB va ser similar (fig. 52). Els resultats obtinguts van mostrar que a partir de les 30 h de la inoculació del cultiu aquest iniciava la fase estacionària i s'obtenia una  $D.O_{600}$  d'entre 0,5 i 1, al cap de 38 h de l'inici del cultiu (fig. 52). Aquesta concentració era adient per obtenir de cèl·lules electrocompetents. També es va determinar el temps de generació de *M. vaccae*, que va ser, aproximadament, de 5 h.

#### **D.8.1.2. Determinació de la CMI de *M. vaccae* llis i *M. vaccae* rugós en diferents antibiòtics**

Es va determinar la CMI de *M. vaccae* llis i rugós en els antibiòtics següents: Gm, Km, Sm i Hyg i mitjançant dos mètodes diferents: resazurina i estudi en placa.

Aquestes dades eren importants per als experiments posteriors, per seleccionar colònies electroporades les quals hagin incorporat el plasmidi corresponent.

Els resultats obtinguts, en tots dos mètodes realitzats, van ser els mateixos. També es van obtenir les mateixes CMI en *M. vaccae* llis com en *M. vaccae* rugós per a cada antibiòtic estudiat (taula 8).

**Taula 8.** Valors de CMI obtinguts en *M. vaccae* llis i rugós en diferents antibiòtics

Antibiòtic	CMI
Gm	5 µg/ml
Km	20 µg/ml
Sm	5 µg/ml
Hyg	50 µg/ml

### D.8.1.3. Estudi del percentatge de reversió de llis a rugós de les colònies de *M. vaccae* llis i del percentatge de reversió de rugós a llis de les colònies de *M. vaccae* rugós

Es va determinar el percentatge de reversió de les diferents morfologies colonials després d'analitzar més de 7.000 colònies per a cada morfologia. Per a *M. vaccae* llis es van obtenir 11 colònies de morfologia rugosa, sent el valor aproximat de reversió de llis a rugós del 0,15 % (1 en  $1,5 \times 10^3$  cèl·lules). En canvi, per a la variant morfològica rugosa no es va obtenir cap colònia de morfologia llisa.

Per tant, segons aquests resultats podem dir que un 0,15 % de les variants llises reverteixen a rugoses, mentre que les variants rugoses no reverteixen a llises.

### D.8.2. Estudi de l'eficiència de transformació de *M. vaccae* llis en diferents plasmidis

Es va determinar la capacitat de transformació, mitjançant electroporació, de *M. vaccae* llis utilitzant els vectors pEZ123 i pSUM36, i utilitzant com a control de la transformació *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

Les eficiències de transformació de *M. vaccae* llis i *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 per a cada plasmidi estudiat es detallen a la taula 9.

Segons els resultat obtinguts en *M. vaccae* llis, podem dir que aquest va ser transformat amb cada un dels vectors utilitzats, encara que l'eficiència de transformació de *M. vaccae* va ser molt inferior que en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, per a tots els vectors estudiats.

**Taula 9.** Eficiències de transformació, per a cada vector, calculades a partir de les cfu crescudes en les plaques TSA amb l'antibiòtic corresponent. Els valors s'expressen com a cfu/ $\mu$ g de ADN del vector i son com a resultat de la mitjana de dues electroporacions independents.

Vector	<i>M. vaccae</i> llis	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155
pEZ123	$3,49 \times 10^2$	$1,19 \times 10^4$
pSUM36	$6,38 \times 10^2$	$5,25 \times 10^4$

#### D.8.2.4. Anàlisi de la presència dels diferents plasmidis electroporats en *M. vaccae* llis mitjançant PCR

Del total de colònies de *M. vaccae* llis crescudes en presència dels antibiòtics, després de les electroporacions, es van analitzar 4 colònies per a cada plasmidi estudiat (pEZ123 i pSUM36), mitjançant PCR, per determinar la incorporació dels diferents plasmidis en aquestes colònies.

Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que totes les colònies analitzades van presentar el plasmidi corresponent. Tal com es mostra a la fig. 53, en totes les colònies s'obté l'amplificació, per PCR, d'una única banda i de la mida corresponent al fragment amplificat per a cada plasmidi analitzat.

De les 4 colònies analitzades, es va seleccionar una per a cada plasmidi estudiat les quals van ser guardades a  $-80$  °C, fins a la seva utilització.

#### D.8.2.5. Estudi de l'estabilitat plasmídica

Es va determinar la capacitat de *M. vaccae* llis per mantenir l'expressió del plasmidi pEZ123 al llarg del temps en un medi sense selecció positiva pel plasmidi, medi líquid TSB sense Km.

Els resultat obtinguts al llarg de 12 dies, en els quals es va fer tres inoculacions del cultiu a medi fresc, es detallen a la taula 10.

**Taula 10.** Estabilitat plasmídica del plasmidi pEZ123 en *M. vaccae* llis, després de fer créixer *M. vaccae* llis amb el plasmidi en medi TSB sense Km i posterior sembra del cultiu en medi TSA amb i sense antibiòtic. Els valors obtinguts en les diferents sembres s'expressen com a cfu/ml i són com a resultat de la mitjana de dos estudis independents.

	1er cultiu	2on cultiu	3er cultiu
TSA	$8,95 \times 10^7$	$9,53 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$
TSA + Km (5 $\mu$ g/ml)	$3,11 \times 10^7$	$1,50 \times 10^7$	$7,35 \times 10^5$
% pèrdua plasmidi	65,25	84,26	92,65

Segons aquests resultats, podem dir que l'estabilitat del plasmidi pEZ123 en *M. vaccae* llis va ser molt baixa, sobretot a partir del segon cultiu on el % de colònies que van perdre el plasmidi va ser superior al 80 %. Per tant, per a mantenir i garantir l'expressió del plasmidi en els diferents cultius utilitzats en els següents estudis, va ser imprescindible utilitzar sempre el medi amb l'antibiòtic Km a una concentració de 5 µg/ml.

### **D.8.3. Estudi de la integració del transposó Tngfp del plasmidi pEZ123 en el genoma de *M. vaccae* llis**

Un cop transformat amb èxit *M. vaccae* llis amb el plasmidi pEZ123, es va procedir a la integració del Tngfp, present en el plasmidi, en el genoma de *M. vaccae* llis.

Per fer aquesta integració, es va plaquejar un cultiu TSB+Km (5 µg/ml) de *M. vaccae* llis amb el plasmidi, en diferents medis (TSA, TSA+Km (5 µg/ml), TSA+Gm (20 µg/ml) i TSA+Km (5 µg/ml)+Sac 5%) i a diferents temperatures d'incubació (30 i 39°C), per veure en quines condicions es forçava la integració del Tngfp al genoma de *M. vaccae* llis, a més de l'eliminació del vector pEZ123 de l'interior dels bacils.

Segons els resultats obtinguts, es va determinar que les condicions òptimes perquè es fes la integració del Tngfp en el genoma de *M. vaccae* eren inocular el cultiu en medi TSA+Km (5 µg/ml) i incubar-lo a 39 °C durant 14 dies.

Del total de colònies crescudes en aquestes condicions, es va fer una cerca de colònies rugoses. D'un total aproximat de 8.000 colònies llises, es van obtenir 3 colònies de morfologia rugosa.

De totes les colònies crescudes, es van agafar aleatòriament 13 colònies llises i les 3 colònies rugoses per fer els corresponents estudis per PCR i veure si hi havia integració del Tngfp en el genoma de *M. vaccae* i si el plasmidi era eliminat de *M. vaccae* llis, un cop saltava el Tngfp.

A la fig. 54 es detalla la presència del Tngfp i la no presència del vector pEZ123 en totes les colònies llises i rugoses analitzades i crescudes en les condicions anteriorment detallades.

#### **D.8.3.1. LMPCR**

Es va fer la tècnica LMPCR, amb les 13 colònies llises estudiades a l'apartat anterior, per amplificar la zona del genoma de *M. vaccae* que es trobava flanquejant el Tngfp i determinar si aquesta integració es realitzava de forma aleatòria, en diferents zones del genoma micobacterià.

Mitjançant aquesta tècnica, descrita per Prod'hom i col·laboradors (1998) i posada a punt en *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* i *M. simiae*, no es van obtenir bons resultats en *M. vaccae*.

#### **D.8.4. Construcció d'una llibreria genòmica en *M. vaccae* rugós**

##### **D.8.4.1. Digestió d'ADN mitjançant enzims de restricció**

Es va digerir el plasmidi pSUM36 mitjançant l'enzim de digestió *Bam*HI i es va fer una digestió parcial del genoma de *M. vaccae* llis utilitzant l'enzim *Sau*3A1. Els resultats de les dues digestions es detallen a la fig. 42. De la digestió parcial del genoma de *M. vaccae* llis, es va procedir a treballar només amb els fragments d'una mida entre 2,5 a 5 KB (fig. 55).

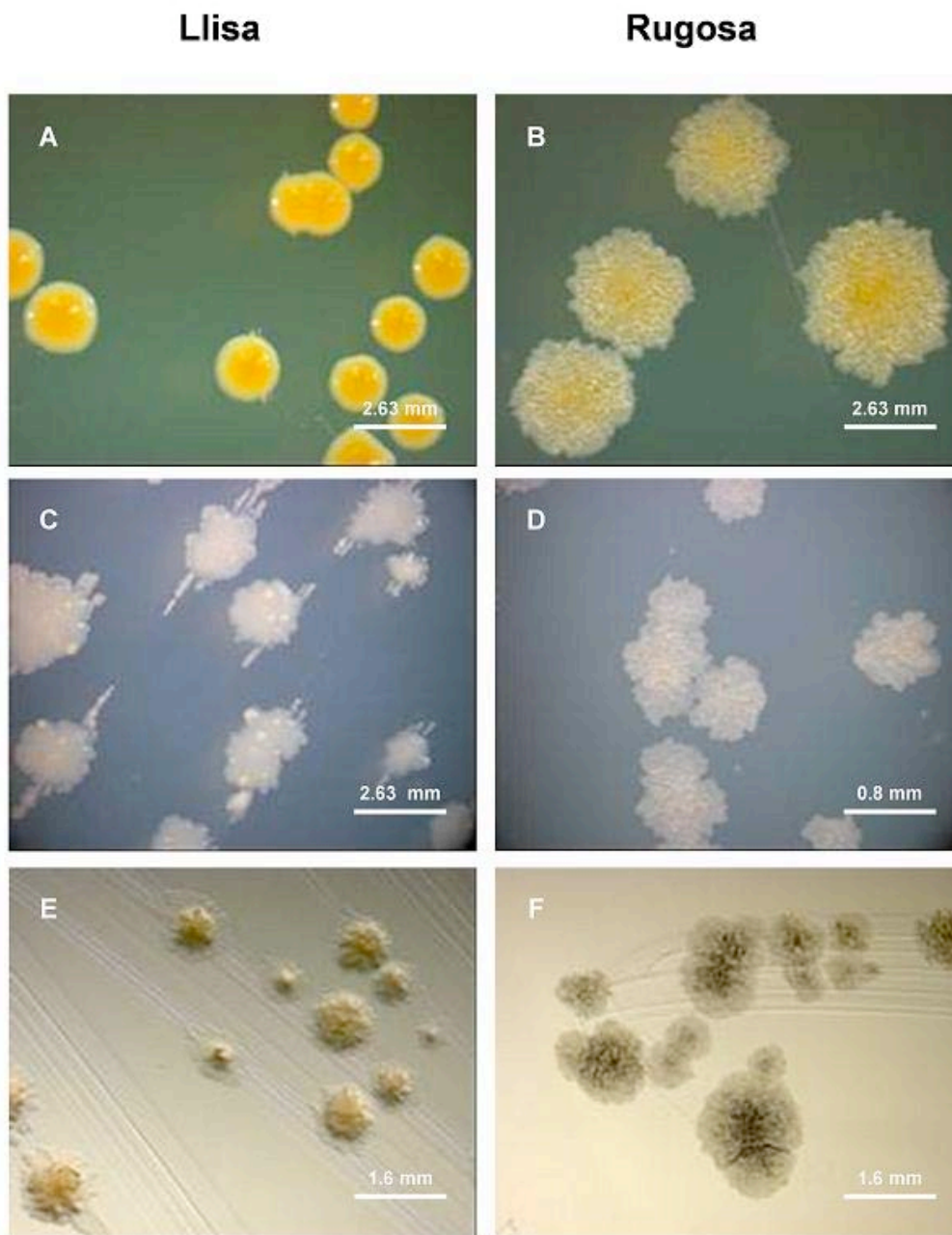
Un cop feta la lligació del plasmidi amb els fragments del genoma de *M. vaccae* llis, es va passar primerament a transformar *E. coli* amb les diferents lligacions per tal de veure l'eficiència de les lligacions i la proporció de vector:fragment d'ADN que donava millors resultats. Es va determinar que la proporció 1:10 (vector:fragment d'ADN) donava una eficiència de lligacions més bona que la resta de proporcions vector:fragment d'ADN.

Amb aquests resultats obtinguts en *E. coli*, es va passar a transformar *M. vaccae* rugós només amb la lligació de proporció 1:10 (vector:fragment ADN).

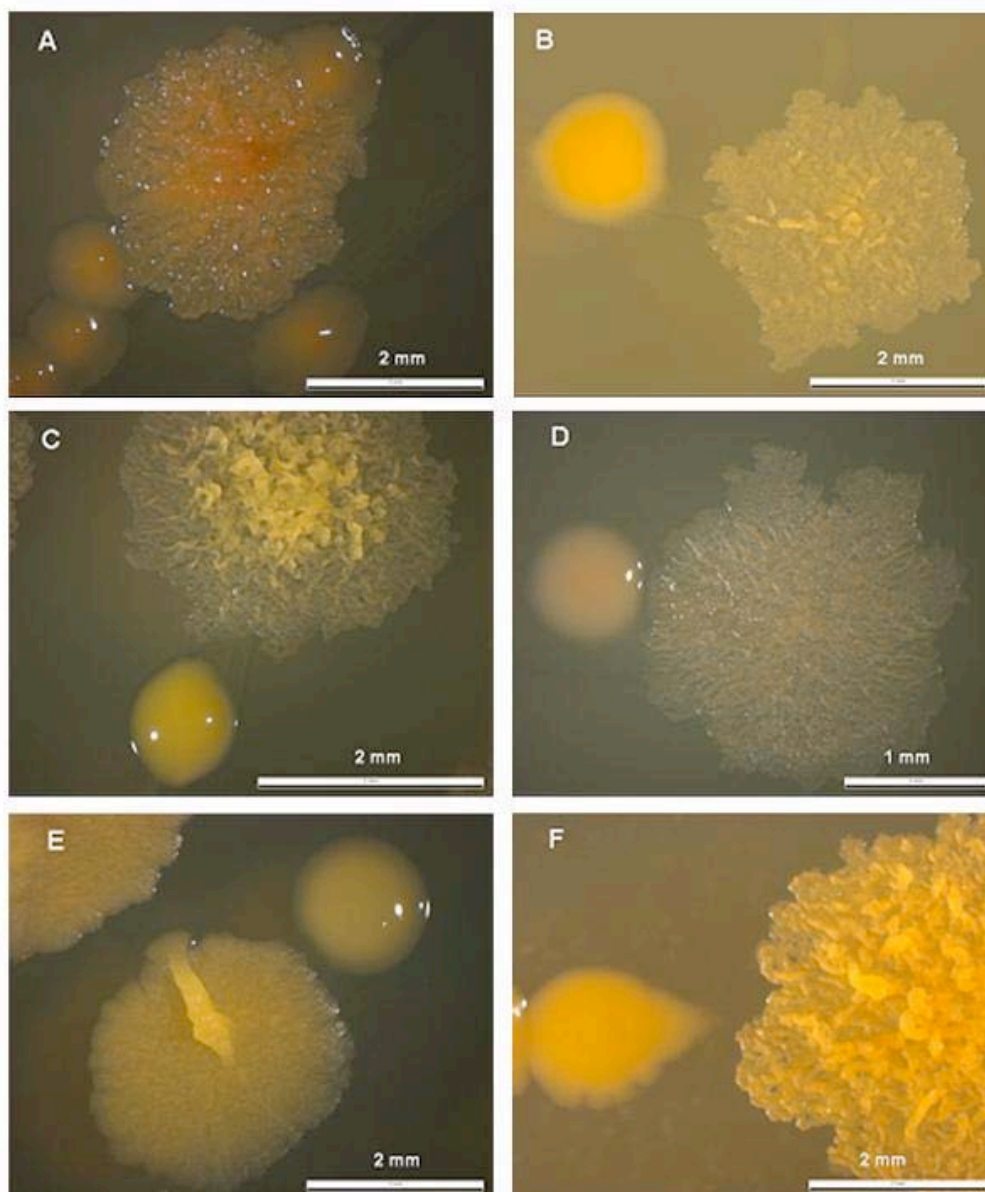
Un cop crescuts els transformants de *M. vaccae* rugós en medi TSA + Km (5 µg/ml) es va procedir a cercar, del total de colònies rugoses obtingudes, colònies de morfologia llisa. D'un total aproximat de 3.000 colònies rugoses crescudes, es van obtenir 4 colònies de morfologia llisa. Aquestes colònies llises es van aïllar i es van guardar en glicerol a -80 °C.



## D.9. Figures resultats

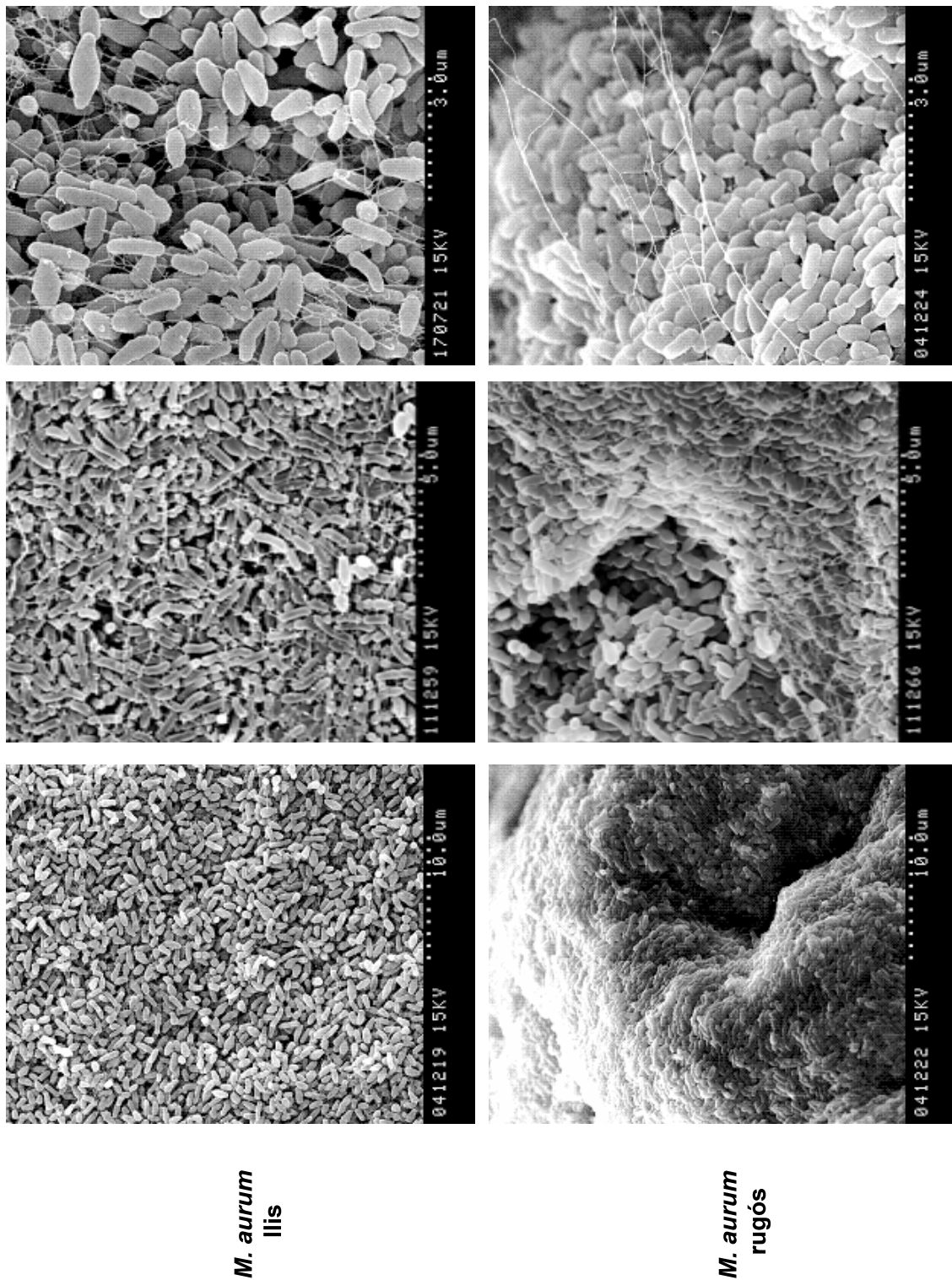


**Figura 14.** Morfologia colonial de les variants llises i rugoses de *M. vaccae* en diferents medis de cultiu: TSA (A, B); Middlebrook 7H10 (C, D) i Sauton (E, F).

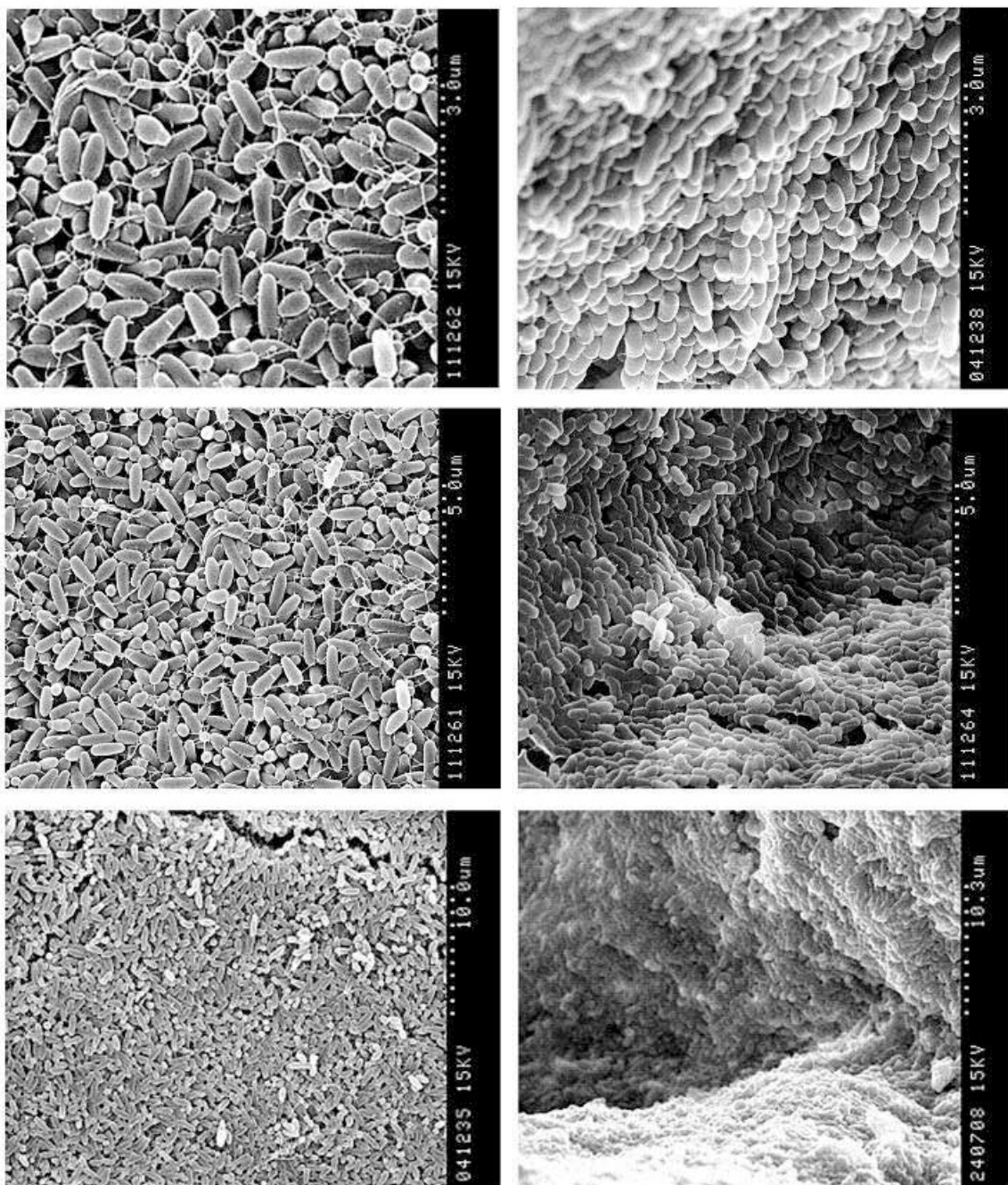


**Figura 15.** Morfologia colonial de les variants morfològiques llises i rugoses en medi TSA de (A) *M. aurum*, (B) *M. chubuense*, (C) *M. gilvum*, (D) *M. obuense*, (E) *M. parafortuitum* i (F) *M. vaccae*.





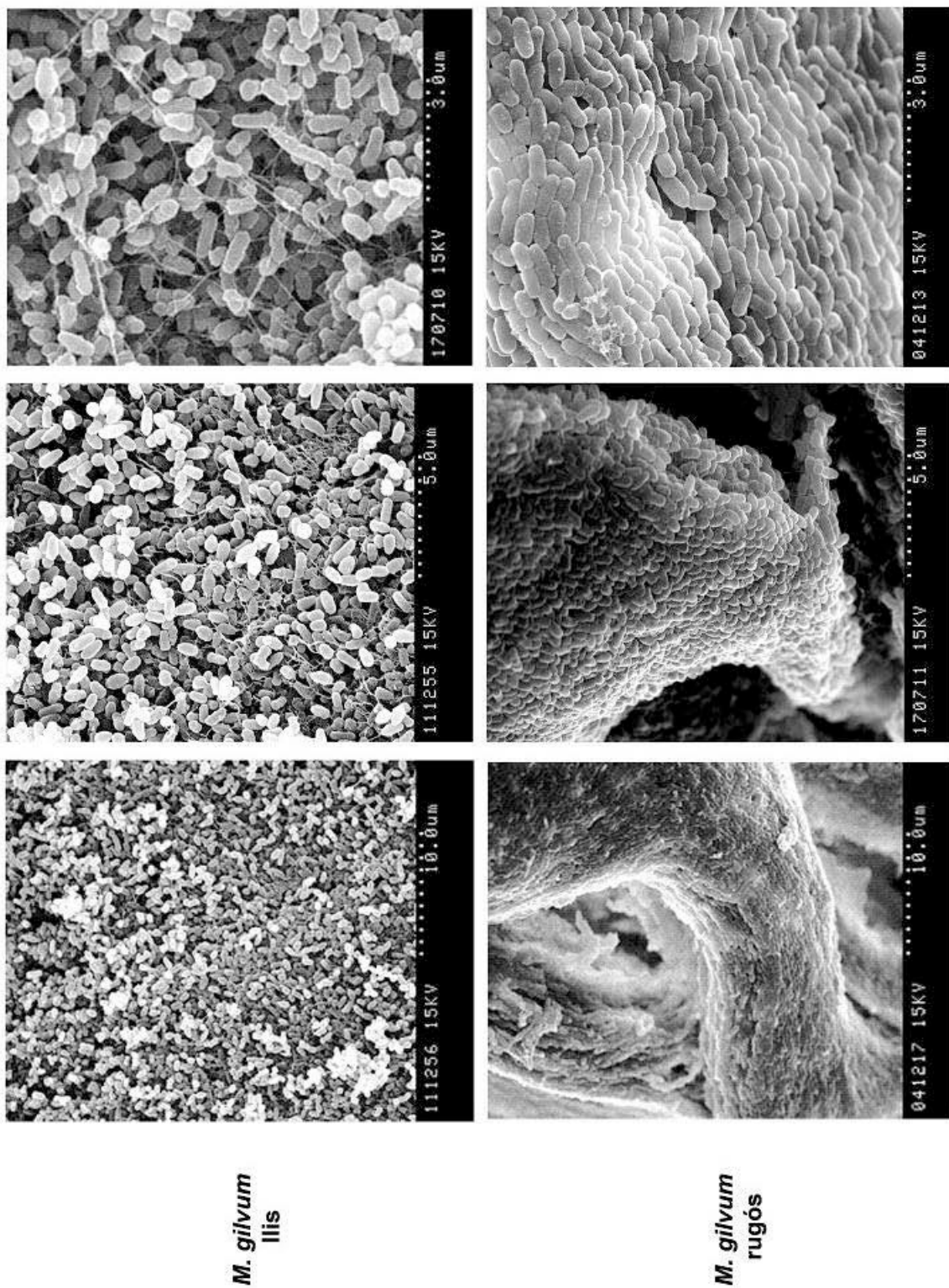
**Figura 16.** Anàlisi per microscopia electrònica de rastreig de les variants llises i rugoses de *M. aurum*.



*M. chubuense*  
llis

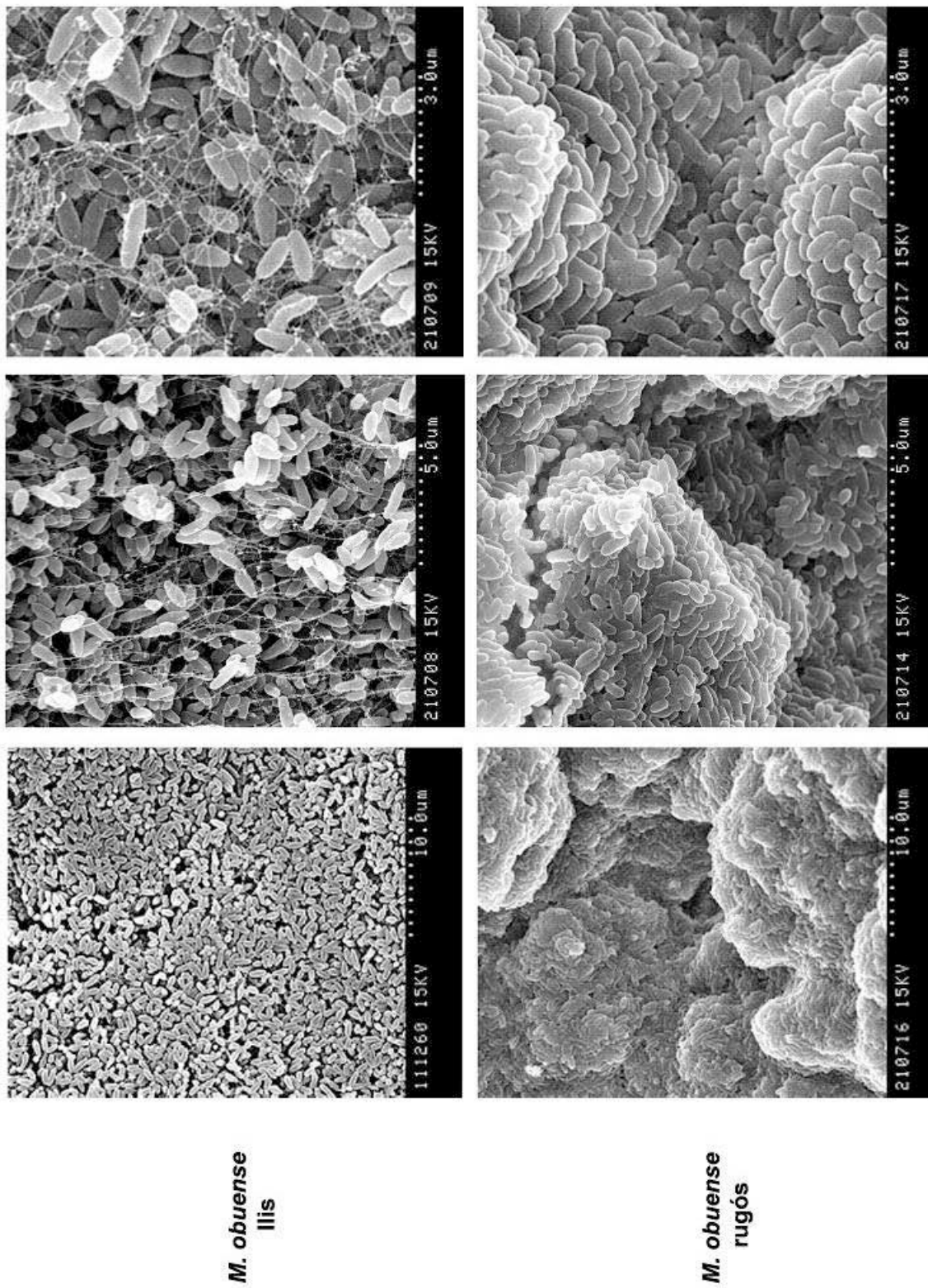
*M. chubuense*  
rugós

**Figura 17.** Anàlisi per microscopia electrònica de rastreig de les variants llises i rugoses de *M. chubuense*.

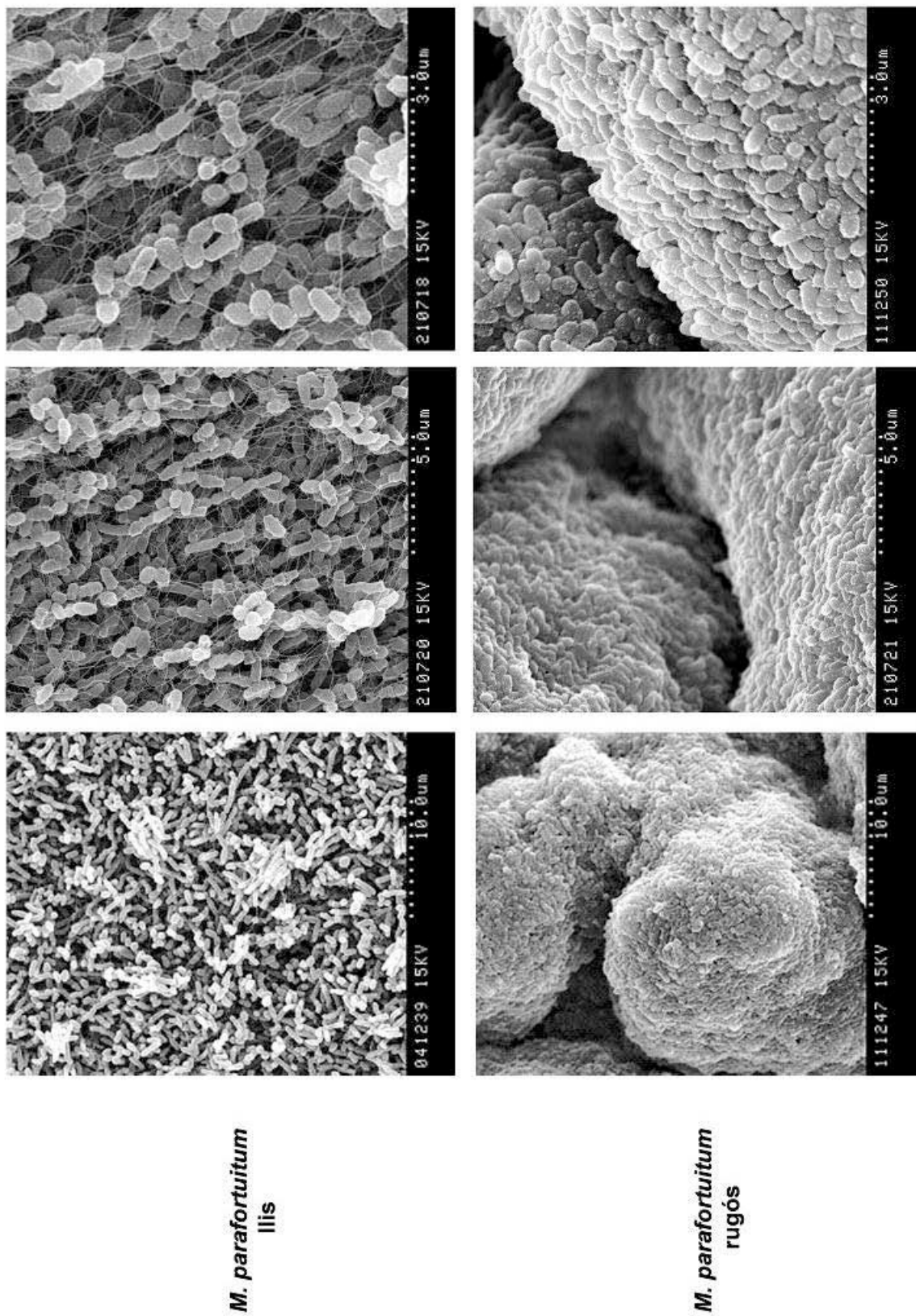


**Figura 18.** Anàlisi per microscopia electrònica de rastreig de les variants llises i rugoses de *M. gilvum*.

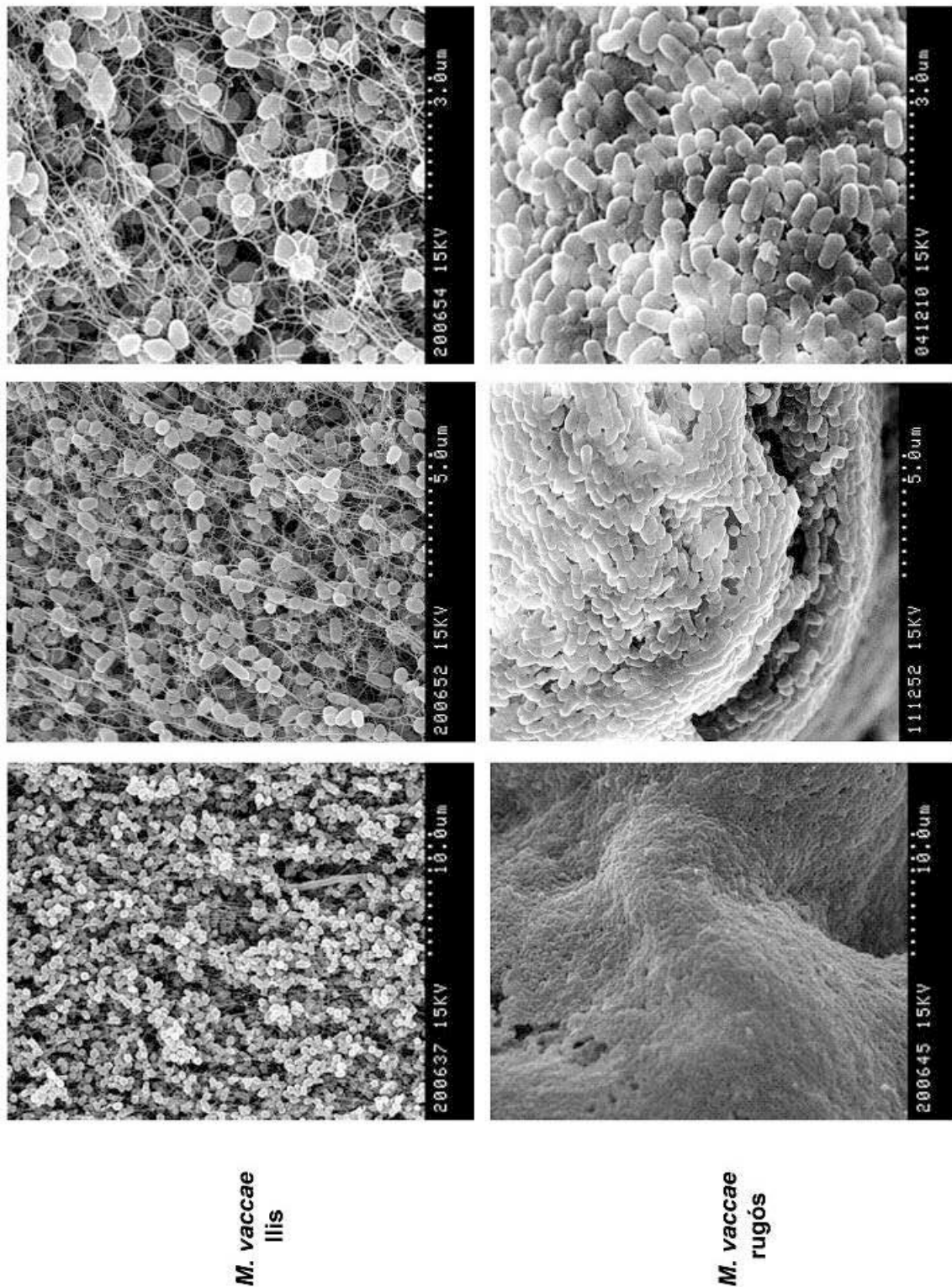




**Figura 19.** Anàlisi per microscopia electrònica de rastreig de les variants llises i rugoses de *M. obuense*.

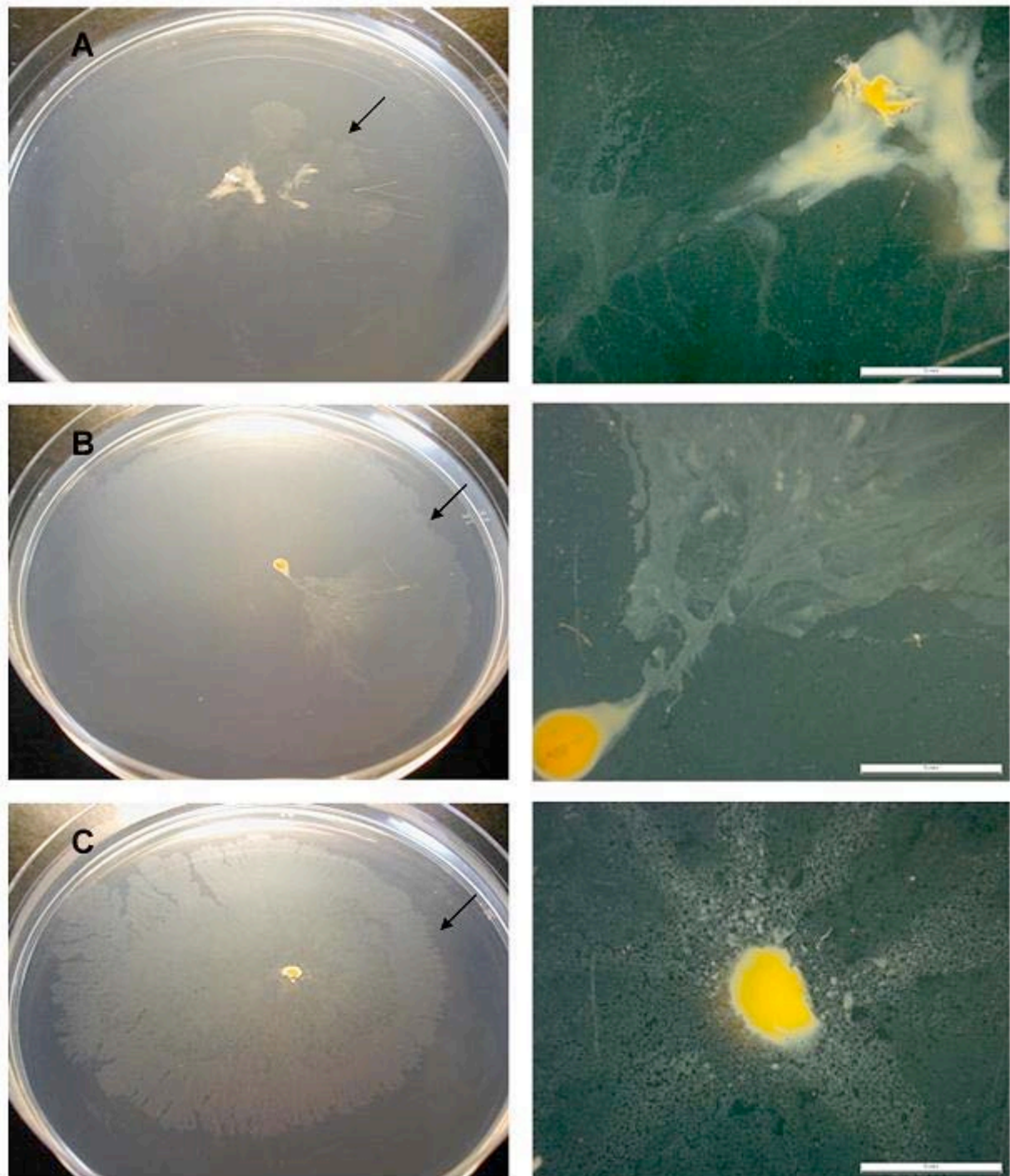


**Figura 20.** Anàlisi per microscopia electrònica de rastreig de les variants llises i rugoses de *M. parafortuitum*.

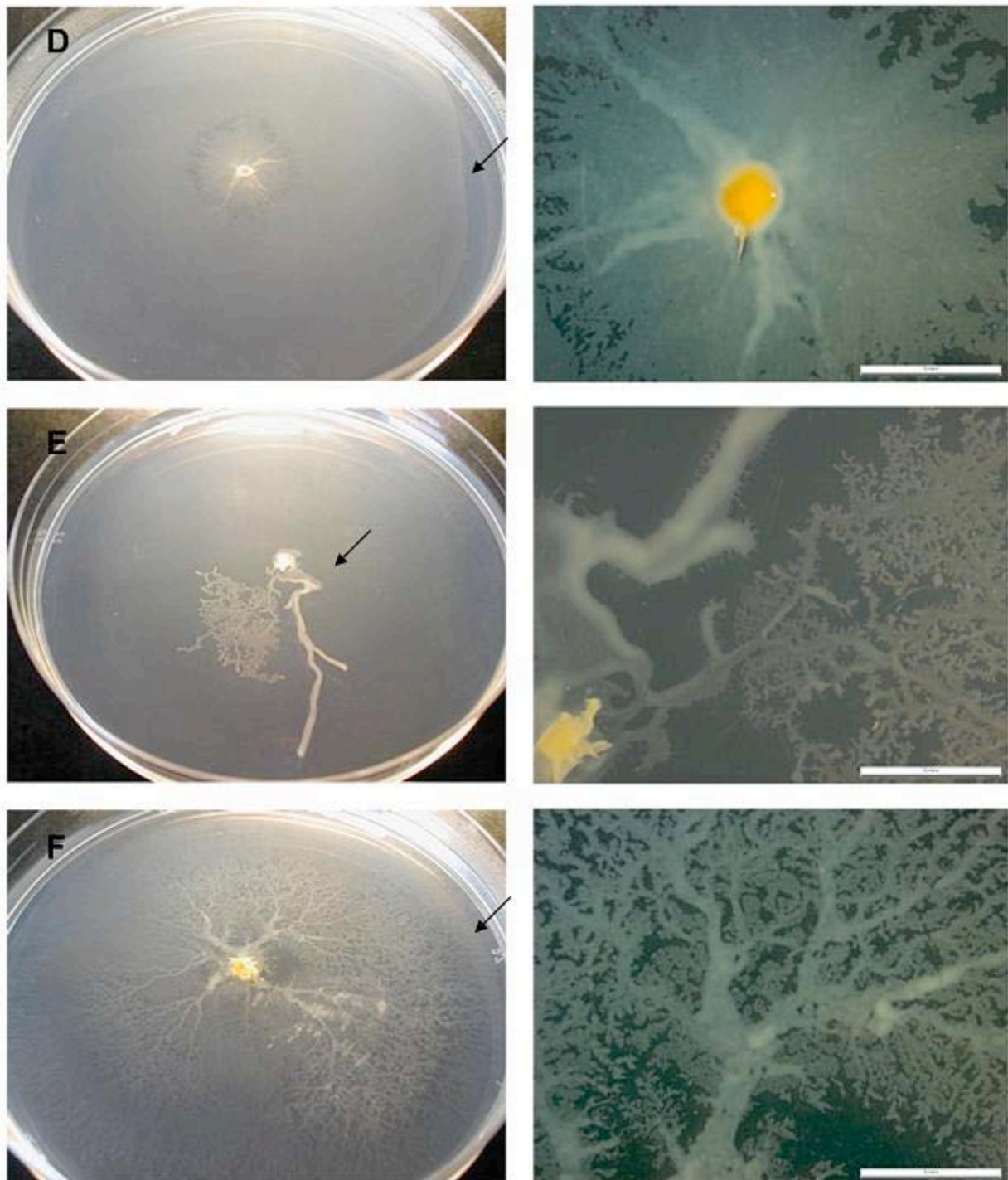


**Figura 21.** Anàlisi per microscopia electrònica de rastreig de les variants llises i rugoses de *M. vaccae*.



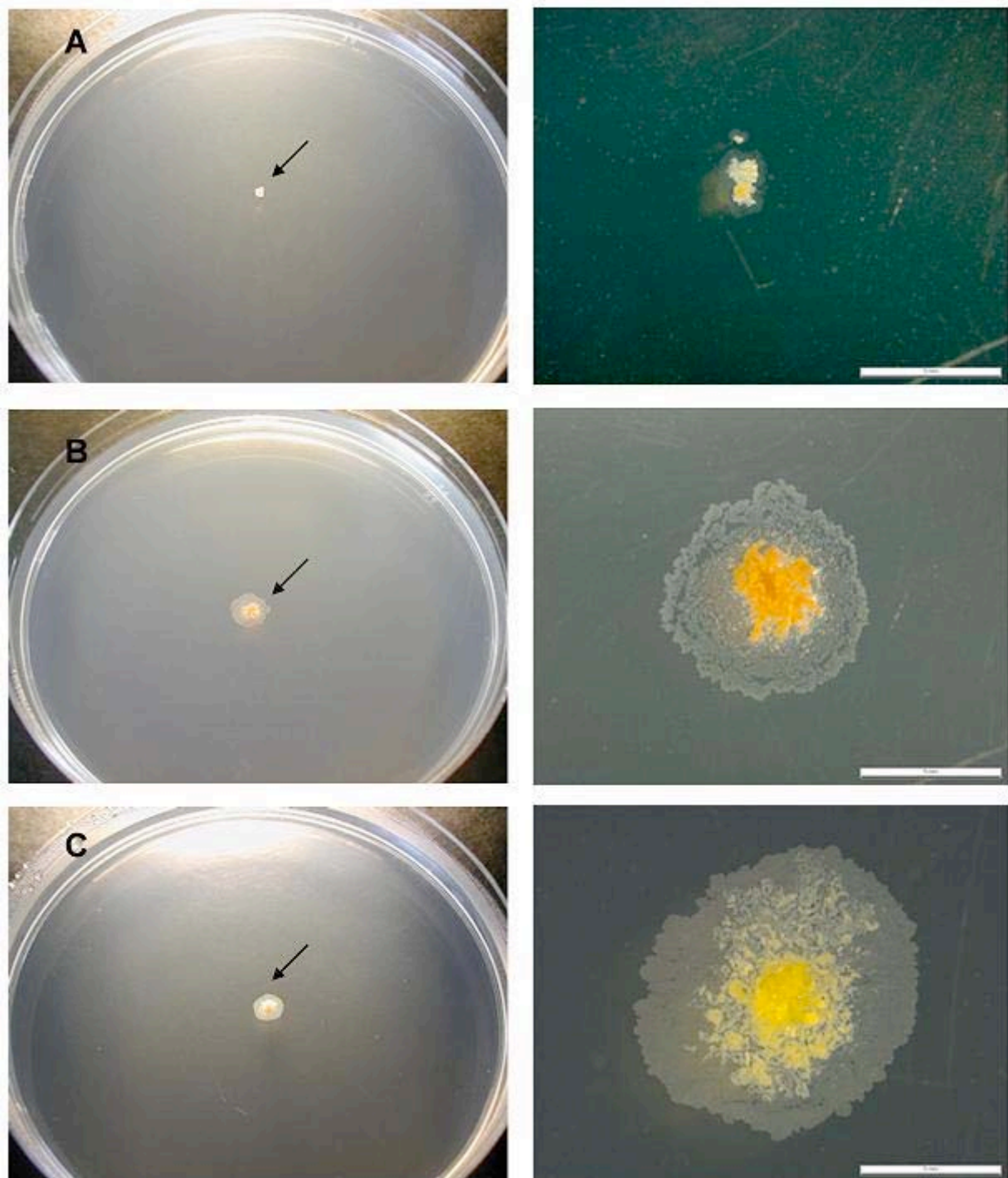


**Figura 22.** Mobilitat de les colònies de morfologia llisa en medi 7H9+0,3 % d'agarosa després de 6 dies de creixement. (A) *M. aurum*, (B) *M. chubuense*, (C) *M. gilvum*. Les sagetes indiquen el marge exterior de les colònies. La columna de la dreta mostra les imatges obtingudes mitjançant lupa estereoscòpica.

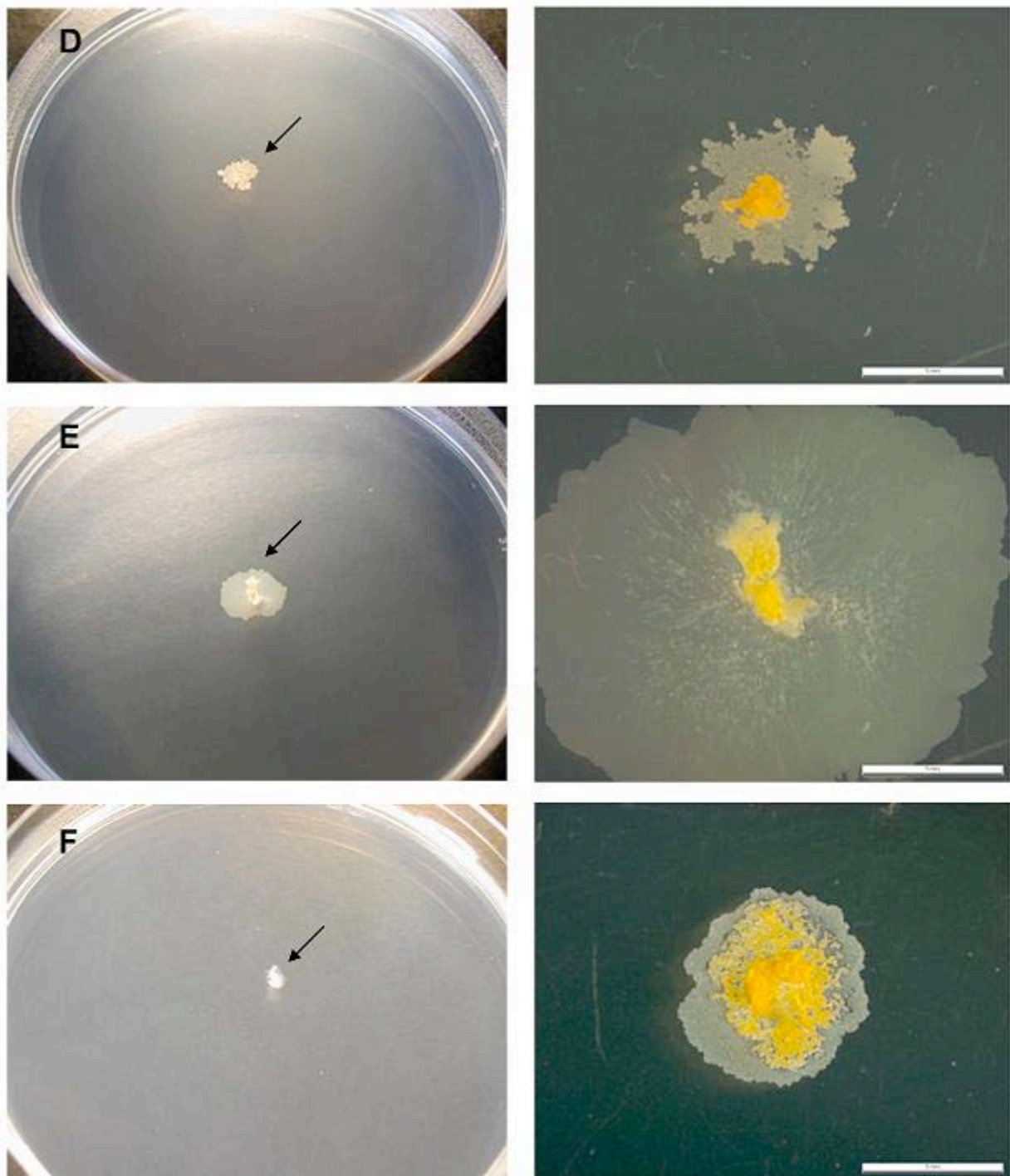


**Figura 23.** Mobilitat de les colònies de morfologia llisa en medi 7H9+0,3 % d'agarosa després de 6 dies de creixement. (D) *M. obuense*, (E) *M. parafortuitum* i (F) *M. vaccae*. Les sagetes indiquen el marge exterior de les colònies. La columna de la dreta mostra les imatges obtingudes mitjançant lupa estereoscòpica.

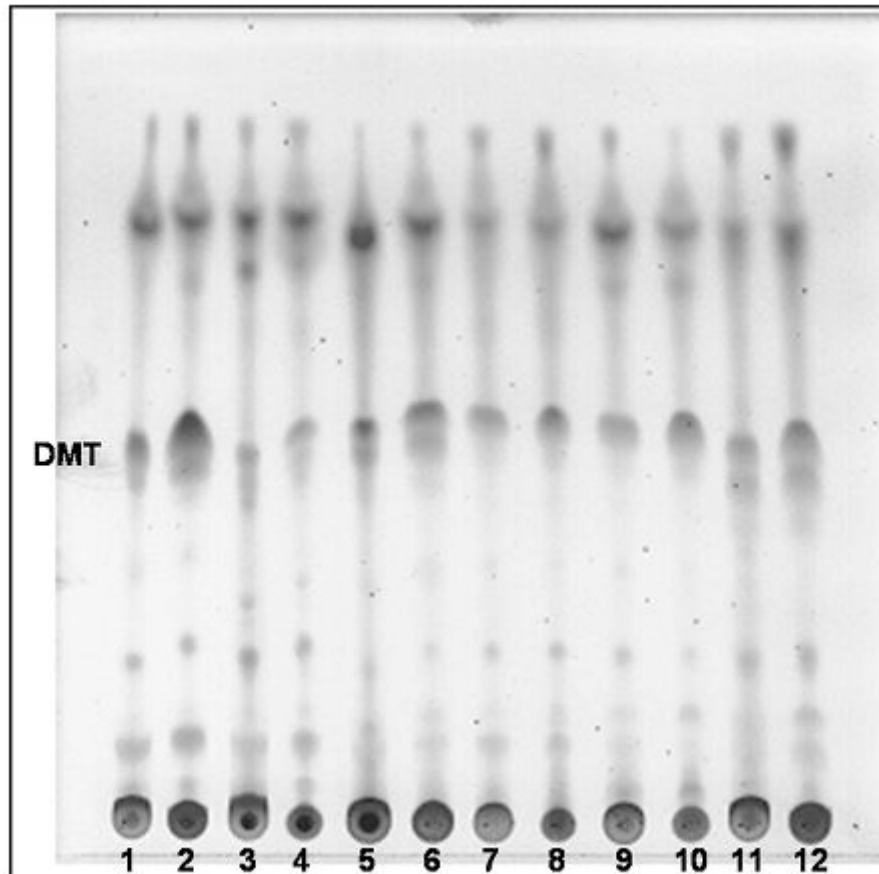




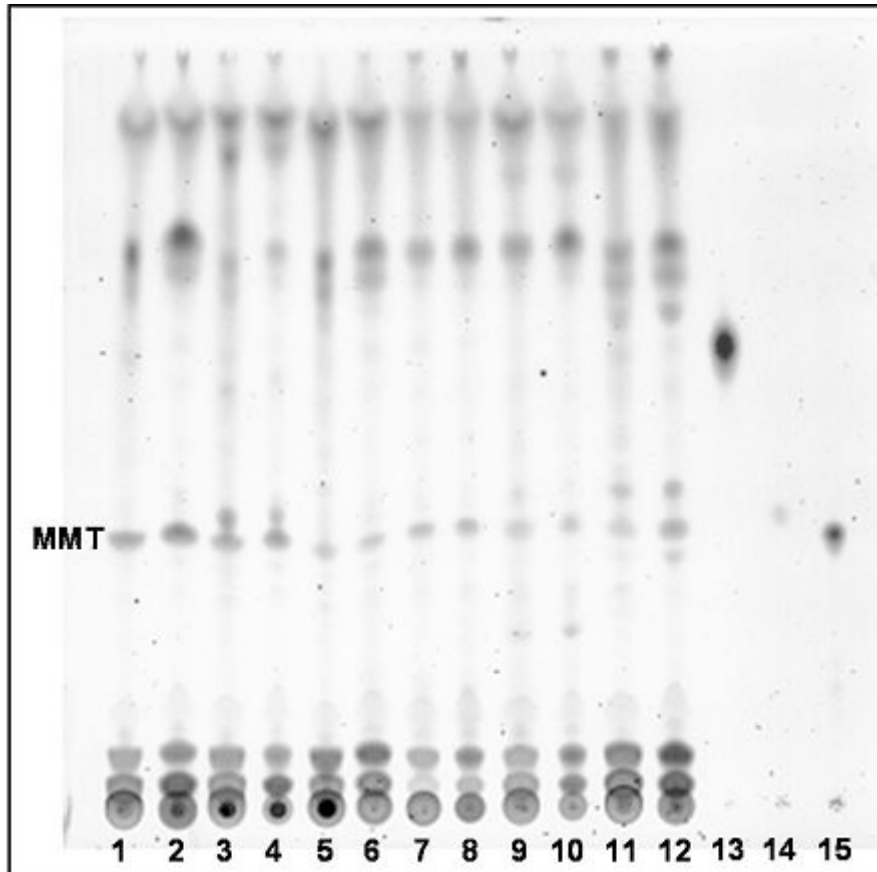
**Figura 24.** Mobilitat de les colònies de morfologia rugosa en medi 7H9+0,3 % d'agarosa al cap de 6 dies de creixement. (A) *M. aurum*, (B) *M. chubuense*, (C) *M. gilvum*. Les sagetes indiquen el marge exterior de les colònies. La columna de la dreta mostra les imatges obtingudes mitjançant lupa estereoscòpica.



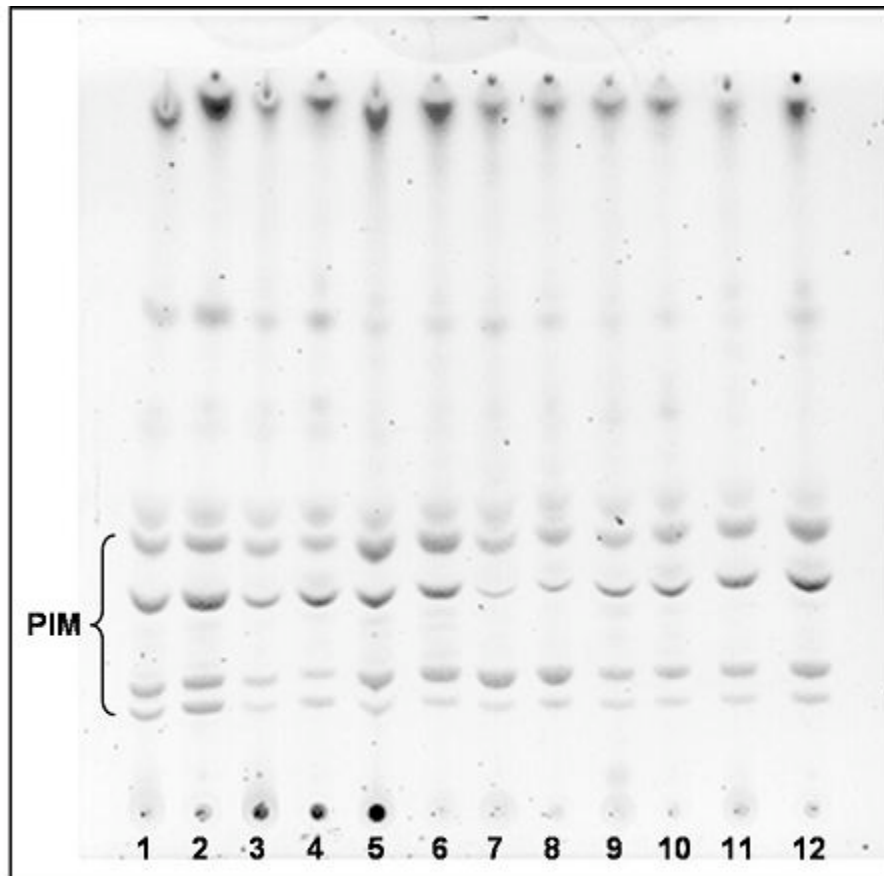
**Figura 25.** Mobilitat de les colònies de morfologia rugosa en medi 7H9+0,3 % d'agarosa després de 6 dies de creixement. (D) *M. obuense*, (E) *M. parafortuitum* i (F) *M. vaccae*. Les sagetes indiquen el marge exterior de les colònies. La columna de la dreta mostra les imatges obtingudes mitjançant lupa estereoscòpica.



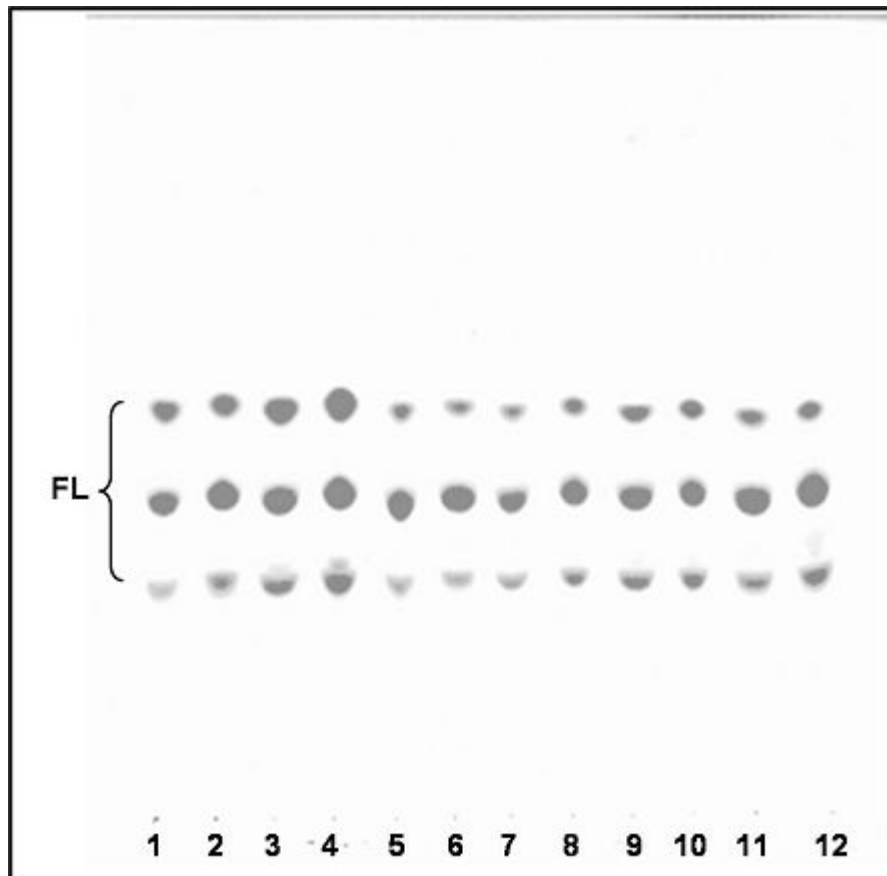
**Figura 26.** Cromatografia en capa fina de l'extracte cru de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4), *M. aurum* NCTC 10437<sup>T</sup> llis (5) i rugós (6), *M. obuense* ATCC 27023<sup>T</sup> llis (7) i rugós (8), *M. chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup> llis (9) i rugós (10) i *M. parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> llis (11) i rugós (12). Sistema d'elució, 85:15 (v:v) cloroform:metanol. Placa cromatogràfica revelada amb antrona a l'1 % en àcid sulfúric (p:v). DMT: Dimicolat de trealosa



**Figura 27.** Cromatografia en capa fina de l'extracte cru de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4), *M. aurum* NCTC 10437<sup>T</sup> llis (5) i rugós (6), *M. obuense* ATCC 27023<sup>T</sup> llis (7) i rugós (8), *M. chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup> llis (9) i rugós (10) i *M. parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> llis (11) i rugós (12). Triaciltrealosa (13), monomicolat de trealosa (14) i diaciltrealosa (15) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Sistema d'elució, 30:8:1 (v:v:v) cloroform:metanol:aigua. Placa cromatogràfica revelada amb antraona a l'1 % en àcid sulfúric (p:v). MMT: Monomicolat de trealosa.

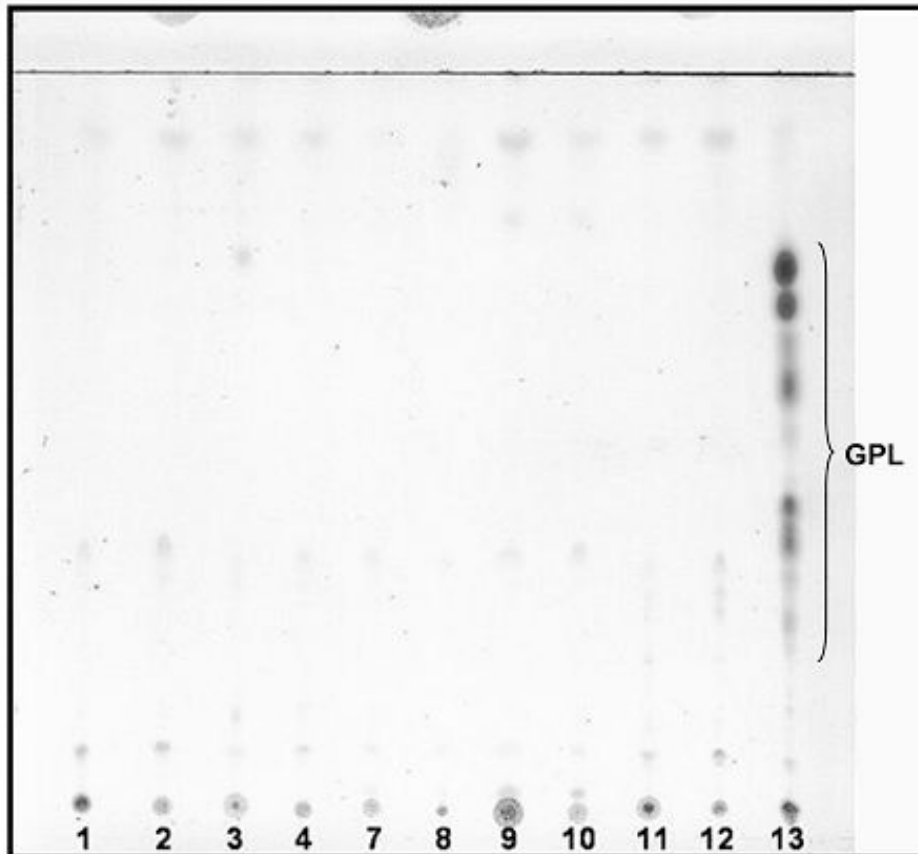


**Figura 28.** Cromatografia en capa fina de l'extracte cru de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4), *M. aurum* NCTC 10437<sup>T</sup> llis (5) i rugós (6), *M. obuense* ATCC 27023<sup>T</sup> llis (7) i rugós (8), *M. chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup> llis (9) i rugós (10) i *M. parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> llis (11) i rugós (12). Sistema d'elució, 60:35:8 (v:v:v) cloroform:metanol:aigua. Placa cromatogràfica revelada amb antrona a l'1 % en àcid sulfúric (p:v). PIM: Fosfatidilinositolmanòsids.

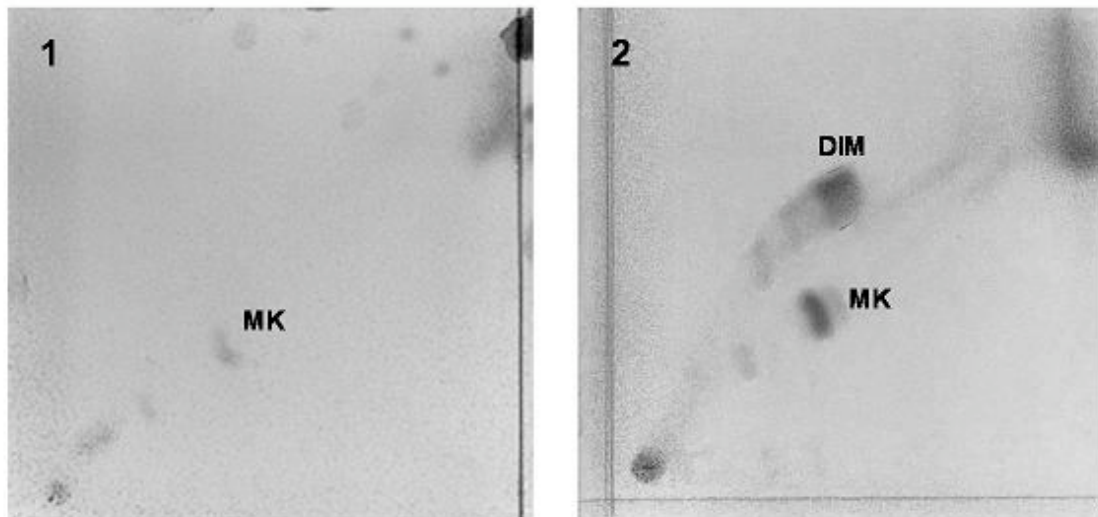


**Figura 29.** Cromatografia en capa fina de l'extracte cru de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4), *M. aurum* NCTC 10437<sup>T</sup> llis (5) i rugós (6), *M. obuense* ATCC 27023<sup>T</sup> llis (7) i rugós (8), *M. chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup> llis (9) i rugós (10) i *M. parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> llis (11) i rugós (12). Sistema d'elució 60:35:8 (v:v:v) cloroform:metanol:aigua. Placa cromatogràfica revelada amb Dittmer. FL: Fosfolípids.



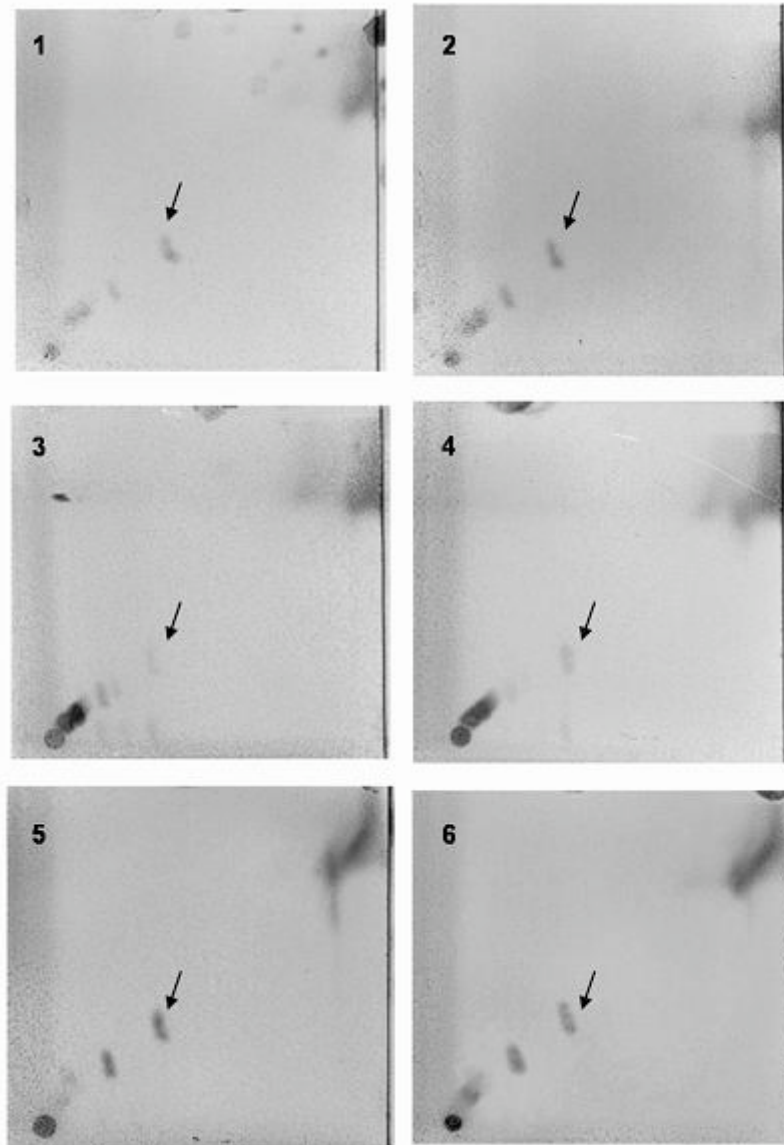


**Figura 30.** Cromatografia en capa fina de l'extracte cru de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4), *M. obuense* ATCC 27023<sup>T</sup> llis (7) i rugós (8), *M. chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup> llis (9) i rugós (10) i *M. parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> llis (11) i rugós (12). GPL de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (13). Sistema d'elució, 90:10:1 (v:v:v) cloroform:metanol:aigua. Placa cromatogràfica revelada amb antrona l'1 % en àcid sulfúric (p.v).

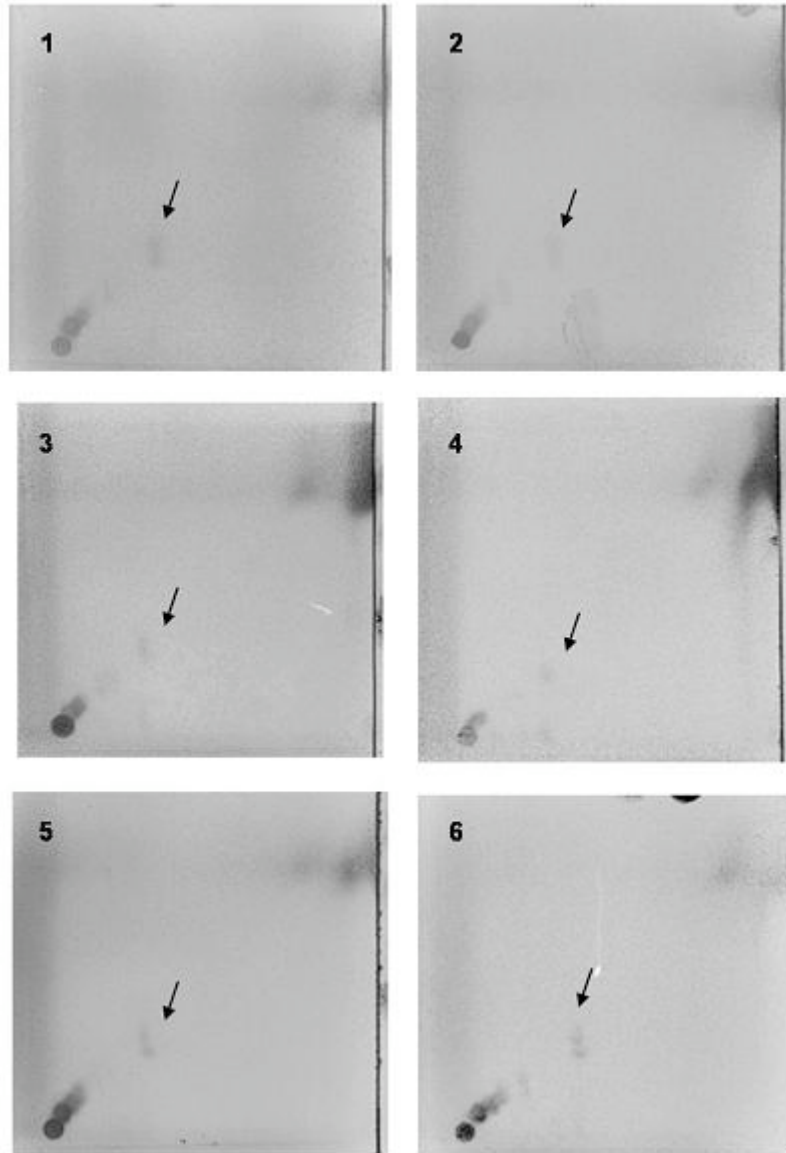


**Figura 31.** Patró de menaquinones (MK) i dimicocerosats de tiocerol (DIM) de les soques: *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> lliis (1) i *M. tuberculosis* H37Rv (2). Sistema d'elució, èter de petroli: acetat d'etil (98:2, v:v), tres cops i, èter de petroli: acetona (98:2, v:v), un cop. Placa cromatogràfica revelada amb àcid fosfomolibdic al 10 % (p:v) en etanol.

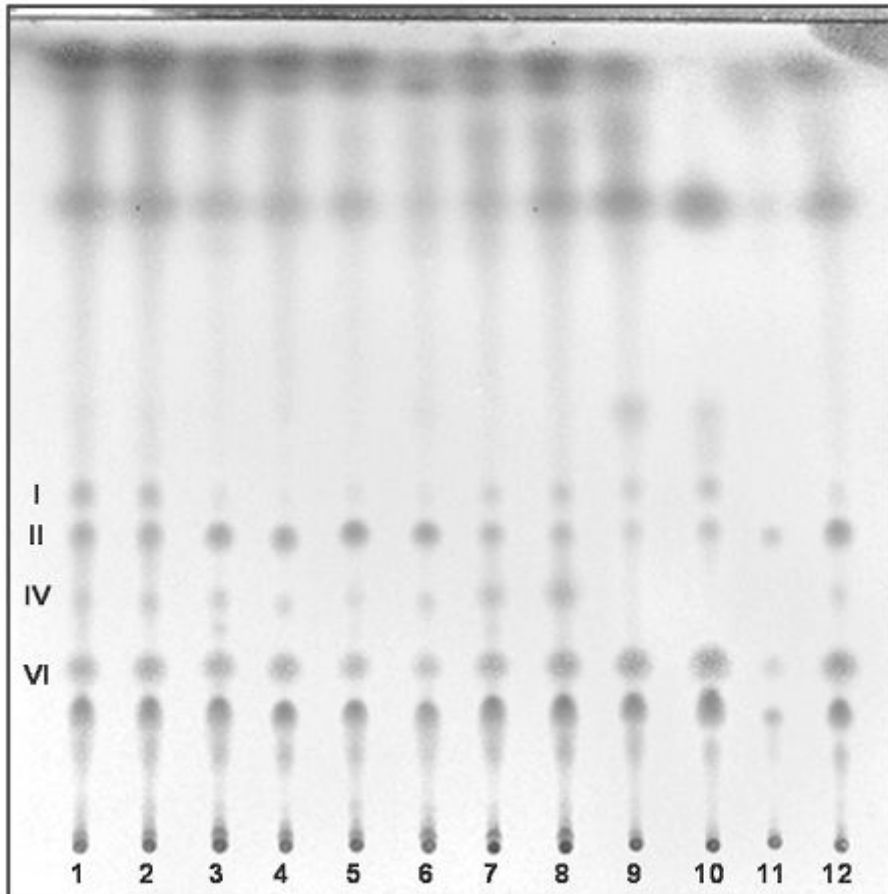




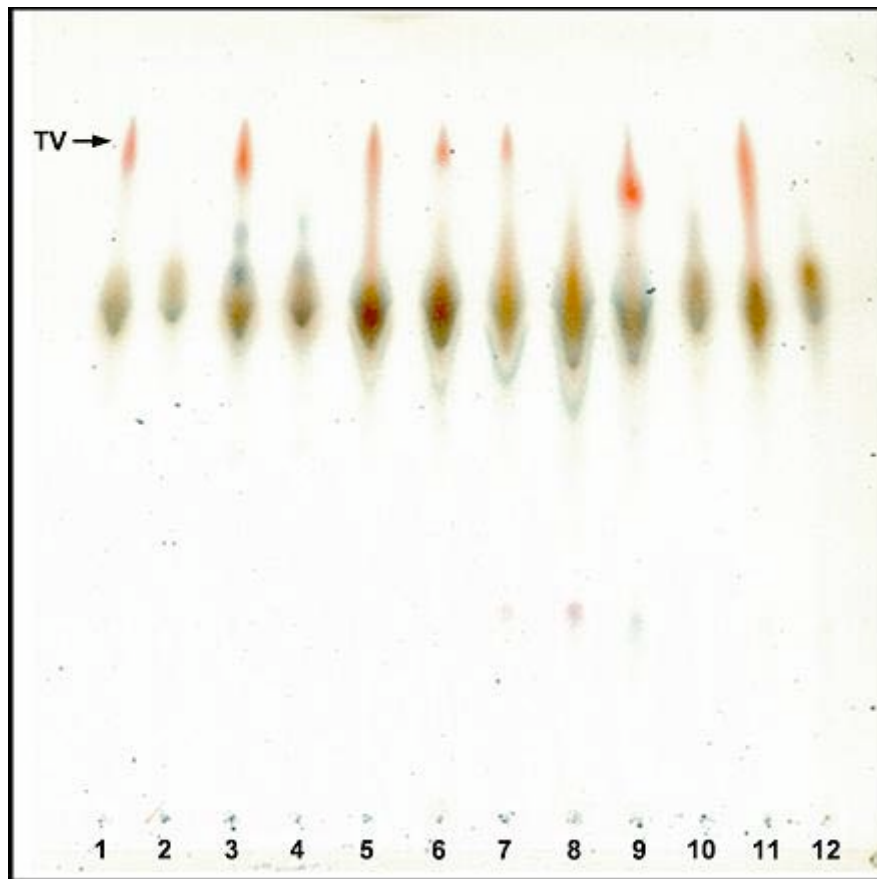
**Figura 32.** Patró de menaquinones (MK) i dimicocerosats de tiocerol (DIM) de les soques: *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4) i *M. aurum* NCTC<sup>T</sup> 10437 llis (5) i rugós (6). Sistema d'elució, èter de petroli: acetat d'etil (98:2, v:v) tres cops i èter de petroli: acetona (98:2, v:v) un cop. Placa cromatogràfica revelada amb àcid fosfomolibdic al 10 % (p:v) en etanol. Les sagetes indiquen traces de compostos que migren de forma similar a les MK. No s'observa cap taca que migri de forma similar o igual que els DIM.



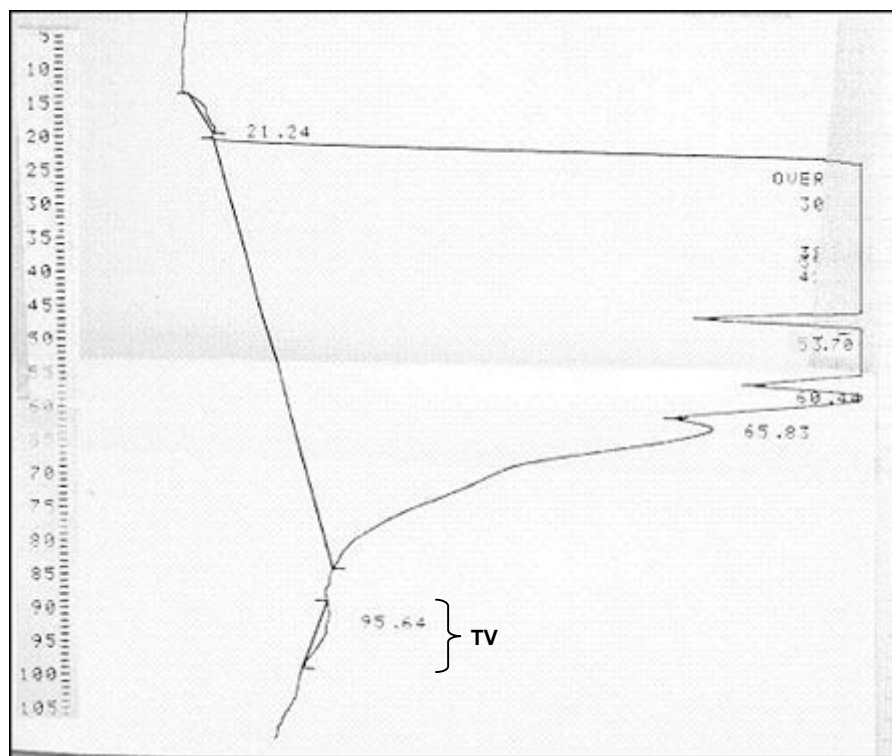
**Figura 33.** Patró de menaquinones (MK) i dimicocerosats de tiocerol (DIM) de les soques: *M. obuense* ATCC<sup>T</sup> 27023 llis (1) i rugós (2), *M. chubuense* ATCC<sup>T</sup> 27278 llis (3) i rugós (4) i *M. parafortuitum* ATCC<sup>T</sup> 19686 llis (5) i rugós (6). Sistema d'elució, èter de petroli: acetat d'etil (98:2, v:v) tres cops i èter de petroli: acetona (98:2, v:v) un cop. Placa cromatogràfica revelada amb àcid fosfomolibdic al 10 % (p:v) en etanol. Les sagetes indiquen traces de compostos que migren de forma similar a les MK. No s'observa cap taca que migri de forma similar o igual que els DIM.



**Figura 34.** Patró d'àcids micòlics de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4), *M. aurum* NCTC 10437<sup>T</sup> llis (5) i rugós (6), *M. obuense* ATCC 27023<sup>T</sup> llis (7) i rugós (8), *M. chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup> llis (9) i rugós (10) i *M. parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> llis (11) i rugós (12). Sistema d'elució, hexà:èter etílic (85:15, v:v), tres cops. Placa cromatogràfica revelada amb àcid fosfomolibdic al 10 % (p:v) en etanol. I,  $\alpha$ -micolat; II,  $\alpha'$ -micolat; IV, cetomicolat; VI, dicarboxi-micolat.



**Figura 35.** Cromatografia en capa fina de l'extracte cru de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> llis (1) i rugós (2), *M. gilvum* DSM 43547 llis (3) i rugós (4), *M. aurum* NCTC 10437<sup>T</sup> llis (5) i rugós (6), *M. obuense* ATCC 27023<sup>T</sup> llis (7) i rugós (8), *M. chubuense* ATCC 27278<sup>T</sup> llis (9) i rugós (10) i *M. parafortuitum* ATCC 19686<sup>T</sup> llis (11) i rugós (12). Sistema d'elució 90:10 (v:v) metanol:cloroform. Placa cromatogràfica revelada amb antrona a l'1 % en àcid sulfúric (p:v). TV: taca vermella.



**Figura 36.** Espectre d'elució de l'extracte cru de *M. vaccae* en l'HPLC obtingut mitjançant un detector d'absorbàncies. La sageta indica les fraccions on s'elueix la TV.

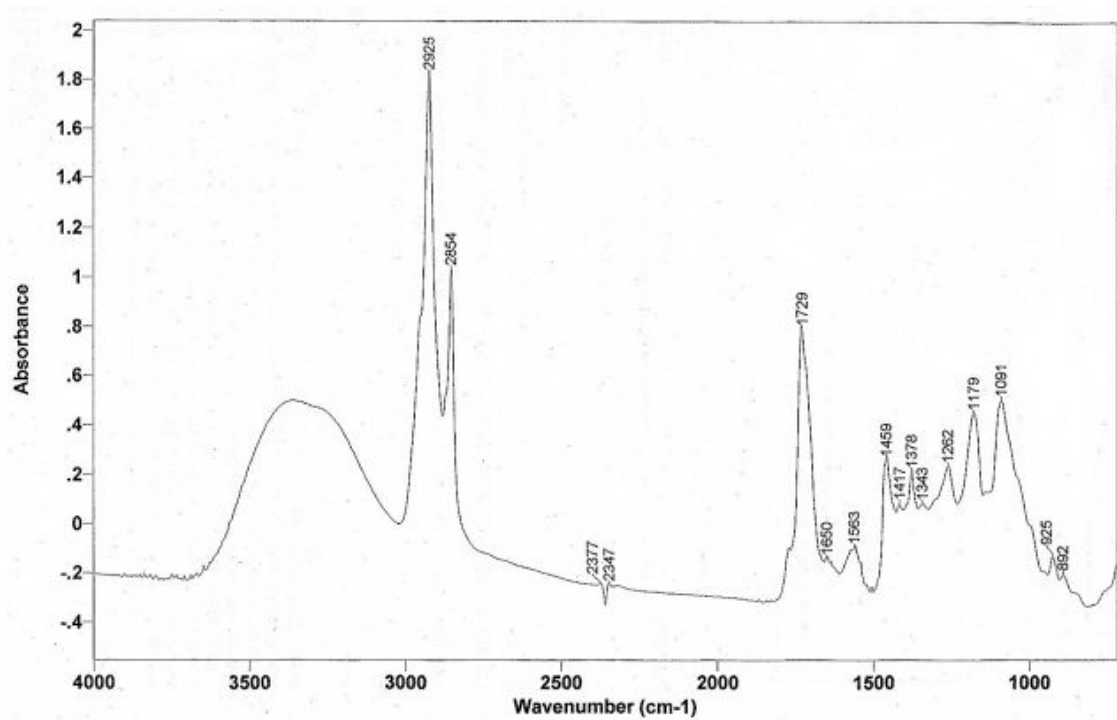
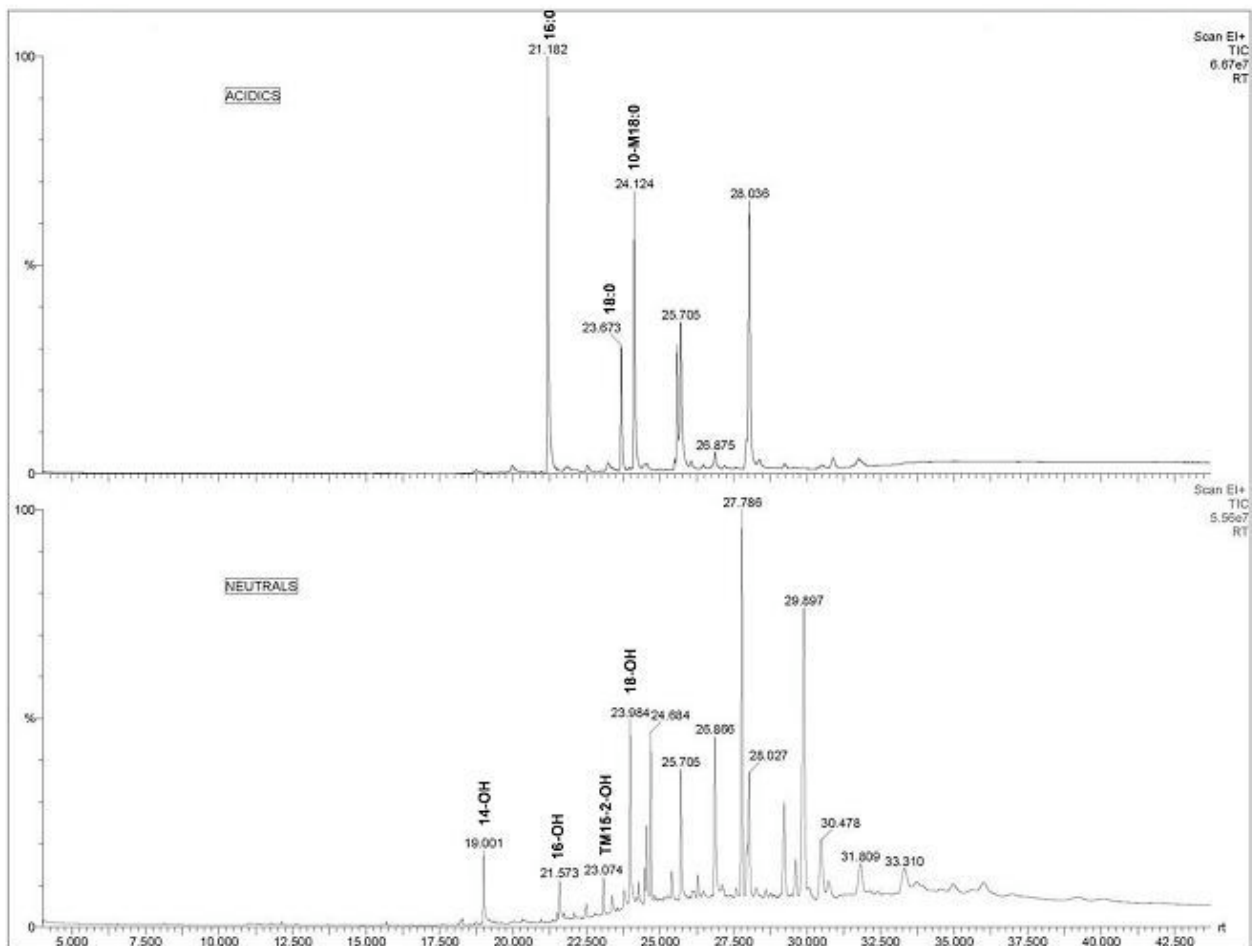
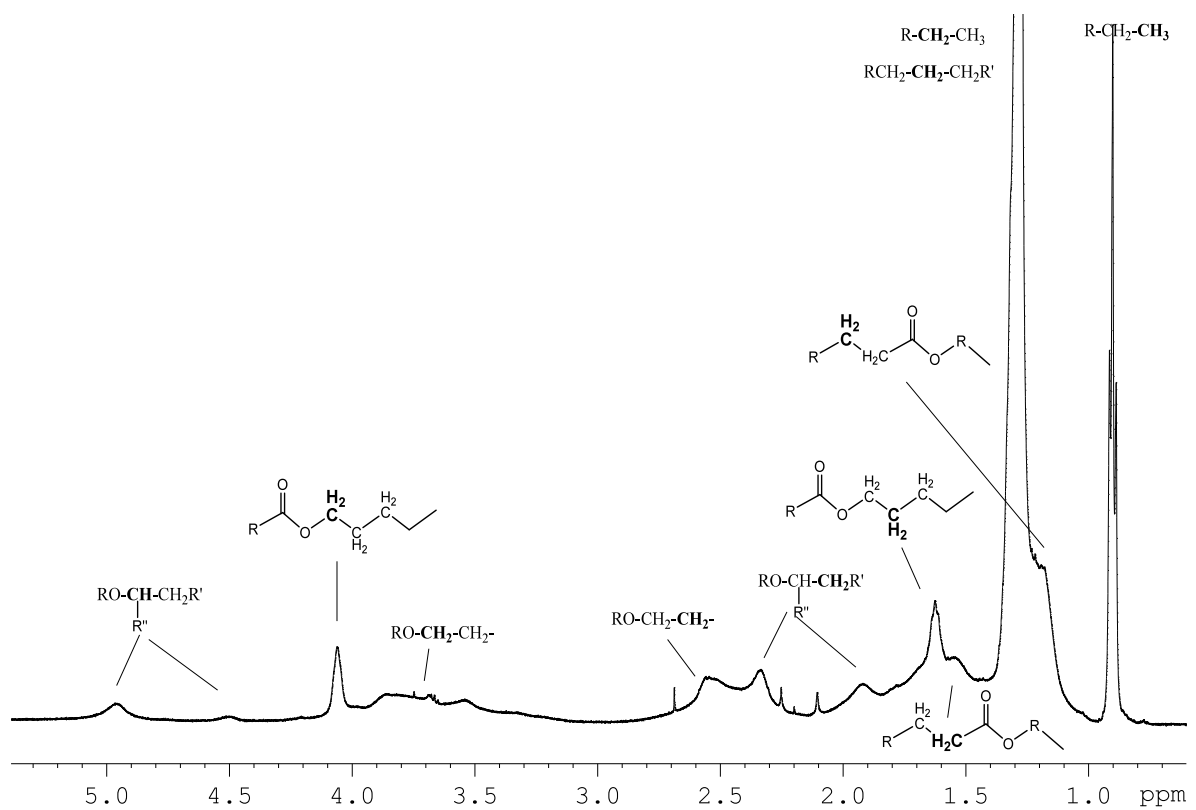


Figura 37. Espectre d'infraroig de la TV.

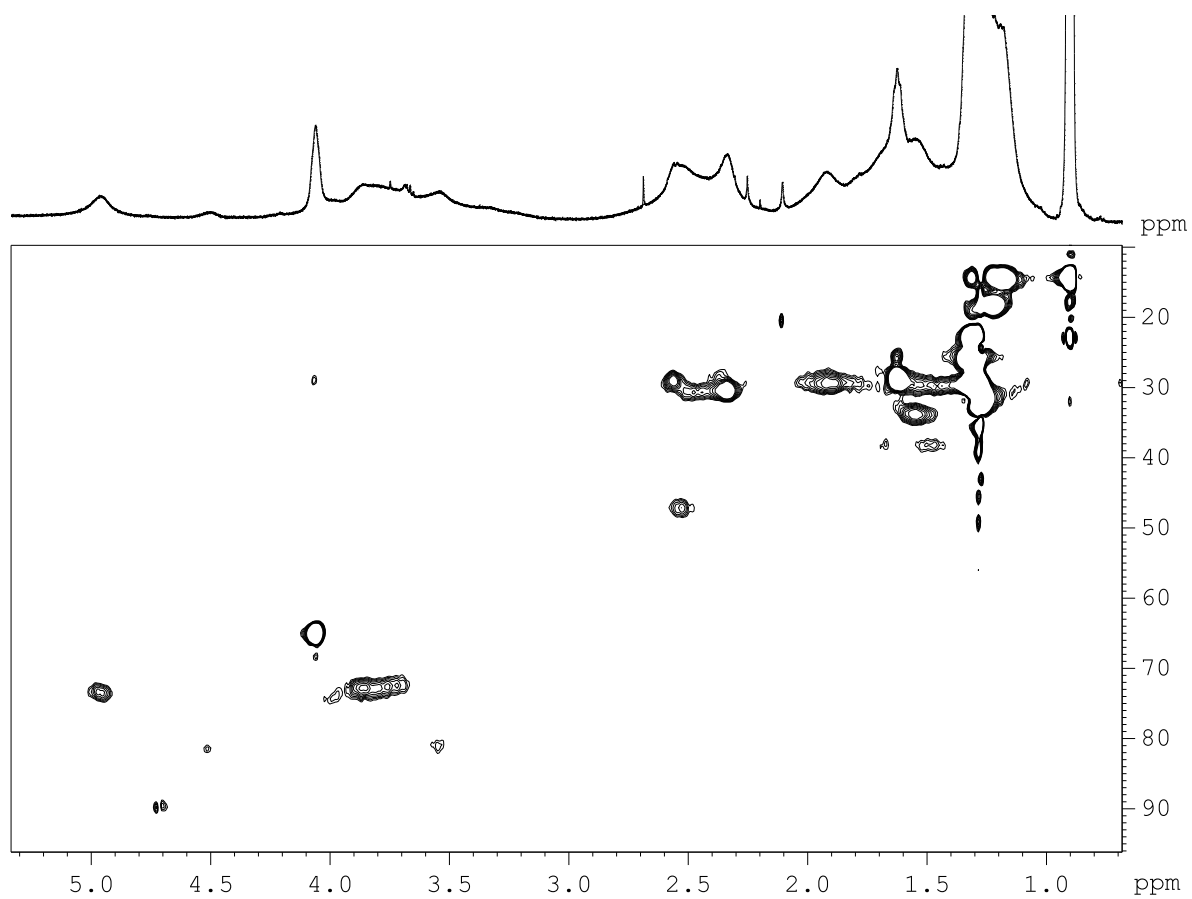


**Figura 38.** Espectre del CG-EM dels productes obtinguts de la saponificació de la TV. Àcids: 16:0, hexadecanoat; 18:0, octadecanoat; 10-metil-octanoat. Neutrals: 14-OH, tetradecanol; 16-OH, hexadecanol; 6,10,14-trimetil-pentadecan-2-ol; 18-OH, octadecanol. La resta de pics no han estat identificats per comparació amb la llibreria.

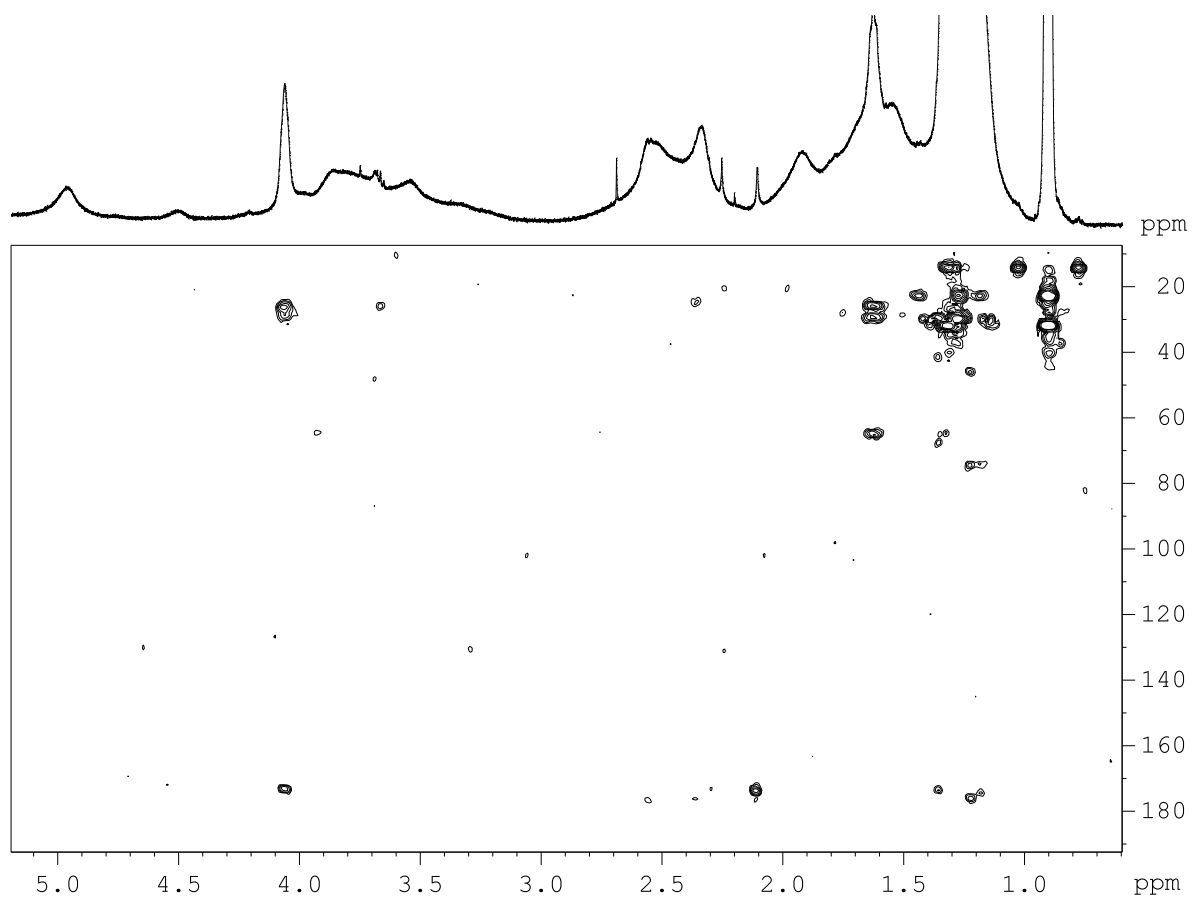


**Figura 39.** Espectre RMN 1D d' $^1\text{H}$  de la TV on s'especifiquen les correspondències entre la posició en l'espectre i el tipus de protó.

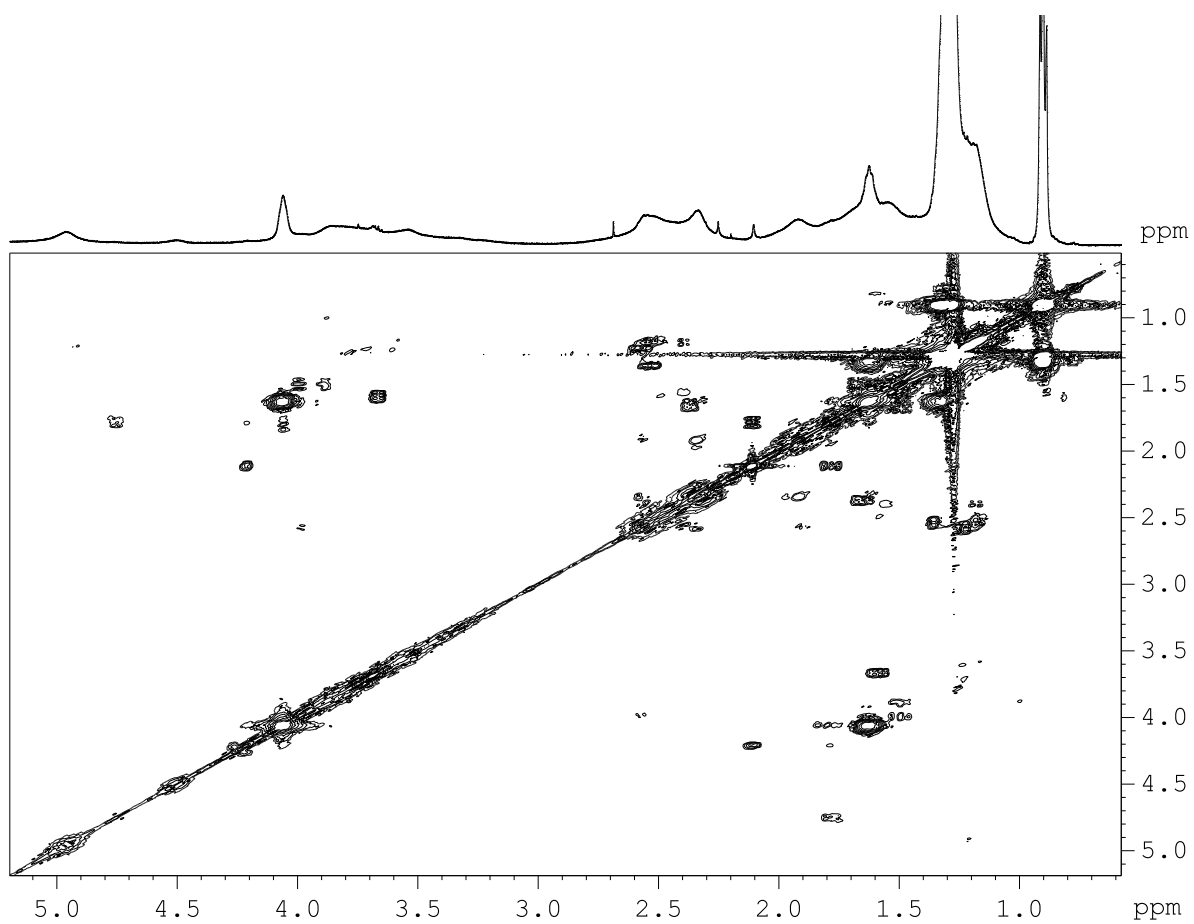




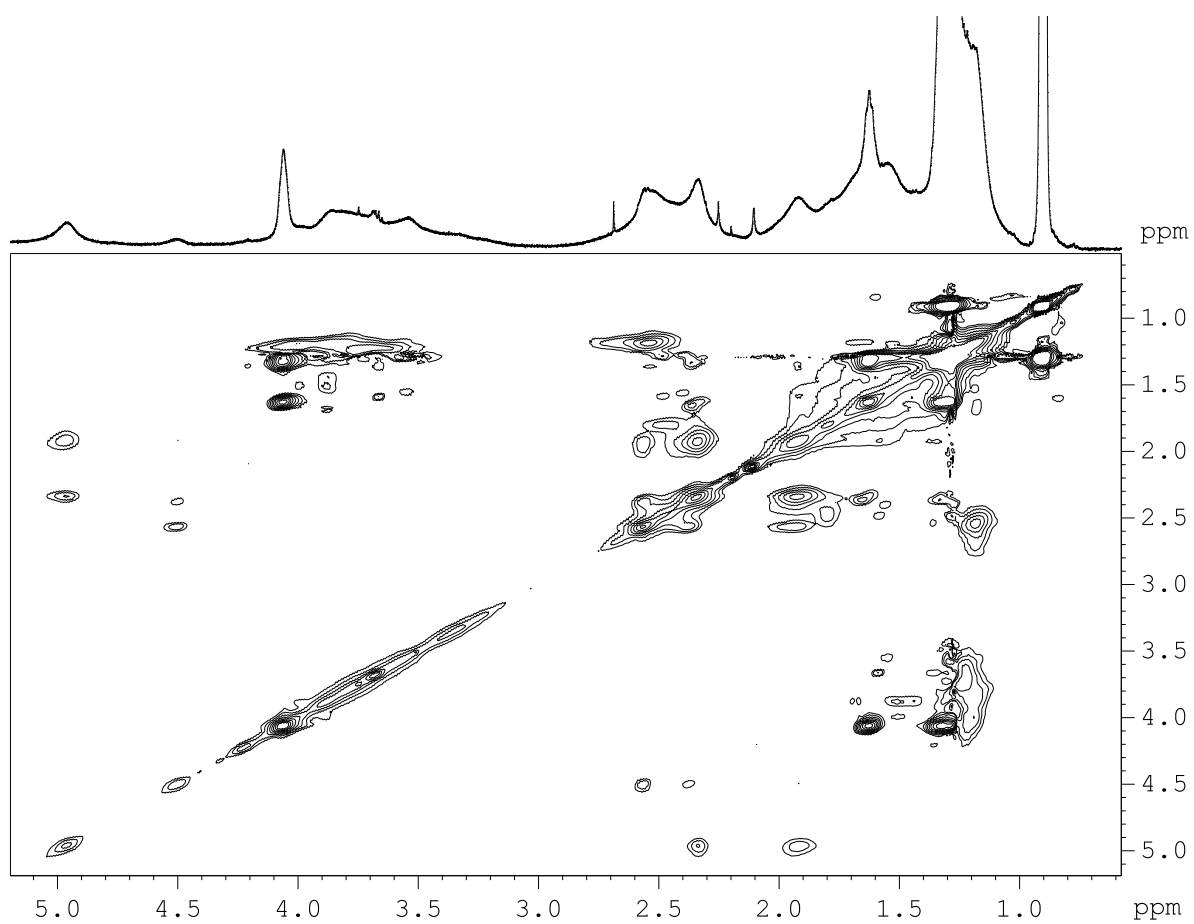
**Figura 40.** Espectre de correlació heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de la TV.



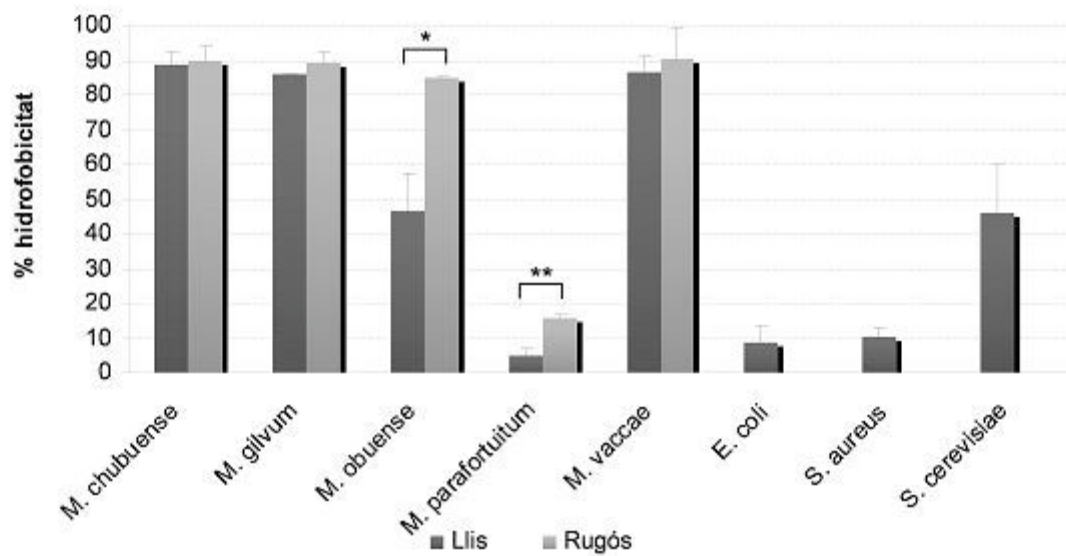
**Figura 41.** Espectre de correlació heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC de la TV.



**Figura 42.** Espectre de correlació homonuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de la TV.

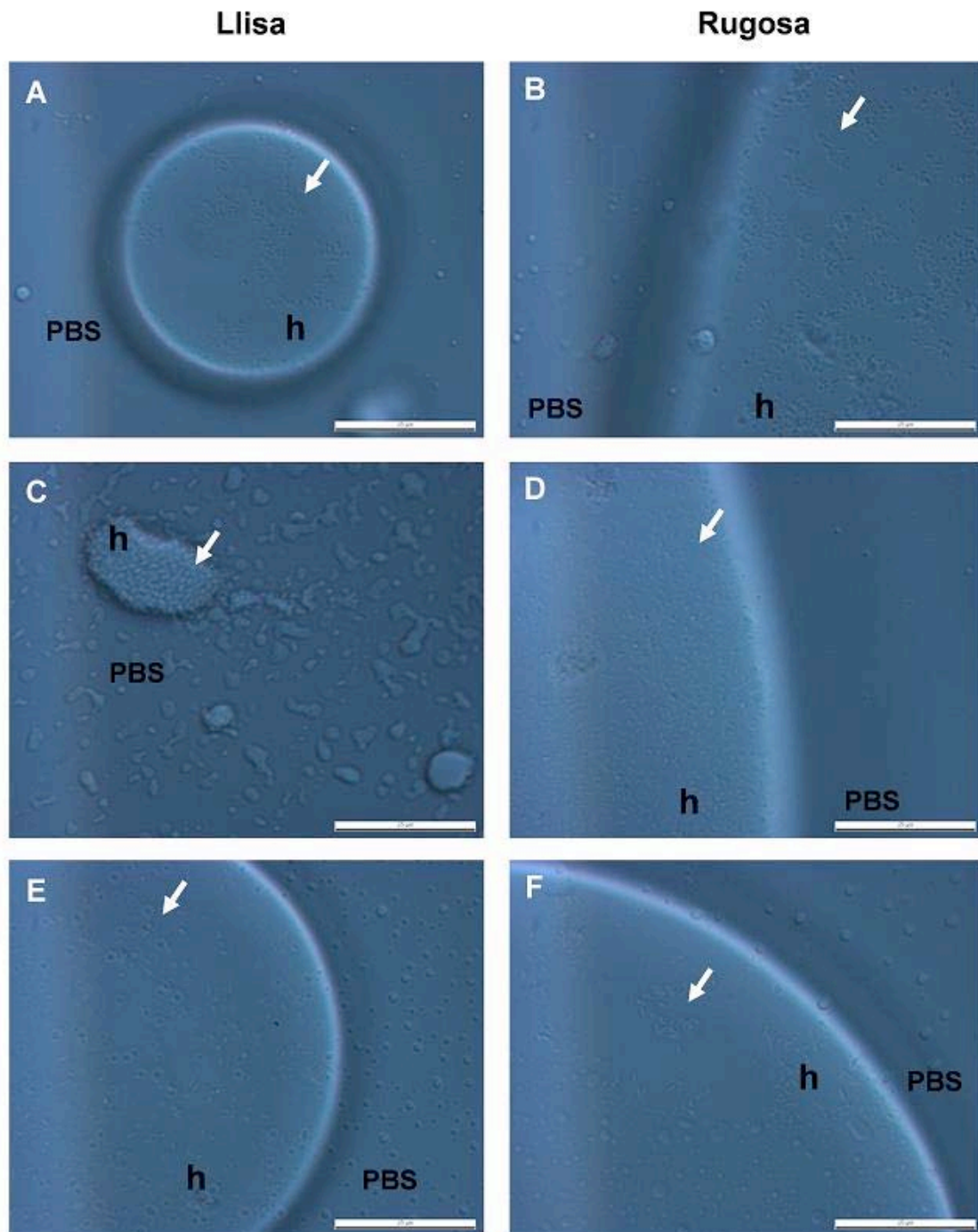


**Figura 43.** Espectre de correlació homonuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY de la TV.

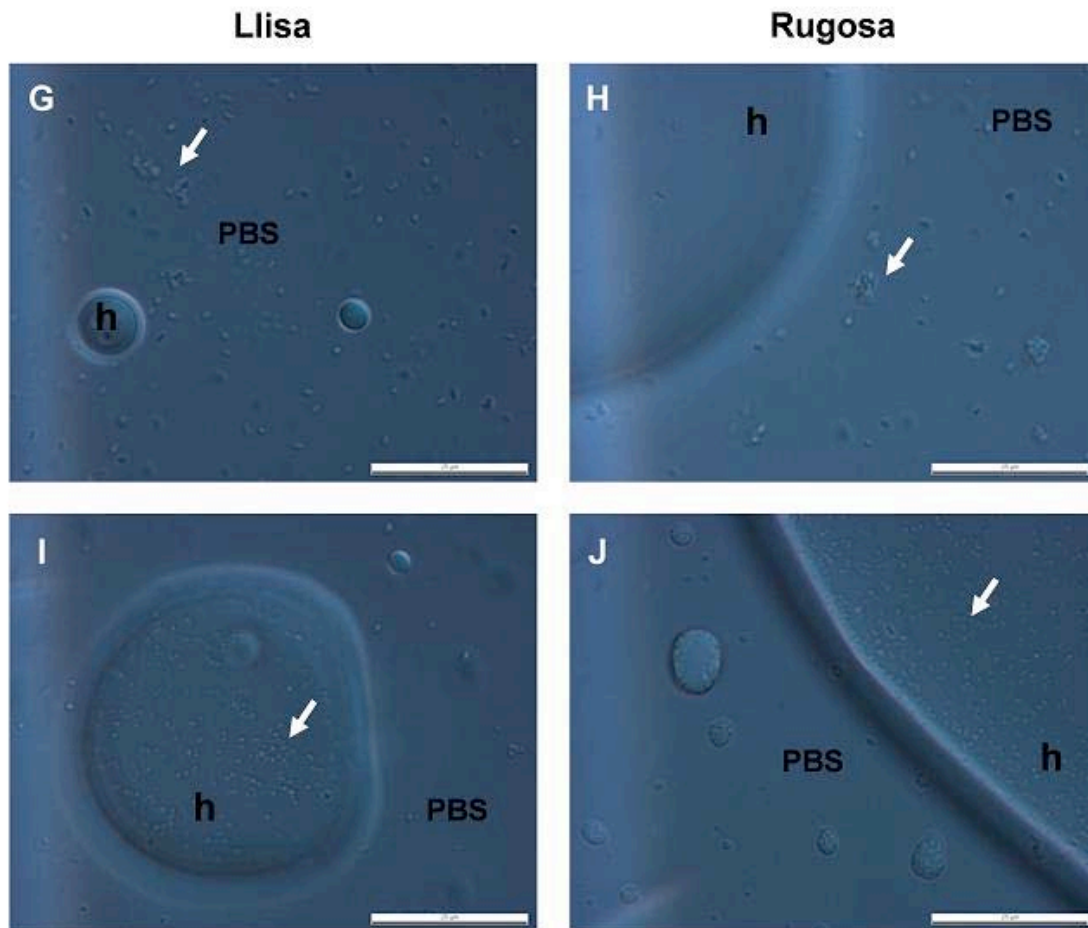


**Figura 44.** Mesura de la hidrofobicitat de superfície mitjançant hexadecà de les colònies llises i rugoses dels diferents micobacteris estudiats. L'estudi de cada mostra es va fer per triplicat i els resultats expressats són la mitjana dels tres valors obtinguts.

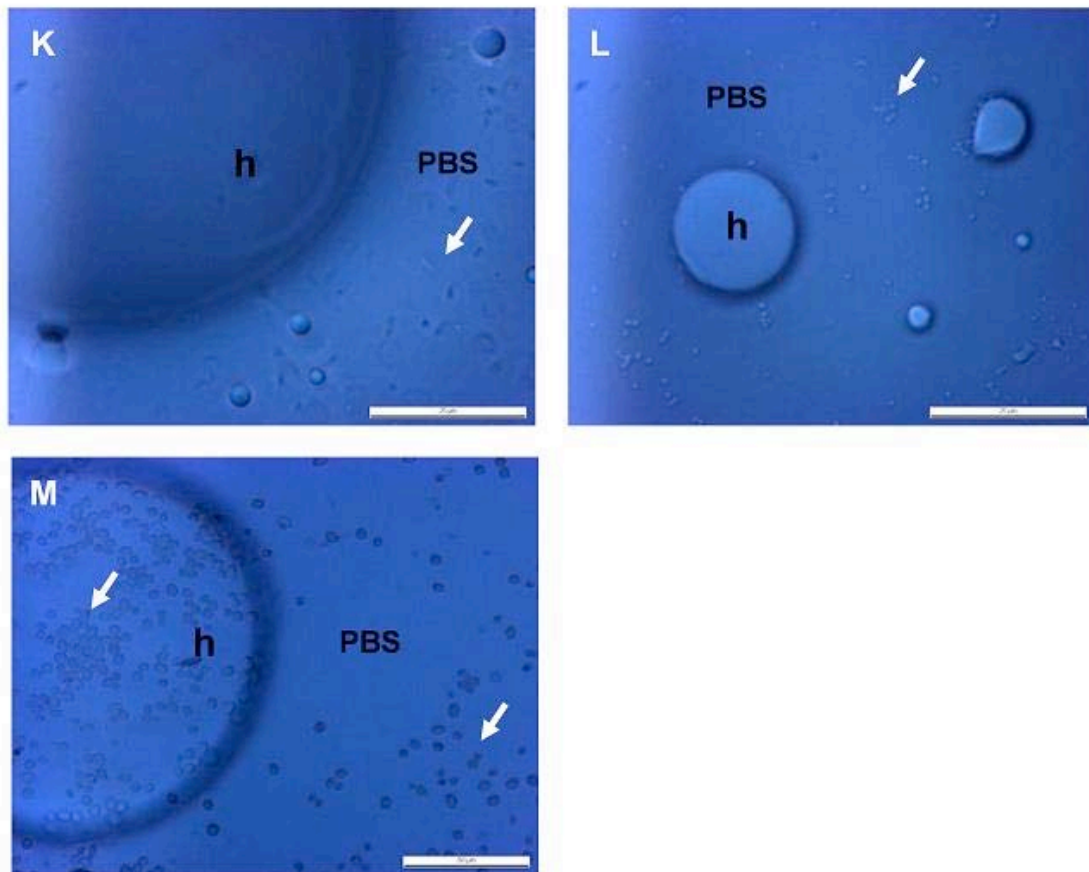
\*, nivells de hidrofobicitat de la variant rugosa significativament superiors als de la variant llisa (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).



**Figura 45.** Observació microscòpica de la interfase PBS/n-hexadecà de les variants morfològiques llises i rugoses de: *M. chubuense* (A, B), *M. gilvum* (C, D) i *M. obuense* (E, F). Les sagetes indiquen la zona on es troben els bacils. PBS, fase aquosa; h, fase de l'hexadecà.

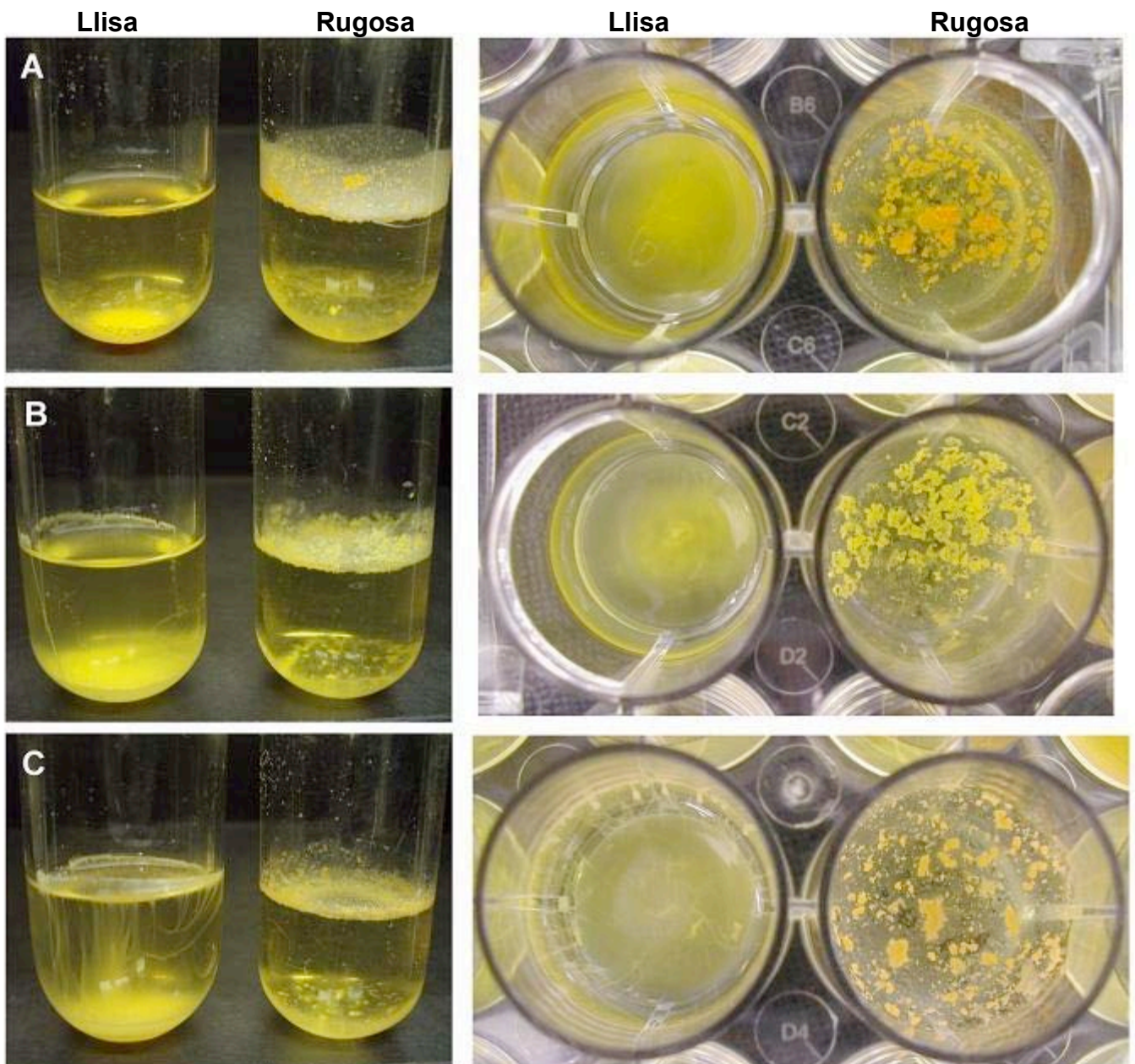


**Figura 46.** Observació microscòpica de la interfase PBS/n-hexadecà de les variants morfològiques llises i rugoses de: *M. parafortuitum* (G, H) i *M. vaccae* (I, J). Les sagetes indiquen la zona on es troben els bacils. PBS, fase aquosa; h, fase de l'hexadecà.

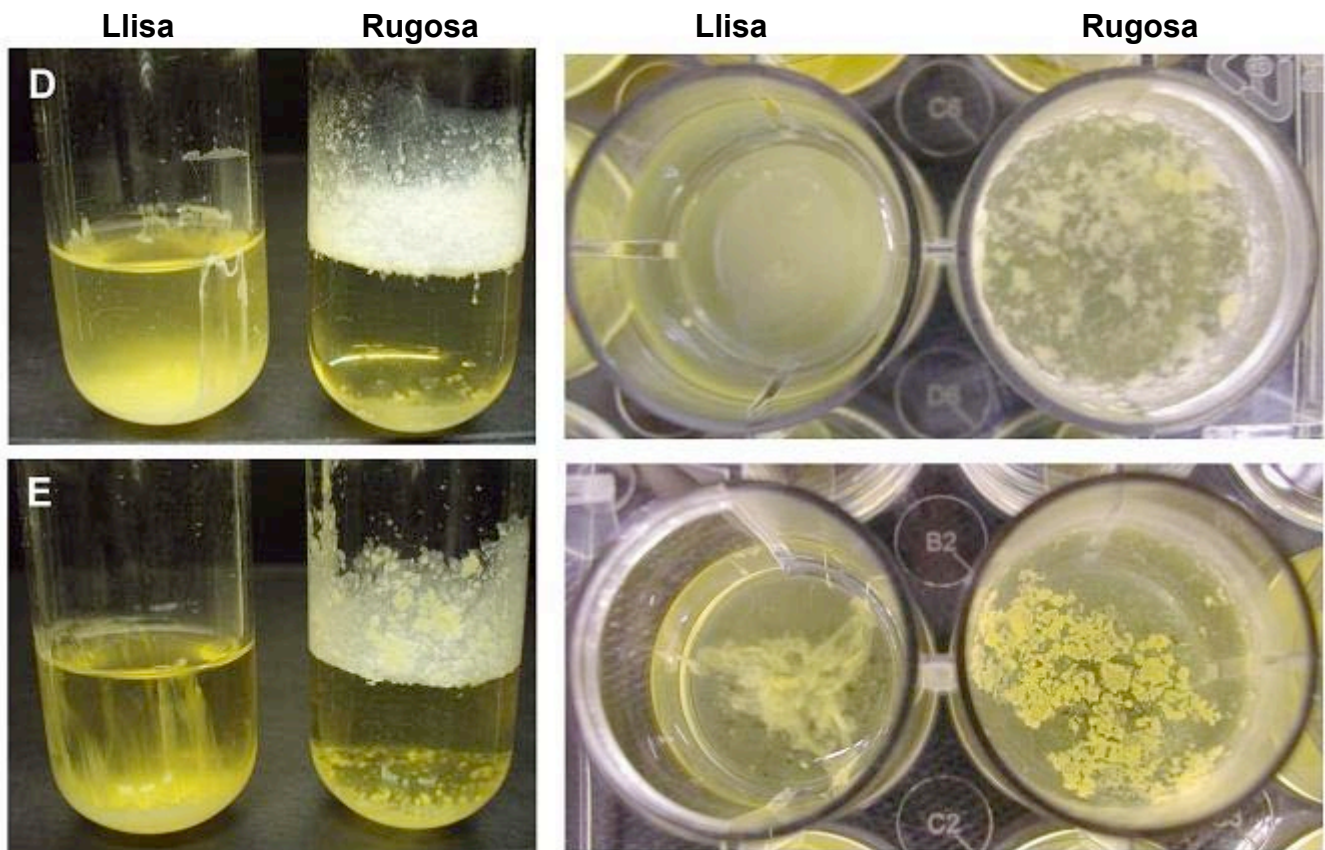


**Figura 47.** Observació microscòpica de la interfase PBS/n-hexadecà d'*E. coli* (K), *S. aureus* (L), i *S. cerevisiae* (M). Les sagetes indiquen la zona on es troben els microorganismes. PBS, fase aquosa; h, fase de l'hexadecà.



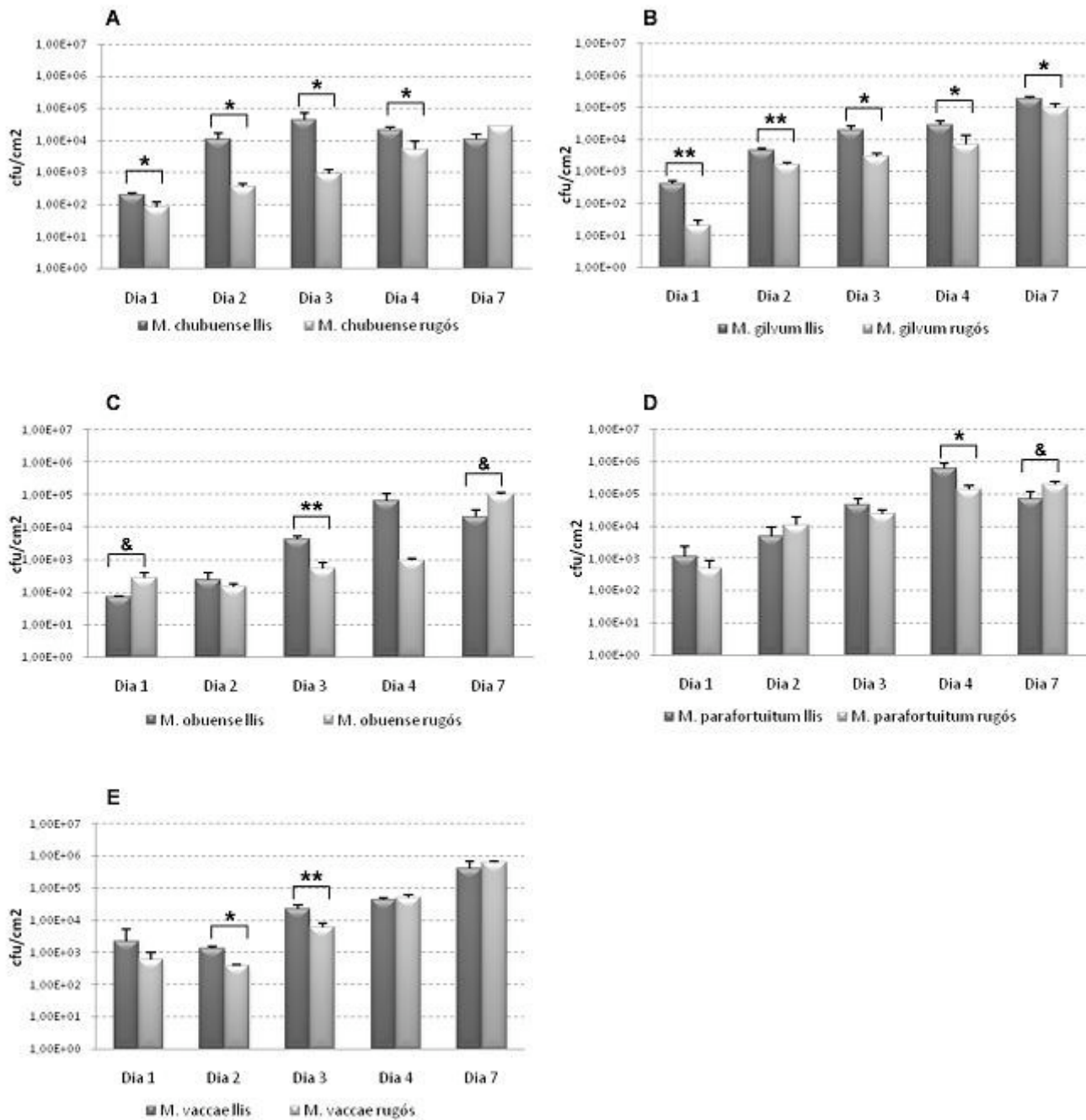


**Figura 48.** Anàlisi de la formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid-aire en tubs de vidre (columna esquerra) i pouets de plaques de cultiu (columna dreta), de les morfologies colonials llises i rugoses de (A) *M. chubuense*, (B) *M. gilvum* i (C) *M. obuense*.



**Figura 49.** Anàlisi de la formació d'una biopel·lícula en la interfase líquid-aire en tubs de vidre (columna esquerra) i pouets de plaques de cultiu (columna dreta), de les morfologies colonials llises i rugoses de (D) *M. parafortuitum* i (E) *M. vaccae*.

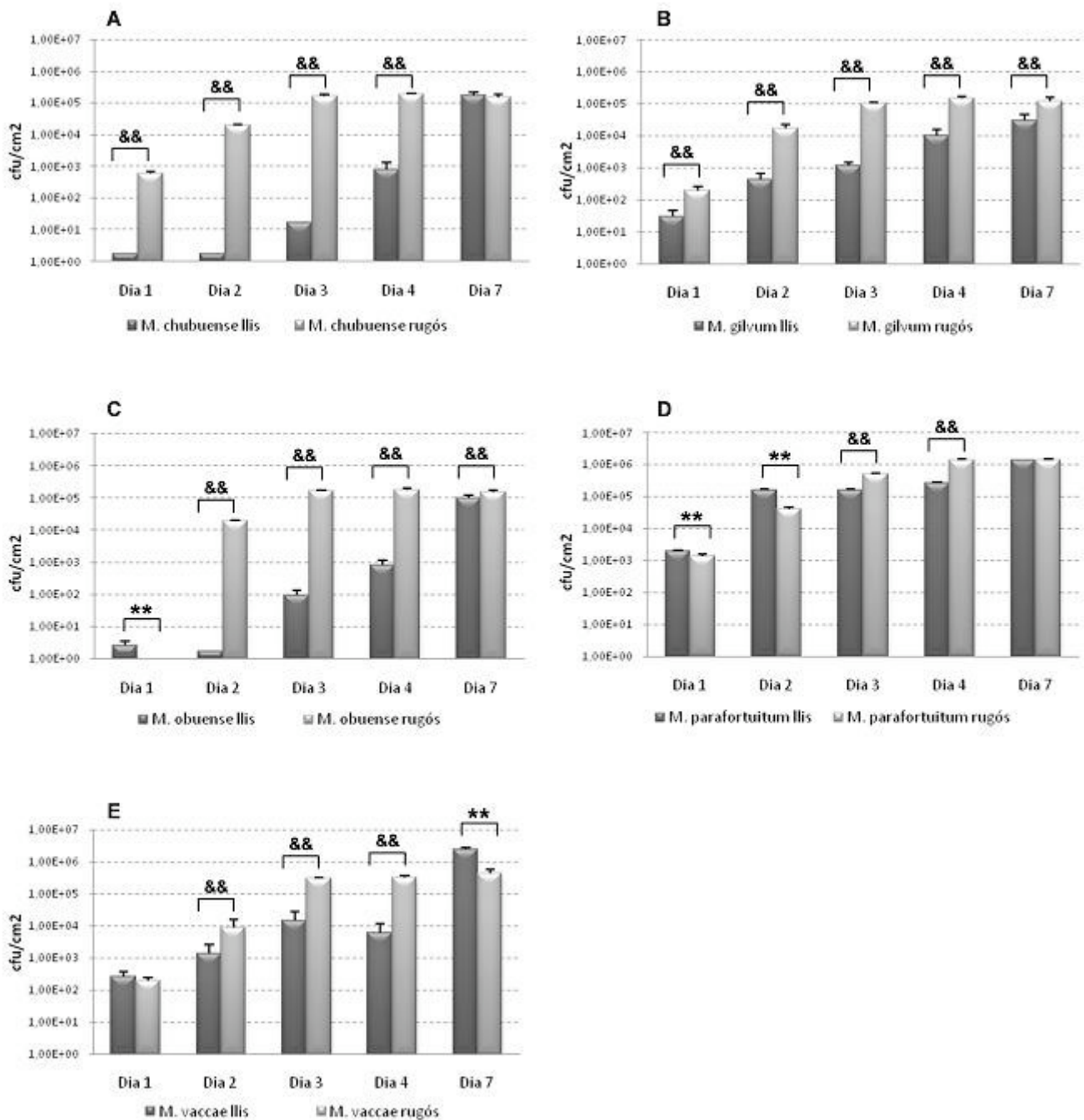




**Figura 50.** Capacitat d'adhesió cel·lular de les diferents variants morfològiques llises i rugoses de (A) *M. chubuense*, (B) *M. gilvum*, (C) *M. obuense*, (D) *M. parafortuitum* i (E) *M. vaccae* en tubs de vidre a diferents temps. Aquest estudi es va fer per triplicat per a cada un dels micobacteris estudiats. Els resultats obtinguts s'expressen, en cfu/cm<sup>2</sup>, com la mitjana de les dades obtingudes en tres experiments.

\*, nivells d'adhesió cel·lular de la variant llisa significativament superiors als de la variant rugosa (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

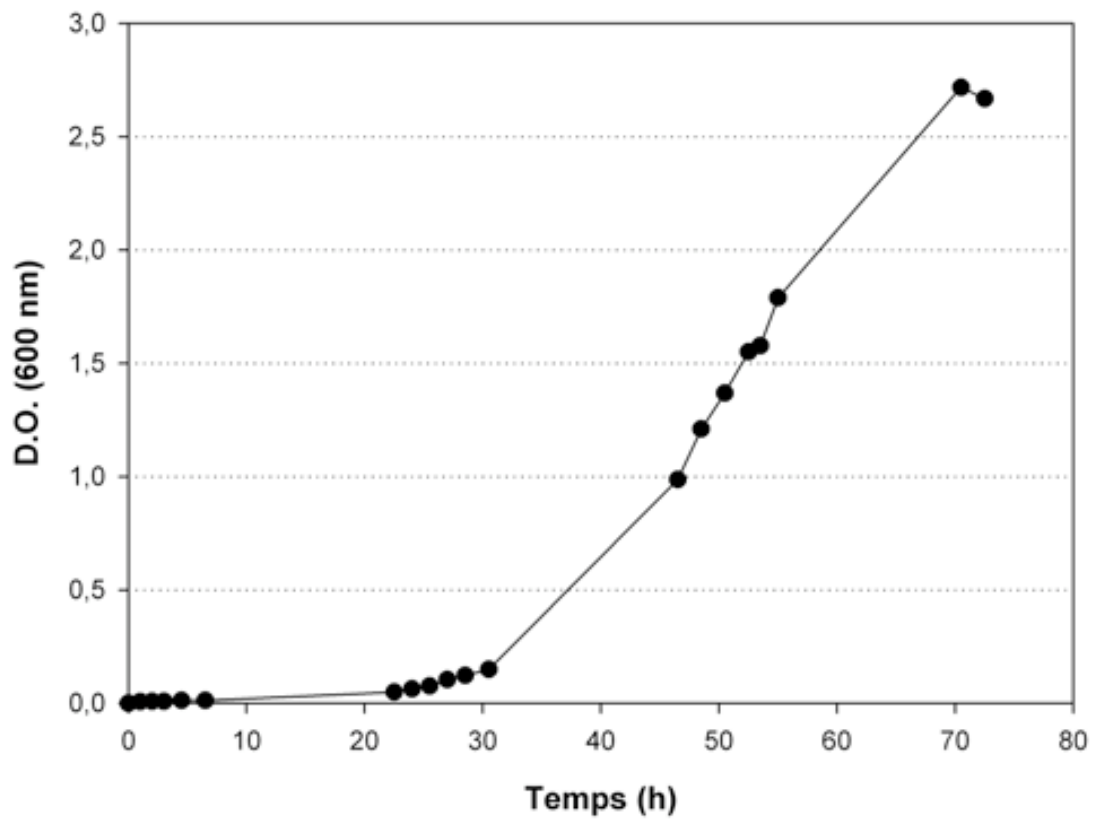
&, nivells d'adhesió cel·lular de la variant rugosa significativament superiors als de la variant llisa (&,  $p < 0,05$ ).



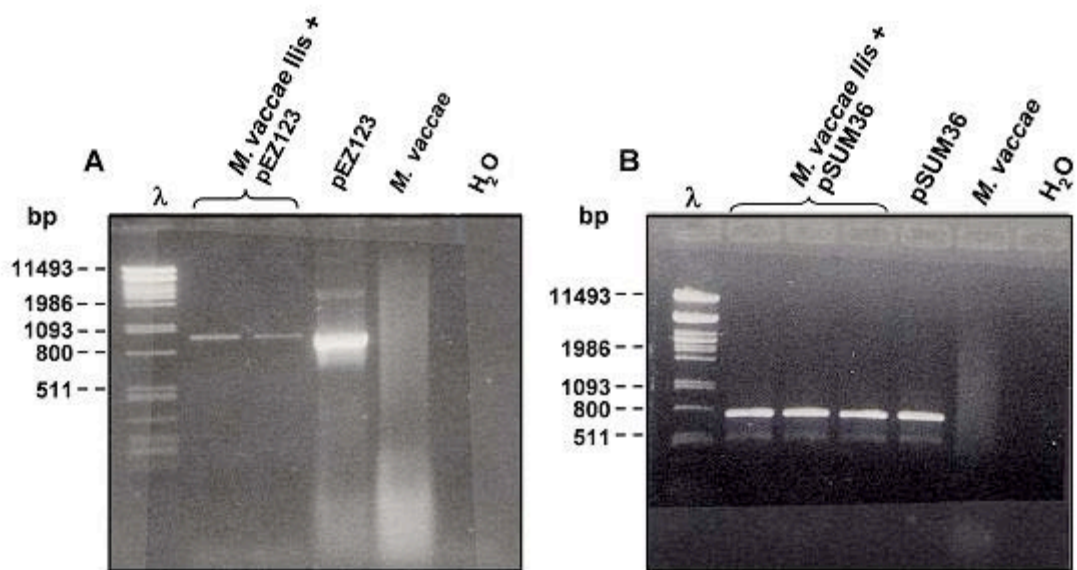
**Figura 51.** Capacitat d'adhesió cel·lular de les diferents variants morfològiques llises i rugoses de (A) *M. chubuense*, (B) *M. gilvum*, (C) *M. obuense*, (D) *M. parafortuitum* i (E) *M. vaccae* en tubs de poliestirè a diferents temps. Aquest estudi es va fer per triplicat per a cada un dels micobacteris estudiats. Els resultats obtinguts s'expressen, en cfu/cm<sup>2</sup>, com la mitjana de les dades obtingudes en tres experiments.

\*, nivells d'adhesió cel·lular de la variant llisa significativament superiors als de la variant rugosa (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

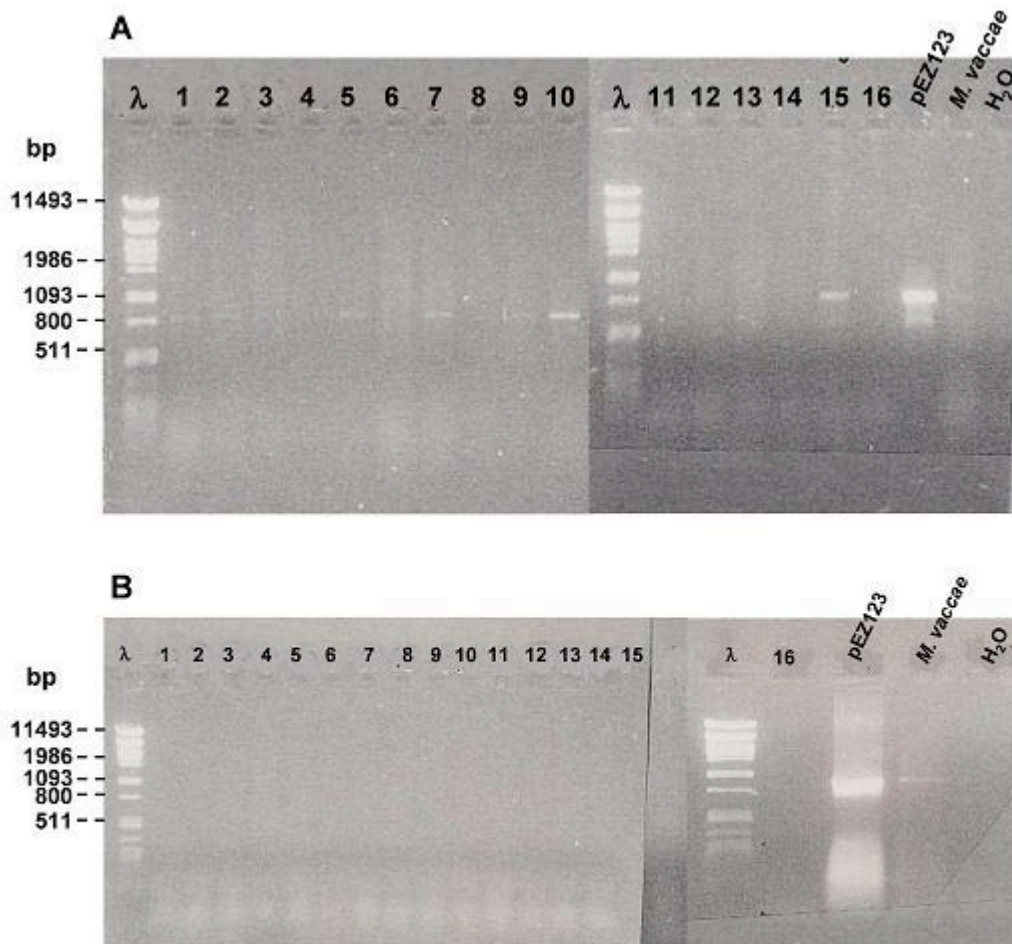
&, nivells d'adhesió cel·lular de la variant rugosa significativament superiors als de la variant llisa (&,  $p < 0,05$ ; &&,  $p < 0,01$ ).



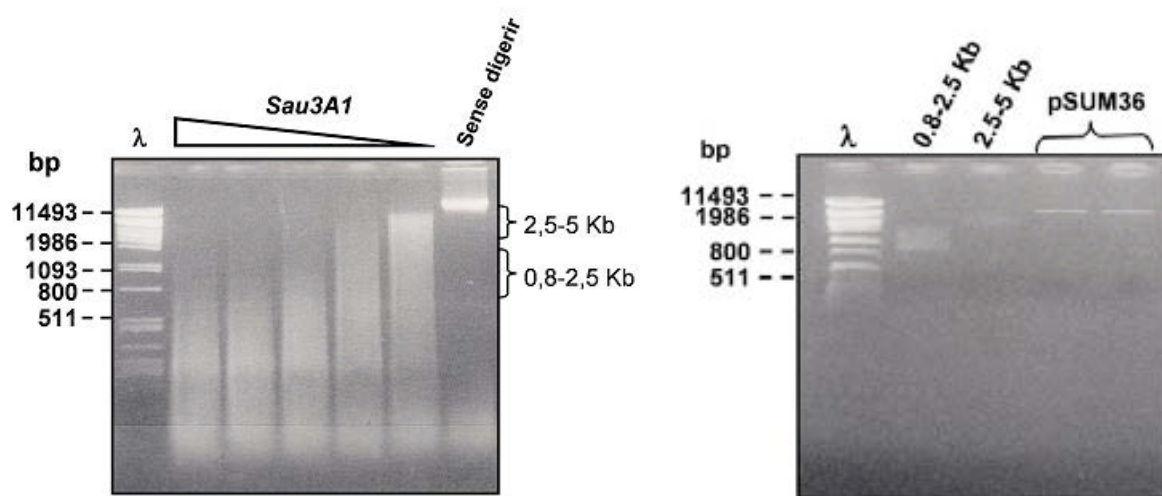
**Figura 52.** Corba de creixement de *M. vaccae* llis i rugós en medi TSB. Corba obtinguda a partir de la mesura de la densitat òptica ( $D.O_{600}$ ) del cultiu líquid a diferents temps. Aquest estudi es va fer per duplicat i els resultats s'expressen com la mitjana de les dades obtingudes en aquests dos experiments.



**Figura 53.** Gel electroforètic al 0,8 % d'agarosa de l'amplificació per PCR de pEZ123 (A) i pSUM36 (B) en *M. vaccae* IIs.



**Figura 54.** Gel electroforètic al 0,8 % d'agarosa de l'amplificació per PCR de Tngfp (A) i pEZ123 (B) en *M.vaccae* llis. 1-16, colònies analitzades.



**Figura 55.** Gel electroforètic al 0,8 % d'agarosa, de la digestió parcial de *M. vaccae* llis utilitzant l'enzim *Sau3A1* (A), i de les digestions de *M. vaccae* llis utilitzant l'enzim *Sau3A1* i de pSUM36 mitjançant l'enzim de digestió *BamHI* (B).



## E. DISCUSSIÓ

Es conegut que els micobacteris presenten diferents morfologies colonials quan aquests es fan créixer en medi sòlid (Fregman, 1961). Després de continus passes d'una soca en medi sòlid, és possible obtenir mutants espontanis els quals presenten una morfologia colonial diferent de la soca original. En diversos articles s'han descrit canvis espontanis en la morfologia colonial de diferents espècies micobacterianes. Entre aquestes espècies es troben *M. avium*, *M. abcessus*, *M. mucogenicum* i *M. smegmatis* (Muñoz, 1998; Martínez, 1999; Howard, 2006).

Cal destacar que aquesta capacitat d'obtenció de colònies mutants espontànies es dependent del medi de cultiu utilitzat per a l'obtenció d'aquests mutants. Estudis fets amb *M. bovis* BCG van mostrar que després d'analitzar diferents medis de cultiu per a l'estudi de la morfologia colonial, només s'obtenien bons resultats de diferenciació colonial amb un medi de cultiu específic (Osborn, 1976 i 1979).

En referència a aquests antecedents, es va voler determinar si després de successives sembres de diferents espècies micobacterianes, en diferents medis sòlids, s'obtenien colònies amb una morfologia diferent de les soques originals. Les espècies micobacterianes utilitzades en el present estudi van ser *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*. Aquestes espècies micobacterianes tenen en comú que són de creixement ràpid, presenten originàriament una morfologia colonial llisa i, segons els estudis comparatius del 16S ARN (Tortoli, 2006), són filogenèticament properes entre elles i, a la vegada, filogenèticament distants de les espècies micobacterianes ja estudiades per aquesta característica: *M. avium*, *M. abcessus*, *M. mucogenicum* i *M. smegmatis*.

Els resultats obtinguts mostraren, per primer cop i en totes les espècies micobacterianes d'aquest estudi, l'aparició de forma espontània de variants morfològiques rugoses estables, les quals van ser posteriorment aïllades en cultiu pur. A més, es van analitzar diferents medis de cultiu sòlids per a l'obtenció d'aquestes variants morfològiques (TSA, Middlebrook 7H10 i Sauton), i es va determinar que el millor medi per a la visualització i discriminació entre les variants morfològiques llises i rugoses era el medi TSA, medi de cultiu poc utilitzat per a cultivar micobacteris. Els medis més comuns i més utilitzats en el creixement de micobacteris són el Löwenstein–Jensen, Middlebrook 7H10 i Sauton, medis en els quals hem vist que no s'obté una bona diferenciació morfològica en les espècies estudiades per nosaltres.

Posteriorment, l'estudi de la morfologia colonial mitjançant SEM per determinar microscòpicament les diferències morfològiques entre totes dues variants, mostra que les variants morfològiques llises difereixen de les rugoses

en l'organització dels bacils en la colònia. En les colònies de morfologia llisa els bacils es troben disposats de forma desorganitzada, disgregats deixant espais buits entre ells i sense cap orientació. En contrast, en les variants rugoses els bacils es troben formant una estructura compactada i organitzada en forma de cordes o petits canals i no presenten espais buits entre ells. Una altra diferència que cal destacar entre les dues morfologies colonials, és que les variants morfològiques llises i no les rugoses, presenten un material extracel·lular desconegut que embolcalla els bacils, el qual per SEM s'observa en forma de filaments llargs i prims.

Els primers treballs de SEM aplicats a l'estudi de la morfologia colonial dels micobacteris van ser publicats a principis dels anys 70. Drucker (1972) va publicar un treball on estudiava la ultraestructura colonial de huit espècies bacterianes diferents, entre les quals estava *M. phlei*. Aquest autor va descriure la presència, en aquesta espècie micobacteriana, d'un material extracel·lular el qual cobria els bacils, encara que no va mostrar imatges d'aquest resultat. Poc després d'aquest estudi, va ser publicat un altre article, en *M. phlei*, on sí que es mostraven imatges de la disposició dels bacils a la colònia i on es podia observar l'estructura compactada i en forma de cadena dels bacils, a més de la presència d'un material extracel·lular desconegut el qual cobria la colònia (Holmqvist i Kolman, 1978). Okada i col·laboradors (1978), van estudiar i comparar, mitjançant SEM, les característiques colonials de les variants rugoses i llises de *M. lepraemurium*. Els resultats obtinguts en aquest estudi van mostrar la presència d'estructures filamentoses que es trobaven localitzades entre els bacils de les variants rugoses però no entre les variants llises. En el nostre estudi, hem observat curts filaments en les variants morfològiques rugoses de *M. vaccae*, similars als descrits per aquests autors el 1978, però no en la resta de variants rugoses estudiades.

Uns altres estudis de SEM, però aquest cop fets a *M. bovis* BCG, van determinar l'estructura i les unions de les cèl·lules en la colònia. Els resultats obtinguts en aquest estudi mostren com en les colònies de morfologia rugosa els bacils es troben molt junts entre ells formant estructures d'aparença irregular i en forma de filaments, mentres que a les colònies amb morfologia llisa, els bacils es troben en forma desorganitzada, apilats els uns damunt dels altres, i sense formar cap tipus d'estructura (Gupta, 1981).

En el gènere *Mycobacterium*, els efectes de la morfologia colonial en les funcions biològiques són múltiples. Diferents articles mostren una relació directa entre la morfologia colonial, la motilitat, la hidrofobicitat i la formació de biopel·lícules.

La motilitat en micobacteris va ser descrita per primer cop en les espècies *M. smegmatis* i *M. avium* (Martínez, 1999). En aquests estudis es va determinar que la motilitat es limitava només a les colònies de morfologia llisa. Anys

després, van començar a aparèixer diferents estudis on es mostrava aquesta capacitat en altres espècies micobacterianes com *M. abscessus* i *M. marinum* (Howard, 2006 i Ren, 2007). En tots aquests estudis es va determinar que les colònies amb morfologia llisa tenien la capacitat de lliscar per la placa d'agar, a diferència de les corresponents variants rugoses, les quals eren immòbils. Amb aquests antecedents, es va decidir estudiar la capacitat de motilitat de les variants morfològiques llises i rugoses de *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*. Aquests estudis es van fer amb diferents medis semisòlids: TSA, Sauton modificat, M63 i Middlebrook 7H9 sense complementar, i a diferents concentracions d'agar i agarosa, ja que segons diferents estudis, la composició del medi de motilitat és un factor important per determinar si una soca és mòbil o immòbil (Martínez, 1999; Fredslund, 2008).

En l'estudi de la motilitat de Martínez i col·laboradors (1999), en *M. smegmatis* i *M. avium*, es va observar un increment en el diàmetre de l'halo corresponent al moviment per la superfície del medi quan al medi s'hi afegia com a agent solidificant agarosa en comptes d'agar i a una determinada concentració. També van observar un augment en la velocitat de moviment quan al medi s'hi afegia una font de carboni.

Estudis recents amb *M. gilvum* VM552 mostren també que petites variacions en els components del medi donen lloc a variacions en la velocitat i la morfologia de l'halo de motilitat. Els resultats obtinguts van determinar que afegint en el medi de motilitat una font de carboni addicional i afegint agarosa, en comptes d'agar, s'obtenien diferències significatives en la motilitat (Fredslund, 2008).

Els resultats obtinguts en el nostre estudi, mostren que el millor medi per a la discriminació entre soques mòbils i immòbils és el medi 7H9 sense complementar i amb un 0,3 % d'agarosa, medi descrit per Martínez i col·laboradors (1999), com un bon medi per a l'estudi de la motilitat. Després d'analitzar la capacitat de motilitat dels diferents micobacteris del nostre estudi, s'han pogut observar diferències importants entre morfologies. S'ha determinat que totes les colònies de morfologia llisa es mouen de manera més eficient pel medi que no pas les rugoses. Pràcticament totes les colònies llises envaeixen la totalitat de la superfície del medi agar formant diferents tipus d'extensions des del punt d'inoculació fins a la perifèria. En canvi, les colònies de morfologia rugosa només s'estenen uns quants mil·límetres del punt d'inoculació i no formen cap tipus de prolongació.

Martínez i col·laboradors van descriure que la capacitat de les colònies de morfologia llisa de *M. smegmatis* i *M. avium* per moure's per l'agar era deguda a la presència d'una classe de glicolípidis lliures presents a la paret cel·lular, els GPL. Aquests autors van trobar que mentre les colònies de morfologia llisa

eren mòbils i presentaven GPL a la seva paret, les variants morfològiques rugoses eren immòbils i no contenien GPL. Poc temps després Recht i col·laboradors van corroborar aquests resultats mitjançant l'anàlisi genètic de la motilitat en *M. smegmatis* (Recht, 2000). Aquests autors van demostrar que l'alteració en la síntesi de GPL, per transposició, en aquesta espècie micobacteriana, donava lloc a l'obtenció de mutants rugosos immòbils.

Posteriorment, un altre estudi va mostrar els mateixos resultats, però aquest cop en una altra espècie, *M. abscessus*. En aquest estudi es van obtenir a partir d'un aïllat clínic rugós de *M. abscessus*, mutants espontanis llisos i rugosos. Els estudis comparatius fets entre aquestes morfologies colonials, van mostrar com les variants llises eren mòbils i presentaven GPL a la seva paret, a diferència de la soca original rugosa i els mutants espontanis rugosos, els quals eren defectius en la síntesi de GPL i eren immòbils (Howard, 2006).

Els GPL són una classe de peptidolípid glicosilats específics d'espècie i són els glicolípid lliures més abundants que es poden trobar a la paret de molts micobacteris ambientals. Aquests GPL els trobem a la paret cel·lular de *M. abscessus*, *M. avium*, *M. butyricum*, *M. chelonae*, *M. habana*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. peregrinum*, *M. porcinum*, *M. scrofulaceum*, *M. senegalense*, *M. simiae*, *M. smegmatis* i *M. xenopi* (Chatterjee, 2001).

Basant-nos en la relació existent entre les variacions de la morfologia colonial, motilitat i el contingut de lípids i glicolípid a la paret cel·lular dels micobacteris, descrita per diversos autors a la literatura (Recht 2000; Howard, 2006), i tenint en compte que els GPL no han estat descrits en les espècies micobacterianes estudiades en el nostre treball, es va decidir analitzar el contingut de lípids i glicolípid lliures de *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*. L'objectiu fou veure si la capacitat de motilitat es devia també a la presència o l'absència d'algun lípid o glicolípid present a la paret cel·lular d'aquests. L'anàlisi del contingut de lípids i glicolípid de la paret cel·lular de totes dues variants morfològiques, mitjançant cromatografia de capa fina, ens va indicar que les colònies de morfologia llisa presenten un compost extracel·lular, mai descrit anteriorment en el gènere *Mycobacterium*, que no es troba en les variants rugoses. La purificació d'aquest compost i la seva posterior anàlisi estructural, mitjançant RMN, GC-MS i IR, ens ha permès definir aquest compost, present a les colònies llises i no a les rugoses, com a un polièster extracel·lular de cadena llarga saturat.

Les diferències en la composició lipídica i glicolipídica de la paret cel·lular d'alguns micobacteris, s'ha vist que poden influir en les característiques hidrofòbiques de la paret cel·lular. Són pocs els estudis en els quals es determina i es compara la hidrofobicitat de la paret cel·lular micobacteriana entre morfologies colonials.

Etienne i col·laboradors (2002 i 2005) van determinar que una variant rugosa de *M. smegmatis* defectiva en la producció de GPL, obtinguda per transposició a partir de la soca de morfologia llisa *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, presentava uns índex d'hidrofobicitat superiors a la soca original. En el 2005, aquests mateixos autors van tornar a estudiar les diferències d'hidrofobicitat entre dues soques de *M. smegmatis*, *M. smegmatis* ATCC 607, de morfologia rugosa, i *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, variant morfològica llisa, però en aquest cas els autors no van trobar diferències significatives entre totes dues soques.

Basant-nos en aquests estudis previs, vam voler determinar si en les nostres espècies micobacterianes hi havia diferències significatives de hidrofobicitat entre morfologies llises i rugoses. Els resultats obtinguts per nosaltres mostren com tots els micobacteris estudiats presenten uns nivells de hidrofobicitat elevats, al voltant del 80–90 %, a excepció de *M. parafortuitum* el qual presenta un índex molt hidrofílic en comparació als altres micobacteris. A més a més, si comparem les hidrofobicitats entre morfologies, veiem que presenten uns índexs d'hidrofobicitat molt similars, a l'igual que els resultats obtinguts per Etienne i col·laboradors (2005). Només s'observen diferències significatives entre ambdues morfologies llisa i rugosa, en *M. parafortuitum* i *M. obuense*, sent en aquestes espècies les variants rugoses significativament més hidrofòbiques que les seves corresponents llises, diferències similars a les obtingudes per Etienne i col·laboradors (2002).

Els micobacteris presenten una extraordinària capacitat d'adaptació a gran varietat d'ambients i una gran resistència a condicions extremes d'estrès i elevades concentracions d'antibiòtics. Aquestes habilitats podrien estar directament relacionades amb la capacitat d'adherir-se a superfícies i de formar biopel·lícules en les interfases líquid–aire (Hall–Stoodley i Stoodley, 2005).

Estudis cel·lulars i moleculars revelen la capacitat de *M. abscessus*, *M. avium* i *M. smegmatis* d'adherir-se a una superfície. A més, aquests estudis també mostren com aquesta característica es troba directament relacionada amb la presència de GPL en la seva paret cel·lular (Recht, 2000; Freeman, 2006; Howard, 2006; Yamazaki, 2006; Kocíncová, 2008).

Estudis en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, mostren com mutants rugosos immòbils i defectius en la síntesi de GPL són incapaços d'adherir-se a una superfície de PVC, a diferència de la soca parental llisa la qual sintetiza GPL (Recht, 2000). Estudis fets en *M. abscessus* també mostren resultats similars (Howard, 2006). En aquest cas, es va determinar la capacitat d'adhesió de morfologies colonials llises i rugoses de *M. abscessus* al PS. Els resultats obtinguts per aquests autors mostren com la capacitat d'adhesió a aquest plàstic també es trobava restringida a les colonies de morfologia llisa, abundants en GPL, les quals tenien la capacitat d'adherir-se i créixer de forma eficient en el PS, mentre que les variants rugoses, defectives en GPL, havien perdut aquesta capacitat

d'adhesió. Freeman i col·laboradors (2006), estudiant la capacitat d'adhesió de *M. avium* a diferents superfícies, van determinar que les colònies llises s'adherien de forma eficient als tres materials testats: PVC, Permanox® i vidre, mentre que les colònies rugoses, defectives en la síntesi de GPL, no tenien la capacitat d'adherir-se al PVC, encara que sí al Permanox® i al vidre.

En l'estudi de l'adhesió cel·lular a superfícies sòlides vam determinar la capacitat d'adhesió de *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae* al vidre i al PS. Els resultats obtinguts van mostrar, a l'igual que l'estudi de Freeman i col·laboradors (2006), que tant les colònies de morfologia llisa com les de morfologia rugosa tenen la capacitat d'adherir-se a tots dos materials estudiats, encara que es van trobar diferències d'adhesió en aquests materials per les diferents variants. Es va observar, en totes les espècies estudiades a excepció de *M. parafortuitum*, que les variants llises s'adhereixen millor al vidre que no pas les rugoses, a diferència del PS, en què són les variants rugoses les que presenten més adherència respecte de les colònies llises, en els primers dies d'incubació. En *M. parafortuitum*, les variants llises i rugoses s'adhereixen per igual a totes dues superfícies.

D'una altra banda, la capacitat de formar biopel·lícules en les interfases líquid-aire també ha estat estudiada, aquest cop en *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* (Ojha, 2005; Hunter, 2006). En aquests estudis s'han relacionat la presència de compostos lipídics i glicolipídics de la paret cel·lular, diferents dels GPL, amb la capacitat d'aquestes espècies en formar biopel·lícules. Entre aquest glicolípids que s'han relacionat amb aquesta capacitat de formació de biopel·lícules, en *M. tuberculosis* trobem els DMT. Estudis comparatius en la formació de biopel·lícules en la interfase líquid-aire, entre dues soques diferents de *M. tuberculosis* obtingudes d'aïllaments clínics, van mostrar com la soca virulenta, de morfologia rugosa i que presentava DMT a la seva paret cel·lular, tenia la capacitat de créixer ràpidament formant un tel per tota la superfície del cultiu líquid. En canvi, l'altra soca aïllada la qual era avirulenta, presentava una morfologia colonial alterada i presentava una concentració baixa de DMT en el seu embolcall cel·lular, produïa unes biopel·lícules petites i poc estables, les quals mai no arribaven a abastar la totalitat de la interfase (Hunter, 2006). Estudis aquesta vegada en *M. smegmatis*, mostren com són, en aquest cas, un nou tipus d'àcids micòlics els involucrats en aquesta capacitat de formar biopel·lícules. Els autors van analitzar i comparar el patró d'àcids micòlics dels bacils que creixien formant la biopel·lícula i dels que creixien de forma lliure pel medi. Els resultats obtinguts van mostrar com els bacils que es trobaven formant part de la biopel·lícula i no els que creixien a l'interior del medi, presentaven uns àcids micòlics de cadena més curta que els originals (Ojha, 2005).

Els resultats obtinguts en el nostre estudi sobre la capacitat de formació biopel·lícules en les interfases líquid–aire en *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*, mostren resultats similars als obtinguts per Hunter i col·laboradors (2006) en *M. tuberculosis*. Els nostres resultats mostren com són les variants rugoses i no pas les llises, les que són capaces de créixer en superfície formant un tel compacte i uniforme per tota la interfase, arribant a envair les parets del tub. A més, en les variants rugoses trobem bacils que no formen part d'aquesta biopel·lícula, sinó que es troben pel medi formant agrupacions entre ells i que amb el temps precipiten al fons del tub. En les variants llises, els bacils no són capaços de formar aquestes biopel·lícules sinó que es troben distribuïts de forma homogènia per tot el medi, sense formar agrupacions, o precipitats al fons del tub.

Són molts els estudis genètics que s'han fet per estudiar la implicació directa dels GPL en la morfologia colonial, en *M. avium* i *M. smegmatis*. Belisle i col·laboradors (1993) van determinar que els mutants rugosos, de *M. avium*, defectius en la síntesi de GPL presentaven en el seu genoma grans delecions en la regió genòmica *ser2*, regió involucrada de la síntesi de GPL. En canvi, les colonies llises, eren riques en GPL i presentaven intacta aquesta regió genòmica *ser2* (Belisle, 1993). Estudis similars es van fer en *M. smegmatis*. Recht i col·laboradors (2000), analitzant i comparant el genoma de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, sòca rica en GPL, amb els mutants rugosos obtinguts de forma espontània, defectius en la síntesi de GPL, van determinar que les diferències en el patró de GPL entre aquestes dues soques era deguda a l'alteració del gen *mpe* que codifica per a un enzim de la família de les pèptid sintetases. Aquests estudis van relacionar aquesta alteració genètica en les variants rugoses amb la pèrdua de l'expressió dels GPL.

Segons aquests antecedents, es va voler estudiar si en les soques de morfologia llisa de *M. vaccae* es podia alterar la síntesi de la TV mitjançant transformació i si, d'aquesta transformació en *M. vaccae* llis, s'obtenien soques rugoses defectives en la síntesi de la TV, per determinar una relació directa entre la morfologia colonial i la síntesi d'aquest compost. Només un estudi mostra la capacitat de transformació de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> utilitzant diferents plasmidis (Medeiros, 2002), per aquest motiu varem fer estudis preliminars per tal de determinar la capacitat de transformació de *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> pels nostres plasmidis: pEZ123 i pSUM36. Els resultats obtinguts d'aquests estudis preliminars mostren que *M. vaccae* ATCC 15483<sup>T</sup> es pot transformar mitjançant els nostres plasmidis; sent les eficiències de transformació de  $3,49 \times 10^2$ , per a pEZ123 i  $6,38 \times 10^2$ , per a pSUM36. Aquestes dades són aproximadament de dos ordres de magnitud inferiors a l'eficiència de transformació obtinguda en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. A més aquests valors d'eficiència de transformació són lleugerament inferiors als

obtinguts per Medeiros i col·laboradors (2002) utilitzant altres vectors per transformar *M. vaccae* i *M. smegmatis*. Posteriorment, els nostres resultats, utilitzant el vector pEZ123, mostren l'obtenció de mutants rugosos, a partir de la transformació de *M. vaccae* llis, els quals presenten el transposó Tngfp del plasmidi pEZ123 integrat aleatòriament en el genoma de *M. vaccae* i no presenten el plasmidi pEZ123, el qual ha estat eliminat. A partir d'aquests mutants de morfologia rugosa es va pretendre localitzar els llocs d'inserció d'aquest transposó, la zona del genoma que codifica per la TV i els gens implicats en la síntesi d'aquest compost, mitjançant la tècnica de la LMPCR (Prod'hom, 1998) i posterior seqüenciació, encara que els resultats obtinguts mitjançant LMPCR no van ser concluent. En estudis posteriors s'haurà de seguir una estratègia diferent a la tècnica LMPCR emprada amb l'objectiu de localitzar els llocs d'inserció d'aquest transposó.

Paralelament a aquest estudi de transformació en *M. vaccae* llis, es va construir una llibreria genòmica en *M. vaccae* rugós, a partir de fragments d'ADN de *M. vaccae* llis. L'objectiu fou obtenir colònies de morfologia llisa a partir de l'expressió d'algun fragment de l'ADN de la variant llisa en la soca rugosa de *M. vaccae*. Els resultats obtinguts mostren com a partir d'aquesta llibreria genòmica, obtinguda de la lligació de petits fragments d'ADN (de 2,5 a 5 Kb) de *M. vaccae* llis en el plasmidi pSUM36 i transformada posteriorment en les colònies de morfologia rugosa, s'han obtingut colònies morfològiques llises, les quals estudis posteriors ens permetran determinar si presenten el plasmidi pSUM36 amb un fragment d'ADN de *M. vaccae* llis en el seu interior i la seqüència del fragment d'ADN lligat en el plasmidi.



## F. CONCLUSIONS

- I. De forma espontània apareixen colònies de morfologia rugosa després de fer successives ressebres, en medi sòlid, de les colònies llises de *M. aurum*, *M. chubuense*, *M. gilvum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum* i *M. vaccae*.
- II. Les colònies rugoses es mantenen estables i no reverteixen a la morfologia llisa.
- III. El medi idoni per a la diferenciació colonial de manera macroscòpica és el medi Tryptone Soy Agar.
- IV. Mitjançant microscopia electrònica de rastreig s'observa que a les colònies llises, els bacils es troben disposats de forma desorganitzada i disgregats deixant espais buits entre ells. Les variants rugoses presenten els bacils organitzats i formant una estructura compacta en forma de cordes o petits canals i no presenten espais buits entre ells.
- V. Totes les colònies de morfologia llisa tenen la capacitat de lliscar per la superfície del medi de motilitat de manera més eficient que les seves respectives variants rugoses.
- VI. Les colònies llises de totes les espècies estudiades produeixen un polièster saturat de cadena llarga, mai no descrit anteriorment. Les variants rugoses no el sintetitzen, a excepció de la *variant rugosa brillant* de *M. aurum*.
- VII. A *M. parafortuitum* i *M. obuense* les variants rugoses són significativament més hidrofòbiques que les llises. Per als altres micobacteris estudiats els valors de hidrofobicitat entre totes dues morfologies colonials són similars.

- VIII. Tots els micobacteris de morfologia rugosa creixen en medi Tryptone Soy Broth formant una biopel·lícula a la interfase líquid–aire d'aspecte sec i de superfície en forma de plecs, mentre que els micobacteris de morfologia llisa no creixen en la interfase formant un tel, sinó que els bacils es troben distribuïts per tot el medi de forma homogènia.
- IX. Les colònies de morfologia llisa i les de morfologia rugosa tenen la capacitat d'adherir-se al poliestirè i al vidre, encara que al vidre les variants llises s'adhereixen millor que les rugoses, exceptuant-ne de *M. parafortuitum*, i en el poliestirè són les variants rugoses les que presenten més adherència respecte de les colònies llises.
- X. Mitjançant la transformació de la colònia llisa de *M. vaccae* ATCC<sup>T</sup> 15483 s'han obtingut soques mutants rugoses les quals presenten el transposó Tngfp integrat aleatòriament en el genoma micobacterià i no el plasmidi pEZ123.

## G. BIBLIOGRAFIA

- Ainsa J., Martin C., Cabeza M., De la Cruz F. i Mendiola, M. 1996. Construction of a family of *Mycobacterium/Escherichia coli* shuttle vectors derived from pAL5000 and pACY184: their use for cloning an antibiotic-resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene*. 176: 23-26.
- Alsteens D., Verbelen C., Dague E., Raze D., Baulard A.R. i Dufrène Y.F. 2007. Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. *Pflugers Arch*. 456: 117-125.
- Anderson R. J. 1939. *Fortschr Chem org Naturstoffe*. 3: 145.
- Argueta C., Yoder S., Holtzman A. E., Aronson T. W., Glover N., Berlin O. G., Stelma G. N. Jr , Froman S. i Tomasek P. 2000. Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from foods as possible exposure sources. *J Food Prot*. 63: 930-933.
- Arora K., Whiteford D.C., Lau-Bonilla D., Davitt C. M. i Dahl J.L. 2008. Inactivation of *Isr2* results in a hypermotile phenotype in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 190: 4291-4300.
- Asselineau J, Lanéelle G. 1998. Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front. Biosci*. 3: 164-174.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. i Struhl K. 1993. *Current protocol in molecular biology*. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, N.Y.
- Ballou C.E., Vilkas E. i Lederer E. 1963. Structural studies on the Myo-inositol Phospholipids of *Mycobacterium tuberculosis* (var. *bovis*, strain BCG). *J Biol Chem*. 238: 69-76.
- Barrera, L. The basics of clinical bacteriology. Chapter 3. Tuberculosis. 2007. From basic science to patient care. Ed. Palomino J.C., Cardueso S. i Ritacco V. ([www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com)).
- Behling C. A., Bennet B., Takayama K. i Hunter R. L. 1993. Development of a trehalose 6,6'-dimycolate model which explains cord formation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 61: 2296-2303.
- Belisle J.T. i Brennan P.J. 1989. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J. Bacteriol*. 171:3465-3470.
- Belisle J.T., Klaczkiewicz K., Brennen P.J. i Jacobs W.R. 1993. Inamine J.M. Rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. Characterization of genomic deletions resulting in the loss of glycopeptidolipid expression. *J Biol Chem*. 268:10517-10523.
- Besra G.S., i Chatterjee D.1994. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control*. Bloom, B. R. (ed), Washington. Pp. 285-306.
- Billman-Jacobe H., McConville M. J., Haites R. E., Kovacevic S. i Coppel R. L. 1999. Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*. 33: 1244-1253.
- Birren B., Lander E., Galagan J., Devon K., Nusbaum C., Borowsky M.L., Grabherr M., Mauceli E., Brockman W., Young S., LaButti K., Pushparaj V., Sykes S., Baldwin J., Fitzgerald M., Bloom T., Zimmer A., Settipalli S., Shea T., Arachchi H., Macdonald P., Abouelleil A., Lui A., Priest M., Berlin A., Gearin G., Brown A., Aftuck L., Bessette D., Allen N., Lubonja R., Lokyitsang T., Matthews C., Dunbar C., Benamara M., Nguyen T., Negash T., DeCaprio D., Crawford M., Koehrsen M., Engels R., Montgomery P., Pearson M., Howarth C., Kodira C., Zeng Q., Yandava C., O'Leary S., Alvarado L., Victor T. i Murray M. 2007. The Complete

- Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* F11. *The Broad Institute Genome Sequencing Platform*. Unpublished
- Branda S. S., Vik A., Friedman L. i Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS Microbiol.* 13: 20-26.
- Brennan P.J. 1988. *Mycobacterium* and other actinomycetes. *Microbial Lipids* Vol.1
- Brennan P.J. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 29-63.
- Cangelosi G. A., Palermo C. O. i Bermudez L. E. 2001. Phenotypic consequences of red-white colony type variation in *Mycobacterium avium*. *Microbiology.* 147:527-533.
- Cermak S. C. i Isbell T. A. 2003. Síntesis and physical properties of estolide-based functional fluids. *Ind Crops Products.* 18: 183-196.
- Chambaz E.M. i Horning E.C. 1969. Conversion of steroids to trimethylsilyl derivates for gas phase analytical studies; reactions of silylating reagents. *Anal Biochem.* 30: 7-24.
- Chatterjee D. i Khoo K. H. 2001. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol Life Sci.* 58: 2018-2042.
- Chauhan A, Madiraju M. V., Fol M., et al. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J Bacteriol.* 188: 1856-1865.
- Chen J.M., German G.J., Alexander D. C., Ren H., Tan T. i Liu J. 2006. Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 188: 633-641.
- Cirillo J. D., Barletta R. G., Bloom B. R. i Jacobs W. R. Jr. 1991. A novel transposon trap for mycobacteria: isolation and characterization of IS1096. *J Bacteriol.* 173 (24): 7772-7780.
- Cole S. T., Eiglmeier K., Parkbill J., James K. D., Thomson N. R., Wheeler P.R., Honore N., Garnier T., Churcher C., Harris D., Mungall K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R.M., Devlin K., Duthoy S., Feltwell T., Fraser A., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Lacroix C., Maclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Rutter S., Seeger K., Simon S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Taylor K., Whitehead S., Woodward JR. i Barrell B.G. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 409: 1007-1011.
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry 3<sup>rd</sup> C. E., Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby t., Jagels K. i Barrell B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393: 537-544.
- Copeland A., Lucas S., Lapidus A., Barry K., Detter J.C., Glavina del Rio T., Hammon N., Israni S., Dalin E., Tice H., Pitluck S., Singan V., Schmutz J., Larimer F., Land M., Hauser L., Kyrpidis N., Anderson I.J., Miller C. i Richardson P. 2006. Complete sequence of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *US DOE Joint Genome Institute*. Unpublished.
- Daffé M. i Draper P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol.* 39:131-203.
- Dailoux M., Laurain C., Weber M. i Hartemann PH. 1999. Water and nontuberculous mycobacteria. *Wat Res.* 33: 2219-2228.
- Doyle R.J., Rosenberg M. 1990. Eds. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

- Doyle R. J. 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect.* 2: 391-400.
- Draper P. i Daffé M. The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference to the capsule and outer permeability barrier. Chapter 17. Tuberculosis and the tubercle bacillus. 2005. Cole S.T., Eisenack K. D. i McMurray D. N. *ASM Press*.
- Draper P. 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci.* 3: 1253-1261.
- Drucker D. B. 1972. Bacterial colonial microstructure. *Microbios.* 6: 29-33.
- Eaton T., Falkinham J. O. III i von Reyn C.F. 1995. Recovery of *Mycobacterium avium* from cigarettes. *J Clin Microbiol.* 33: 2757-2758.
- EPA (2002) Mycobacteria: Drinking Water Fact Sheet, EPA-822-F-02-002
- Etienne G., Laval F., Villeneuve C., Dinadayala P., Abouwarda A., Zerbib D., Galamba A. i Daffé M. 2005. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155: is there a clue for the unique transformability of the strain?. *Microbiology.* 151: 2075-2086.
- Etienne G., Villeneuve C., Billman-Jacobe H., Astarie-Dequeker C., Dupont M-A. i Daffé M. 2002. The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology.* 148: 3089-3100.
- Falkinham III J.O., Nichols G., Bartram J., Dufour A. i Portaels F. 2004. Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance. *World Health Organization. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management.* Edited by S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour and J. Cotruvo. ISBN: 1 84339 059 0
- Falkinham III, J.O. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 9: 177-215.
- Falkinham III, J.O., Norton C.D. i LeChevallier M.W. 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other micobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* 67: 1225-31.
- Fedtke I., Mader D., Kohier T., Moll H., Nicholson G., Biswas R., Henseler K., Götz F., Zähringer U. I Peschel A. 2007. A *Staphylococcus aureus* *ypfP* mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. *Mol Microbiol.* 65: 1078-1091.
- Field S. K. I Cowie R. L. 2006. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *Chest.* 129: 1653-1672.
- Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J., DeBoy R.T., Dodson R., Gwinn M.L., Haft D.H., Hickey E.K., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M.D., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T.R., Weidman J., Khouri H.M., Gill J., Mikula A., Bishai W., Jacobs W.R. Jr., Venter J.C. i Fraser C.M. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.* 184: 5479-5490.
- Fordham von Reyn C., Waddell R. D., Eaton T., Arbeit R. D., Maslow J. N., Barber T. W., Brindle R. J., Gilks C. F., Lumio J., Lähdevirta J., Ranki A., Dawsin D. i Falkinham III J. O. 1993. Isolation of *Mycoabacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire and Kenya. *J Clin Microbiol.* 31: 3227-3230.

- Fredslund L., Sniegowski K., Wick L. Y., Jacobsen C. S., De Mot R. i Springael D. 2008. Surface motility of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degradin mycobactreia. *Res Microbiol.* 159: 255-262.
- Freeman R., Geier H., Weigel K. M., Do J., Ford T. E. i Cangelosi G. A. 2006. Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. *Appl Environm Microbiol.* 72: 7554-7558.
- Fregman G.B. i Smith D. W. 1961. Description of various colony forms of mycobacteria. *J Bacteriol.* 83: 819-827.
- Fregman G.B., Smith D. W. i Randall H. M. 1961. A mutant of a scotochromogenic *Mycobacterium* detected by colony morphology and lipid studies. *J Bacteriol.* 83: 828-836.
- Friebolin H. 1991. Basic One- and Two-dimensional NMR spectroscopy. Weinheim, VCH.
- Garbe T. R., Barathi J., Barnini S., Zhang Y., Abou-Zeid C., Tang D., Mukherjee R. i Young D.B. 1994. Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. *Microbiology.* 140: 133-138.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V. I Hewinson R.G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 7877-7882.
- Gonzalez-Merchand J.A., Estrada-Garcia I., Colston M. J. I Cox R. A.. 1996. A novel method for the isolation of mycobacterial DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 135: 71-77.
- Goren M.B. i Brennan P.J. 1979. Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities. In: Youmans GP, ed: *Tuberculosis*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders; p. 63-193 (Chapter 4).
- Goren, M.B. 1970. Sulfolipid-I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. *Biochim Biophys Acta.* 120:116-126.
- Goude R. i Parish T. 2008. Electroporation of Mycobacteria. JoVE, 15. (<http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=761>).
- Grant I. R., Ball H. J., Neill S. D. i Rowe M. T. 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows'milk at pasteurization temperatures. *Appl Environm Microbiol.* 62: 631-636.
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott B. A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F., Holland S. M., Horsburgh R., Huitt G., Iademarco M. F., et. al. 2007. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care.* 175: 397-416.
- Gupta K. C. 1981. Scanning electron microscopic studies of spreading and non-spreading type colonies of *Mycobacterium bovis* (BCG). *Ann Microbiol.* 132: 429-440.
- Hall-Stoodley, L i Lappin-Scott H. 1998. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiol Lett.* 168: 77-84.
- Hall-Stoodley, L. i Stoodley P. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *TRENDS Microbiol.* 13: 7-10.
- Harshey, R. M. 2003. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol.* 57: 249-73.
- Hartmans S., De Bont J. A. M. i Stackebrandt E. 2006. The Genus *Mycobacterium*-Nonmedical. *Prokaryotes.* 3: 889-918.

- Henrichsen J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev.* 36: 478-503.
- Holmqvist O. i Kolman A. 1978. *Mycobacterium phlei* PN-bb colonies: a morphological characterisation by scanning and transmission electron microscopy. *Ann Microbiol. (Paris)*. 129: 341-349.
- Horsburgh C. R. Jr, Chin D. P., Yajko D. M., Hopewell P. C., Nassos P. S., Elkin E. P., Hadley W. K., Stone E. N., Simon E. M. i Gonzalez P. 1994. Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 170: 362-367.
- Howard S.T., Rhoades E., Rect J., Pang X., Alsup A., Kolter R., Rick Lyons C. I Byrd T.F. 2006. Spontaneous reversión of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and invasive phenotype. *Microbiology.* 152:1581-1590.
- Hunter, P. 1997. Waterborne Disease: Epidemiology and Ecology. *New York, Wiley.*
- Hunter L. R., Venkataprasad N. i Olsen M.R. 2006. The role of trehalose dimycolate (cord factor) on morphology of virulent *M. tuberculosis in vitro*. *Tuberculosis.* 86: 349-356.
- Jackson, M., Stadthagen G. I Gicquel B. 2007. Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis, transport, regulation and biological activities. *Tuberculosis.* 87: 78-86.
- Kato M. 1972. Antibody formation to trehalose 6,6'-dimycolate (cord-formation) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 5: 203-212.
- Katoch, V.M. 2004. Infection due to non-TB mycobacteria. *Indian J Med Res.* 120: 290-304.
- Knothe G. i Nelsen T. C. 1998. Evaluation of the <sup>13</sup>C NMR signals of saturated carbons in some long-chain compounds. *J Chem Soc Perkin Trans.* 29: 2019-2026.
- Kocíncová D., Singh A. K., Beretii J-L., Rem H., Euphrasie D., Liu J., Daffé M., Etienne G. i Reytrat J-M. 2008. Spontaneous transposition of *IS1096* or *ISMsm3* leads to glycopeptidolipid overproduction and affects surface properties in *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberculosis.* 88: 390-398.
- Lai C-C, Lee L-N, Ding L-W, Yu C-J, Hsueh P-R i Yang P-C. 2006. Emerge of disseminated infections due to nontuberculous mycobacteria in non-HIV-infected patients, including immunocompetent and immunocompromised patients in a university hospital in Taiwan. *J Infect.* 53: 77-84.
- Lanéelle M-A., Silve G. López Marín L. M. i Daffé M. 1996. Structures of the glycolipid antigens of members of the third biovariant complex of *Mycobacterium fortuitum*. *Eur J Biochem.* 238: 270-279.
- Laurent J-P., Hauge K., Burnside K. i Cangelosi G. 2003. Mutational analysis of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol.* 185: 5003-5006.
- Lee Y. C. i Ballou C. E. 1965. Complet estructuras of the glycopospholipids of mycobacteria. *Biochem.* 4:1395-1404.
- Li L., Bannantine J.P., Zhang Q., Amonsin A., May B.J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S. i Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 12344-12349.

- Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G. i Zehnder A.J.B. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environm Microbiol.* 53: 1893- 897.
- Luquin M., Ausina V., López Calahorra F., Belda K., García Barceló M., Celma C. i Prats G. 1991. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 29: 120-130.
- Luquin M., Roussel J., Lopez-Calahorra F., Lanéelle G., Ausina V., Lanéelle M. A. (1990) A novel mycolic acid in a *Mycobacterium sp.* from the environment. *Eur J Biochem.* 192: 753-759.
- Marras T. K. I Daley C. L. 2002. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 23: 553-567.
- Marras T. K., Chedore P., Ying A. M. i Jamieson F. 2007. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. *Thorax.* 62: 661-666.
- Martín-Casabona N., Bahrmand A. R., Bennedsen J., Thomsen V. O., Curcio M., Fauville-Dufaux M., Feldman K., Havelkova M., Katila M. L., Köksalan K., Pereira M. F., Rodrigues F., Pfyffer G. E., Portaels F., Urgell J. R., Rüsç-Gerdes S., Tortoli E., Vincent V. i Watt B. 2004. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis.* 8: 1186-1193.
- Martínez A., Torello S. i Kolter R. 1999. Sliding motility in Mycobacteria. *J Bacteriol.* 181: 7331-7338.
- McNeil M.R. i Brennan P.J. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol.* 142: 451-463.
- Medeiros M. A., Dellagostin O. A., Armoa G. R., Degrave W. M., Mendonça-Lima L., Lopes M. Q., Costa J. F., Mcfadden J. i Mcintosh D. 2002. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. *Microbiology.* 148: 1999-2009.
- Medjahed H i Reytrat J-M. 2009. Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. *Appl Environm Microbiol.* 75: 1331-1338.
- Mendes R., O'Brien M.E.R., Miltra A., Norton A., Gregory R.K., Padhani A.R., Bromelow K.V., Winkley A.R., Ashley S., Smith I.E. i Souberbielle B.E. 2002. Clinical and immunological assessment of *Mycobacterium vaccae* (SRL172) with chemotherapy in patients with malignant mesothelioma. *Br J Cancer.* 86: 336-341.
- Minnikin D. E., Minnikin S. M., Parlett J. H., Goodfellow M. i Magnusson M. 1984. Mycolic acid patterns of som especies of *Mycobacterium.* *Arch Microbiol.* 139: 225-231.
- Minnikin, D.E., Hutchinson I.G., Caldicott A.B. 1980. Thin-Layer Chromatography of metanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *J Chromatogr.* 188: 221-233.
- Muñoz M., Lanéelle M., Luquin M., Torrelles J., Julian E., Ausina V. i Daffé M. 1997. Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis.* *FEMS Microbiol Lett.* 157: 251-259.
- Muñoz M., Raynaud C., Lanéelle M-A., Julián E., López Marín L. M., Silve G., Ausina V., Daffé M. i Luquin M. 1998. Seroreactive species-specific lipooligosaccharides of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. (formerly *Mycobacterium chelonae*-like organisms): identification and chemical characterization. *Microbiology.* 144:137-148.



- Nichols G., Ford T., Bartram J., Dufour A. i Portaels F. 2004. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management. Ed. Bartram J., Cotruvo J. A., Dufour A., Rees G. i Pedley S. ([www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/pathmycobact/en](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/pathmycobact/en))
- Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G. (2003). Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie*. 85:153-166.
- Ojha A., Anand M., Bhatt A., Kremer L., Jacobs W. R. Jr, Hatfull G. F. 2005. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*. 123: 762-764.
- Ojha A.K., Baughn A.D., Sambandan D., Hsu T., Trivelli X., Guerardel Y., Alahari A., Kremer L., Jacobs W.R. i Hatfull G.F. 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilm containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol*. 69: 164-174.
- Okada S., Nishiura M., Ogawa T. i Mori T. 1978. Electron microscopic study of colonies of *Mycobacterium lepraemurium*. *Int J Lepr*. 46: 364-371.
- Osborn, T. W. 1976. A study of some effects of subculture on two BCG strains. *Tubercle*. 57: 181-195.
- Osborn, T. W. 1979. Serial subculture of BCG on solid and liquid media. *Tubercle*. 60: 83-90.
- Peláez M., Orellana C., Marques A., Busquets M., Guerrero A. i Manresa A. 2003. Natural estolides produced by *Pseudomonas* sp 42a2 grown on oleic acid: production and characterization. *J Am Oil Chem Soc*. 80: 859-866.
- Pelacic V., Jackson M., Reytrat J-M., Jacobs W. R., Gicquel B. i Guilhot C. 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 10955-10960.
- Phillips, M.S. i Fordham von Reyn C. 2001. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 33: 1363-74.
- Pinner M. 1935. Atypical acid fast microorganisms. *Am Rev Tuberc*. 32: 424-45.
- Pinto R., Saunders B. M., Camacho L. R., Britton W. J., Gicquel B. Triccas J. A. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* defective in phthiocerol dimycocerosate translocation provides greater protective immunity against tuberculosis than the existing bacille Calmette-Guerin Vaccine. *J Infect Dis*. 189: 105-112.
- Primm T P., Lucero C. A. i Falkinham III. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 17: 98-106.
- Prod'hom G., Lagier B., Pelacic V., Hance A. J., Gicquel B i Guilhot C. 1998. A reliable amplification technique for the characterization of genomic DNA sequences flanking insertion sequences. *FEMS Microbiol Lett*. 158: 75-81.
- Ranes M.G., Rauzier J., Lagranderie M., Gheorghiu M i Gicquel B. 1990. Functional analysis of pAL500, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: Construction of a "Mini" *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol*. 172: 2793-2797.
- Recht J. i Kolter R. 2001. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 183: 5718-5724.
- Recht J., Martínez A., Torello S. i Kolter R. 2000. Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 182: 4348-4351.

- Reid G., Cuperus P. L., Bruce A. W., van der Mei H. C., Tomczek L., Khoury A. H., Busscher H. J. 1992. Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. *Appl Environ Microbiol.* 58: 1549-1553.
- Ren H., Dover L. G., Islam S. L., Alexander D. C., Chen J. M., Besra G. S. i Liu J. 2007. Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Mol Microbiol.* 63(5): 1345-1359.
- Rosenberg M. Buivids I.A. i Ellen R.P. 1991. Adhesion of *Actinomyces viscosus* to *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis*-Coated hexadecane droplets. *J Bacteriol.* 173: 2581-2589.
- Rosenberg M. Perry A., Bayer E.A., Gutnick D.L., Rosenberg E i Ofek I. 1981. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect Immun.* 33: 29-33.
- Rotzsche H. 1991. Gas chromatographic analysis of fatty acid salts. *J Chromat. A.* 552: 281-288.
- Runyon, E.H. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am.* 43: 273-290.
- Ryll R., Kumazawa Y., Yano I. 2001. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids-a review. *Microbiol. Immunol.* 45: 801-811.
- Sacchi R., Addeo F i Paolillo L. 1997. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magn Reson Chem.* 35: S133-S145.
- Saviola B. i Bishai W. 2006. The Genus *Mycobacterium*- Medical. *Prokaryotes.* 3: 919-933.
- Schoney J. S. i Sweet L. 2008. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glicobiology.* 18: 832-841.
- Seki M., Honda I., Fujita I., Yano I., Yamamoto S. i Koyama A. 2009. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: A comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine.* 27: 1710-1716.
- Snapper S., Melton R., Mustafa S., Kieser T i Jacobs W. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 4: 1911-1919.
- Steck P.A., Schwartz B.A., Rosendahl M.S., Gray G.R. 1978. Mycolic acids. A reinvestigation. *J Biol Chem.* 253: 5625-5629.
- Stinear T.P., Seemann T., Harrison P.F., Jenkin G.A., Davies J.K., Johnson P.D., Abdellah Z., Arrowsmith C., Chillingworth T., Churcher C., Clarke K., Cronin A., Davis P., Goodhead I., Holroyd N., Jagels K., Lord A., Moule S., Mungall K., Norbertczak H., Quail M.A., Rabinowitsch E., Walker D., White B., Whitehead S., Small P.L., Brosch R., Ramakrishnan L., Fischbach M.A., Parkhill J. i Cole S.T. 2008. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 18: 729-741.
- Stinear T.P., Seemann T., Pidot S.J.A., Frigui W., Reysset G., Garnier T., Meurice G., Simon D., Bouchier C., Ma L., Tichit M., Porter J.L., Ryan J.E., Johnson P.D.R., Davies J.K., Jenkin G.A., Small P.L.C., Jones L.M., Tekaia F., Laval F., Daffe M., Parkhill J. i Cole,S.T. 2007. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res.* 17: 192-200.

- Sutherland I.W. 2001. The biofilm matrix- an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9: 222- 227.
- Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev.* 16:319-354.
- Tortoli, E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48:159-178
- Trias J, Benz R. 1994. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 14: 283-90.
- Wallace R. J., Brown B. A. i Griffith D. E. 1998. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 52: 453-90.
- Wang C.C. i Rook G.A.W. 1998. Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed *Mycobacterium vaccae*. *Immunology.* 93: 307-313.
- Wayne L.G. i Kubica G.P. 1986. The mycobacteria. Int: Holt J.G., Sneath P.H., Mair N.S. i Sharpe M.E. (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore, M.D. pp. 1435-1457.
- Weimin L., Guanglu J., Zihui L., Huakun H., Liquan C., Miao T., Xuxia Z., Tiangui N., Petrini B. i Chuanyou L. 2007. Non-tuberculous mycobacteria in China. *Scan J Infect Dis.* 39: 138-141.
- WHO. World Healt Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2009. ([www.who.int](http://www.who.int)).
- WHO. World Healt Organization. Leprosy: global situation. 2007. ([www.who.int/lep/situation/en](http://www.who.int/lep/situation/en))
- Williams M. M., Yakrus M. A., Arduino M. J., Cooksey R. C., Crane C. B., Banerjee S. N., Hilborn E. D. i Donlan R. M. 2009. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 75: 2091-2098.
- Wu C-W., Schmoller S. K., Bannantine J. P., Eckstein T. M., Inamine J. M., Livesey M., Albercht R. i Talaat A. M. 2009. A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microb Pathog.* 46: 222-230.
- ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)) List of validly published names of mycobacteria. 2005.
- Yajko D. M., Chin D. P., Gonzalez P. C., Nassos P. S., Hopewell P. C., Reingold A. L., Horsburgh C.R. Jr, Yakrus M. A., Ostroff S. M. i Hadley W. K. 1995. *Mycobacterium avium* complex in water, food, and soil samples collected from the environment of HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 9: 176-182.
- Yamagami H., Matsumoto T., Fujiwara N., Arakawa T., Kaneda K., Yano I. i Kobayashi K. 2001. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun.* 69: 810-815.
- Yamazaki Y., Danelishvili L., Wu M., MacNab M., i Bermudez L. E. 2006. *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 72: 819-825.
- Yoder S., Argueta C., Holtzman A., Aronson T., Berlin O. G. W., Tomasek P., Glover N., Froman S. i Stelman G. JR. 1999. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Appl Environ Microbiol.* 65: 2650-2653.
- Zambrano M.M. i Kolter R. 2005. Mycobacterial biofilms: A greasy way to hold it together. *Cell.* 123:762-764.

Zheng H., Lu L., Wang B., Pu S., Zhang X., Zhu G., Shi W., Zhang L., Wang H., Wang S., Zhao G. i Zhang Y. 2008. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS ONE*. 3: 2375.

## **H. COMPENDI D'ARTICLES**



## I. AGRAÏMENTS

Aquest treball no l'hauria pogut fer sense l'ajuda de molta gent que m'anima i em dona suport a tot allò que faig.

M'agradaria donar les gràcies, en primer lloc a tota la gent del laboratori que durant aquests anys de tesi he tingut al meu costat: Marina, Esther, Eli, Silvia i Cris. Amb la seva ajuda he fet realitat un dels meus somnis: treballar en un laboratori i el més important sentir el que se sent fent recerca, una sensació molt gratificant però difícil d'explicar.

A Marina pel seu assessorament, ensenyament i suport constant en aquests quasi sis anys de treball. A Esther per tota l'ajuda rebuda des del primer moment que vaig entrar al laboratori. A Eli, Silvia i Cris per les bones estones passades, per donar-me suport tant professional com personal quan més ho necessitava.

Al laboratori del Jordi Más, en especial a Núria Vigués, per les bones estones passades tant en el laboratori com a l'hora de dinar. Gràcies per estar allà i recolzar-me sempre.

També m'agradaria donar les gràcies a totes les persones i grups de fora del departament de Genètica i Microbiologia, que m'han assessorat i ajudat en aquesta tesi, sense tots ells aquest treball no tindria sentit: Teodor Parella (Servei RMN, UAB), Alex Sánchez (Servei de Microscopia, UAB), Isidre Casals (Serveis científicotècnics, UB), al gabinet de la llengua catalana i molt especialment al Grup de Carlos Martín (Grupo de Genètica de Micobacterias, UZ), per acollir-me com una més del grup els nou mesos de la meva estada.

*Gracias Carlos, por creer en mi trabajo, darme la oportunidad de ampliar mis estudios en tu laboratorio, asesorarme y transmitirme un enorme optimismo día a día en el laboratorio.*

*También me gustaría darles las gracias a Isabel Ojal, José Antonio Ainsa y Sofía Samper, por su colaboración y dedicación tanto profesional como personal durante mi estada en su laboratorio.*

*Y como no, no puedo dejar de dar las gracias a toda la trupe del laboratorio de Zaragoza por su excelente compañerismo y por su apoyo: Ana Picó, Begoña Gracia, Ainhoa Lucía, Ainhoa Arbués, Carmen Lafoz, Silvia Lobe, Jesús Gonzalo, Nadia Ferrer, Ana Belén Gómez, Alberto Cebollada, Dessi Vaneva y sobretodo a mi nena mañica Henar Alonso, gracias por ser como*

*eres, por brindarme desde el primer día tu confianza y apoyo incondicional y por todos los buenos ratos que hemos pasado juntas dentro y fuera del labo. Gracias Henar de todo corazón!!*

*No podría dejar de dar las gracias también a Marta Pastor y Piedad, mis compis de piso. Gracias por estar siempre allí, por hacerme sentir en el piso como en casa, me ha encantado compartir y disfrutar juntas de grandes momentos como “la noche Lambrusco”. Sois geniales!!! Os llevo en el corazón.*

A la meva família, una part molt important del meu procés d'aprenentatge com a persona. Sense tots ells, en especial els meus pares, no hauria arribat a onestic ara. Gràcies per donar-me l'oportunitat d'estudiar, d'animar-me i de recolzar-me en tot moment. Gràcies de tot cor.

A tots els amics que he anat fent al llarg del temps: Patricia Abella i Salvador Badillo (SENTO DOJO), Conchi, Jose María, “Homi”, la colla del poble,...Per la seva amistat i pels bons moments al seu costat: rient, cantant, plorant i ballant.

A la família Portabella-Cuñado, per bolcar-se tant en mi i fer-me sentir com a una més d'ells, des de el primer dia.

A Binky, Sinpa i Sushi, per aquests anys ple de carícies, besitos i bons moments mirant la tele.

I, per últim, a Rafa, per estar sempre al meu costat durant aquests darrers deu anys. Per la teva comprensió, ajuda i sobretot per la teva paciència per aguantar-me dia a dia. Sense tu la meva vida no tindria sentit. T'estimo amb tot el meu cor!!!

Gràcies a tots.