



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

**USO DEL PIGMENTO DEINOXANTINA OBTENIDO DE *DEINOCOCCUS SP*  
UDEG-P1 COMO PROTECCIÓN A UV-B Y DAÑO OXIDATIVO APLICADO A  
CEPAS SUSCEPTIBLES.**



BEATRIZ BELÉN SILVA ARÉVALO  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2020

Profesor Guía: Miguel Martínez Poblete  
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias  
Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

---

Dr. Miguel Martínez Poblete  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Carlos Tomás Smith Gallardo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción



---

Dr. José Becerra Allende  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a todos quienes me apoyaron durante la realización de esta tesis y me brindaron contención. En especial a compañeros del laboratorio que siempre estuvieron dispuestos a ayudar y resolver mis dudas. Ruth Contreras por el apoyo técnico y al personal de el laboratorio de Química y Productos Naturales por permitirme el acceso al rotavapor para la realización de este trabajo.

En segundo lugar a mi familia y amigos que me animaron en momentos de cansancio y frustración.

A mi profesor tutor Dr. Miguel Martínez Poblete que siempre estuvo dispuesto a ayudar y resolver mis dudas en todos los temas concernientes. También por apoyarme y darme la oportunidad de poder realizar este trabajo en momentos tan difíciles como los que han acontecido en este último semestre a nivel país y mundial. A pesar de la grave situación de salud pública que estamos viviendo me apoyo para poder presentar esta investigación.



## Tabla de Contenidos

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>1-i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>1-iii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1-iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1-v</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1    RADIACIÓN UV EN LA TIERRA.....	1
1.2    NIVELES DE RADIACIÓN UV .....	2
1.3    ESTRÉS CAUSADO POR RADIACIÓN UV.....	4
1.4    MICROORGANISMOS QUE PROSPERAN EN CONDICIONES DE ALTO ESTRÉS AMBIENTAL.....	5
1.5    MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS FRENTE AL ESTRÉS EXÓGENO Y ENDÓGENO.....	6
1.6    EL GÉNERO <i>DEINOCOCCUS</i> .....	8
1.7    CEPAS SUSCEPTIBLES A ESTRÉS.....	15
<b>2. HIPOTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>17</b>
1.8    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
1.9    CEPAS BACTERIANAS.....	18
1.10   CRECIMIENTO BACTERIANO.....	18
1.11   EXTRACCIÓN DEL PIGMENTO DEINOXANTINA DE <i>DEINOCOCCUS</i> SP UDEC- P1.....	19
1.12   ENSAYO UV-B PARA LAS CEPAS BACTERIANAS <i>C. PINATUBONENSIS</i> AEO106 Y <i>E. COLI</i> HB 101 EN AUSENCIA Y PRESENCIA DEL PIGMENTO DEINOXANTINA.....	19
1.13   ENSAYO CON PERÓXIDO DE HIDROGENO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	20
1.14   ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA DEL PIGMENTO EN LAS CEPAS <i>E. COLI</i> HB 101 Y <i>C. PINATUBONENSIS</i> AEO106, FRENTE A LA PRESENCIA DE PERÓXIDO DE HIDROGENO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	20
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
1.15   CRECIMIENTO BACTERIANO.....	21
1.16   EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-B EN LA SOBREVIVENCIA DE LAS BACTERIAS SUSCEPTIBLES.....	23
1.17   ENSAYO DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	25
1.18   EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-B EN LA SOBREVIVENCIA DE LAS BACTERIAS SUSCEPTIBLES EN PRESENCIA DEL PIGMENTO DEINOXANTINA EXTRAÍDO DE <i>DEINOCOCCUS</i> UDEC-P1.....	27
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>38</b>
<b>8. PROYECCIONES</b> .....	<b>38</b>
<b>9. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>39</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura. 1 Estructura química de la deinoxantina (obtenido de Lemee et al. 1997).....	12
Figura. 2 Cinética de crecimiento de las cepas bacterianas en estudio.....	21
Figura. 3 Recuento viable de las cepas en estudio. ....	22
Figura. 4 Efecto de la radiación UV-B en la sobrevivida de las cepas bacterianas <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>E. coli</i> HB101.....	23
Figura. 5 Porcentaje de sobrevivencia de cepas bacterianas <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>E. coli</i> HB101 a la exposición a la radiación UV-B.....	24
Figura. 6 Efecto de Peróxido de Hidrógeno en la viabilidad bacteriana de la cepa <i>C. pinatubonensis</i> AEO106. Concentraciones 1,3,5 y 10 mM. Control: sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	25
Figura. 7 Efecto del Peróxido de Hidrógeno en la viabilidad bacteriana de la cepa <i>E. coli</i> HB101. Concentraciones 1,3,5 y 10 mM. Control: sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	26
Figura. 8 Efecto de la radiación UV-B en la sobrevivida de las cepas bacterianas <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 mas la adición de una concentración de 75 µg/ml del pigmento deinoxantina.....	28
Figura. 9 Porcentaje de sobrevivencia de cepas bacterianas <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>E. coli</i> HB101 a la exposición a la radiación UV-B mas la adición de una concentración de 75 µg/ml del pigmento el pigmento deinoxantina.....	29

## RESUMEN

Teniendo en cuenta que la radiación UV, ante la que se enfrentan muchos microorganismos entre los que se incluyen las bacterias antárticas y patagónicas, es un potente agente genotóxico que exhibe dos máximos con acción mutagénica y letal (radiación UV-A y UV-B), causantes de daños directos sobre el ADN y, secundariamente, producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), se ha llevado a cabo un estudio con la cepa *Deinococcus sp* UDEC-P1 aislada de la Patagonia para demostrar su resistencia frente a este tipo de radiación. Dicha especie consta de una maquinaria eficiente para la reparación del ADN; principalmente, enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como, antioxidantes no enzimáticos (pigmentos carotenoides) entre los que destaca la deinoxantina. Considerando su capacidad para secuestrar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y anión radical superóxido ( $O_2^-$ ), se postula que este pigmento protegerá a microorganismos susceptibles frente a la exposición a radiación UV-B y daños por estrés oxidativo ocasionado por EROs. Por tanto, se procedió a extraer el pigmento deinoxantina de la cepa *Deinococcus sp*. UDEC-P1 y se realizaron los correspondientes ensayos frente a la exposición a la radiación UV-B para las cepas *E. coli* HB 101 y *C. pinatubonensis* AEO106 en ausencia y presencia de dicho pigmento. Paralelamente, se efectuaron experimentos con  $H_2O_2$ , para estimar la actividad protectora de la deinoxantina. Los resultados confirman la susceptibilidad de las cepas *E. coli* HB 101 y *C. pinatubonensis* AEO106 frente a la exposición a radiación UV-B, además de la exposición a  $H_2O_2$  utilizado como generador de estrés oxidativo. Sin embargo, en presencia del pigmento, se observa una protección en la *C. pinatubonensis* AEO106 ante la exposición a radiación a UV-B a una concentración de 75  $\mu\text{g/ml}$ .

**Palabras clave:** Radiación UV-B; *Deinococcus sp* UDEC-P1; pigmento deinoxantina; especies reactivas de Oxígeno (EROs),  $H_2O_2$ .

## ABSTRACT

The UV radiation, which many microorganisms including Antarctic and Patagonian bacteria face, is a powerful genotoxic agent that exhibits two maximums with mutagenic and lethal action (UV-A and UV-B radiation), causing direct damage to DNA and, secondarily, production of Reactive Oxygen Species (ROS). Taking that into account a study has been carried out with the strain *Deinococcus* sp. UDEC-P1 isolated from Patagonia to demonstrate its resistance to this type of radiation. This species has efficient equipment for DNA repair, mainly antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as non-enzymatic antioxidants (carotenoid pigments), among which deinoxanthin stands out. Considering its ability to sequester hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and superoxide radical anion ( $O_2^-$ ), it is postulated that this pigment will protect susceptible microorganisms from exposure to UV-B radiation and damage from oxidative stress caused by ROS. Therefore, the deinoxanthin pigment was extracted from the strain *Deinococcus* sp. UDEC-P1 and the corresponding tests against UV-B radiation were performed for the strains *E. coli* HB101 and *C. pinatubonensis* AEO106 in the absence and presence of this pigment. At the same time, experiments with  $H_2O_2$  were carried out to estimate the protective activity of deinoxanthin. The results confirm the susceptibility of *E. coli* HB101 and *C. pinatubonensis* AEO106 strains to UV-B radiation exposure, in addition to the exposure to  $H_2O_2$  used as an oxidative stress generator. However, in the presence of the pigment, *C. pinatubonensis* AEO106 is protected against exposure to UV-B radiation at a concentration of 75  $\mu$ g/ml.

**Key words:** UV-B Radiation; *Deinococcus* sp UDEC-P1; deinoxanthin pigment; Reactive Oxygen Species (ROS), peroxide hydrogen.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Radiación UV en la Tierra

La luz solar es la principal fuente de radiación sobre la Tierra, y está compuesta por un espectro continuo de radiación electromagnética que se divide en tres partes principales de longitudes de onda: ultravioleta (45%), visible (5%) e infrarroja (50%) (Hussein 2005). La radiación UV abarca desde 100 a 400 nm, y es su vez sub-clasificada en tres categorías: onda larga UV-A (315 - 400 nm), onda media UV-B (280 – 315 nm) y onda corta UV-C (100 – 280 nm) (Di Capua 2011). La cantidad de radiación UV recibida en la superficie del planeta tiene implicaciones importantes para la salud humana, los ecosistemas terrestres y acuáticos, los ciclos biogeoquímicos y la calidad del aire (McKenzie et al. 2011).

Los ciclos biogeoquímicos influyen en la concentración de gases traza en la atmósfera, incluido el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y otros gases de efecto invernadero, así como los contaminantes del aire (Sulzberger et al. 2019). A la inversa, los ciclos biogeoquímicos en los ecosistemas terrestres y acuáticos se ven afectados por los cambios en el clima, el agotamiento del ozono atmosférico ( $\text{O}_3$ ) y calentamiento de regiones polares, es decir, fenómenos como los aumentos en la frecuencia e intensidad de los incendios forestales, sequías, el deshielo de los suelos del permafrost y los eventos de precipitación intensa, más frecuentes y de mayor duración, en algunas regiones de la Tierra (Sulzberger et al.2019).

La investigación sobre estos temas fue estimulada por la predicción, hace más de 30 años, de que la capa de ozono estratosférica estaba en riesgo, pues su agotamiento fue el más pronunciado y que existirían aumentos consecuentes en la radiación UV-B, ya que la fracción de radiación que alcanzaba la superficie terrestre sería cada vez mayor (Di Capua 201). Los aumentos de UV-B debidos a la disminución de las cantidades de  $\text{O}_3$  se observaron durante los años 80 y 90, especialmente en latitudes altas ( $> 60^\circ$ ) (McKenzie et al. 2011). Sin embargo, debido



al éxito del Protocolo de Montreal en la reducción de las sustancias que agotan el  $O_3$ , esta ya no disminuye y en los sitios no contaminados, que no se ven afectados por los cambios en la cubierta de nubes, los aumentos en los rayos UV no han continuado en los últimos años (McKenzie et al. 2011).

## 1.2 Niveles de radiación UV

En las últimas décadas se ha establecido, que la radiación UV corresponde a un potente agente genotóxico (Ravanat et al. 2001). Los espectros de acción de mutagenicidad y letalidad de la luz solar exhiben dos máximos, ambos ubicados en la región UV del espectro: UV-A y UV-B (Ravanat et al. 2001). La capa de ozono absorbe eficientemente la radiación hasta los 310 nm y por lo tanto filtra toda la UV-C y la mayor parte de la UV-B (95%), en cambio, la radiación UV-A no es absorbida (Duthie et al. 1999).

El Protocolo de Montreal, centrado en reducir las emisiones y abundancias atmosféricas de sustancias que causan el agotamiento del ozono ( $ODS_s$ ) (Bais et al. 2015) está funcionando, pero el  $O_3$  tardará varias décadas en volver a los niveles de 1980 (McKenzie et al. 2011). Las concentraciones atmosféricas de sustancias que agotan el  $O_3$  están disminuyendo, y las cantidades de la columna de este, ya no está en reducción (McKenzie et al. 2011). Se espera que el  $O_3$  en latitudes medias regrese a los niveles de 1980 antes de mediados de siglo, un poco antes de lo previsto anteriormente (Bais et al. 2015). No obstante, existe desacuerdo sobre la magnitud y la importancia estadística de este aumento (Bais et al. 2015), ya que las cantidades de  $O_3$  total están sujetas a una gran variabilidad año a año causada por cambios en la circulación atmosférica. (Bais et al. 2015). Además de que la tasa de recuperación será más lenta en latitudes altas (Bais et al. 2015), especialmente en la Antártida, en las próximas décadas (McKenzie et al. 2011). Sin embargo, otros factores además del  $O_3$  determinan la intensidad de la radiación UV en la superficie de la Tierra, como los componentes de la atmósfera (nubes, aerosoles), actividad solar, así como fenómenos de reflectividad superficies (Bais et al. 2015).

En Chile, varios lugares están expuestos a la energía solar, con altos niveles de radiación UV (Orellana et al. 2018). Entre ellos, destacan el salar de Huasco (3800 m.s.n.m.) (Pérez et al. 2017), que corresponde a un humedal salino ubicado en el altiplano chileno. Determinado por atributos como su amplio rango de salinidad, gran amplitud térmica diaria (-10 a +25°C) y una de las radiaciones solares más altas registradas en el mundo (sobre 1000 Wm<sup>-2</sup> de irradiancia) (Pérez et al. 2017). El desierto de Atacama por su parte, se caracteriza por su gran altitud, prevalente, condiciones sin nubes y sequedad extrema. Su clima distintivo es el resultado de la confluencia de una zona subtropical de alta presión, la corriente fría de Humboldt en la costa, vientos marinos, así como el efecto de la sombra andina de lluvia y posición latitudinal de la región (Orellana et al. 2018) e intensa radiación solar UV- A y B (Cordero et al. 2016), pues las mediciones espectrales realizadas en el rango de 0–5100 m de altitud, la irradiancia de la superficie aumenta con la altitud en aproximadamente un 27% en el rango infrarrojo, 6% en el rango visible y 20% en el rango ultravioleta (Cordero et al. 2016). Aunque la irradiación UV-B representa una fracción muy pequeña (0.2–0.3%) de la irradiación total, la irradiancia UV-B relativamente alta en el desierto de Atacama requiere una cuantificación cuidadosa debido a los posibles efectos adversos en la biosfera (Cordero et al. 2016).

La Antártida se encuentra dominada por fuertes gradientes de temperatura (-10°C a -2°C), salinidad (35–150%) e irradiación (<0.1% a 1–5% de radiación UV) (Orellana et al. 2018). Propiedades altamente variables y en última instancia regidas por la temperatura del aire y cubierta de nieve (Orellana et al. 2018). La consecuencia principal del agotamiento del ozono, en este territorio, ha sido identificada con efectos negativos asociados en los ecosistemas terrestres, acuáticos y ciclos biogeoquímicos (Sulzberger et al. 2019).

### 1.3 Estrés causado por radiación UV.

La radiación UV-B produce daños directos en el ADN debido a reacciones fotoquímicas en el ADN celular, las cuales involucran principalmente la absorción directa de fotones UV-B por las bases nitrogenadas. Mayoritariamente constituyentes de pirimidina, incluyendo timina, citosina y la 5-metilcitosina en menor medida (Ravanat et al. 2001). También se demostró recientemente que las bases de purina de la misma manera, pueden ser objetivo de la radiación UV-B, aunque en menor proporción (Ravanat et al. 2001). Los efectos químicos de la radiación UV-B en el ADN se explican principalmente en términos de la formación de fotoproductos diméricos de bases nucleotídicas como dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs), compuestos de pirimidina (6-4) y pirimidona ((6-4)-PP) (Svobodoba et al. 2006), que involucran dos bases de pirimidina adyacentes: citosina-citosina, citosina-timina o timina-timina, hidratos de pirimidina y entrecruzamientos entre ADN y proteínas (Mardones 2013), con un fuerte potencial mutagénico, caracterizado por los altos niveles de transversiones aleatorias CC-TT y C-T (Svobodoba et al. 2006). Aunque también se ha demostrado que induce daño oxidativo promoviendo la producción de EROs, al igual que la radiación UV-A (Shiu & Lee 2005).

El efecto inducido por la radiación UV-A en las células es principalmente indirecto vía procesos oxidativos iniciados por fotosensibilización endógena, pues es poco eficaz en inducir daño directo en el ADN, ya que no es absorbida por el ADN nativo (Alscher et al. 1997). Luego de la exposición a UV-A se generan EROs, tales como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y radicales  $OH^-$ , que median el daño a proteínas, lípidos y azúcares (Ravanat et al. 2001) y que oxidan la pentosa presente en el ADN rompiendo la hebra de la molécula, (Diffey 1991).

A pesar de que este mecanismo de lesión es aceptado para UV-A, recientemente se ha reportado que este rango de la radiación UV es capaz de inducir la producción de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs), efecto de lesión directa del ADN, característico de la radiación UV-B, en células de roedores (Rochette et al. 2003).

#### **1.4 Microorganismos que prosperan en condiciones de alto estrés ambiental.**

La radiación al igual que otros parámetros como la temperatura, disponibilidad de nutrientes, presión, desecación, contaminación y pH, son factores que deben enfrentar los microorganismos, para esto poseen adaptaciones que les permiten sobrevivir y reproducirse frente a estas circunstancias ambientales, consideradas extremas para otros organismos (Tanghe et al. 2003).

El término extremófilo fue acuñado por Macelroy en 1974 e incluye microorganismos, plantas y animales que sobreviven en condiciones ambientales consideradas extremas para el hombre (Kumar et al. 2010). Los microorganismos extremófilos tienen una distribución taxonómica amplia y son un grupo funcionalmente diverso (Raddadi et al. 2015) que incluye termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalófilos, halófilos, barófilos o piezófilos, metalófilos y radiófilos. Estos microorganismos producen enzimas extremófilas (extremozimas) y biomoléculas orgánicas protectoras (extremolitos) que les transmiten características de supervivencia en condiciones ambientales, consideradas extremas (Raddadi et al. 2015), es por ello que poseen el potencial de producir biomoléculas de gran relevancia, como fuente de enzimas, y otros materiales biológicos para los sectores biotecnológicos e industrial (Neifar et al. 2015). Además de su uso en el estudio de la astrobiología (Khodadad et al. 2017).

Las técnicas biotecnológicas modernas inducen o activan la biosíntesis de los pigmentos sensibles a la radiación y las enzimas reparadoras del ADN para proteger o proporcionar una oportunidad para que otros organismos vivan en un ambiente rico en radiación ultravioleta principal (radiación UV mayor a  $600 \text{ J m}^{-2}$ ), que incluye los espectros UV-A, UV-B y UV-C (Singh & Gabani 2011).

Los organismos resistentes se pueden cultivar en presencia de luz UV para inducir genes que producen metabolitos que protegen contra la radiación (Singh & Gabani 2011). Se estima que algunos de estos compuestos, proporcionarán medicamentos útiles, especialmente antibióticos y medicamentos contra el cáncer, así como productos agrícolas de importancia comercial (Kumar et al. 2010).

### 1.5 Mecanismos de protección de los microorganismos frente al estrés exógeno y endógeno.

El estrés oxidativo endógeno en los microorganismos aeróbicos que utilizan el oxígeno molecular ( $O_2$ ) se produce en la respiración u oxidación de nutrientes para obtener energía. Los subproductos reactivos del oxígeno (EROs), tales como el anión radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), son generados continuamente en las células que crecen aeróbicamente (Cabisco et al. 2000). La mayoría de estos productos derivan de la reducción univalente del  $O_2$  catalizado por varias enzimas de la cadena respiratoria asociada a la membrana (Cabisco et al. 2000). Sin embargo, cuando se produce aumento de los EROs, debido a parámetros o factores de estrés de naturaleza física, química o biológica (Di Capua 2011), se conduce a un desbalance prooxidante en el sistema biológico que genera una situación conocida como estrés oxidativo (Di Capua 2011).

Todos los agentes exógenos que dañan el ADN conocidos, inducen en concomitancia, daño oxidativo a otras macromoléculas celulares a través de la producción de EROs, incluida la radiación ionizante, radiación UV, desecación, entre otros (Slade & Radman 2011).

La carga aniónica del  $O_2^-$ , le impide ejercer actividad electrofílica con moléculas ricas en electrones (Di Capua 2011). Es por esto que solo puede reaccionar con pocas biomoléculas, entre ellas las enzimas que contienen centros Fe-S, como aconitasa y dehidratasa, con carga positiva local en los átomos de Fe, siendo particularmente susceptibles al daño oxidativo del anión (Imlay 2003). Esto tiene como consecuencia no sólo la pérdida de actividad enzimática, sino también un aumento intracelular de hierro que como se mencionó, cataliza la producción de radical  $OH^\cdot$ , a partir de  $H_2O_2$  (Kehrer 2000).

La importancia del  $H_2O_2$  deriva de su capacidad para generar el intermediario más reactivo, el radical  $OH^\cdot$ , que reacciona por difusión con la mayoría de las biomoléculas (Di Capua 2011). Las membranas lipídicas, especialmente los fosfolípidos, que contienen ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles a la peroxidación, dada por la reacción inicial del radical  $OH^\cdot$  con el ácido graso insaturado (Di Capua 2011; Wang & Schellhorn 1995). Un efecto primario de la peroxidación lipídica es una disminución de la fluidez de la membrana, que afecta las propiedades de esta y puede alterar significativamente las proteínas unidas a ella (Wang & Schellhorn 1995). Como consecuencia, actúa como un amplificador, formándose más radicales y los ácidos grasos poliinsaturados se degradan a una variedad de productos (Cabiscol et al. 2000). Algunos de ellos, como los aldehídos, son muy reactivos y pueden dañar moléculas como las proteínas, provocando modificaciones de las cadenas laterales de aminoácidos y, en consecuencia, se altera su estructura. Entre los más estudiados se encuentra el malonaldehído (MDA) (Cabiscol et al. 2000).

El ADN es también un objetivo principal (Wang & Schellhorn 1995); los radicales  $OH^\cdot$ , atacan tanto la base como las porciones de azúcar, produciendo roturas de cadena simple y doble en el esqueleto, aductos de grupos de base y azúcar, y enlaces cruzados con otras moléculas, lesiones que bloquean la replicación (Di Capua 2011; Cabiscol et al. 2000).

En ambientes de alto estrés oxidativo y radiación (rayos UV, gamma y rayos X), los radiófilos prosperan debido a su capacidad para reparar daños extensos en el ADN. Los radiófilos se encuentran entre varios grupos microbianos y especies que incluyen bacterias de los géneros *Deinococcus*, *Bacillus*, *Rubrobacter* y *Kineococcus*, y la familia Geodermatophilaceae y cianobacterias, incluidos los géneros *Nostoc* y *Chroococcididisis* (Raddadi et al. 2015), entre las especies bacterianas, destacan *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus radiophilus* y *Thermococcus radiotolerans* (Neifar et al. 2015).

## 1.6 El género *Deinococcus*.

La condición conocida como estrés oxidativo puede resultar en un grave peligro para la vida celular, pues las EROs son conocidas por su citotoxicidad a través de alteraciones en ADN, ARN, proteínas y lípidos tanto en la estructura y como en la función (Zeng et al. 2017), la evolución ha permitido el desarrollo de mecanismos de detoxificación de las EROs y de reparación de los daños por ellas producidos (Zeng et al. 2017).

El género *Deinococcus* presenta una resistencia notable a una variedad de daños causados por la radiación ionizante, la desecación, la radiación UV y los agentes oxidantes (Gerber et al. 2015) sumado a su alta capacidad para reparar el daño del ADN en comparación con otras especies bacterianas conocidas (Ranawat & Rawat 2017).

En los últimos años, los investigadores han comenzado a usar este género en biotecnología y biorremediación (Gerber et al. 2015). Más recientemente, la secuenciación de varios *Deinococcus* y el análisis genómico comparativo, han proporcionado una nueva perspectiva sobre el potencial de este género (Gerber et al. 2015). Las características tales como la acumulación de genes que codifican los sistemas de limpieza, que eliminan los componentes tóxicos de las células orgánicas e inorgánicas están muy extendidos en el género (Gerber et al. 2015).

Las especies del género *Deinococcus* crecen a una temperatura que varía de 4 a 55 ° C y se han reagrupado en un linaje filogenético bacteriano distinto relacionado con el género *Thermus* (Rainey et al. 2005). Los parientes más cercanos de *Deinococcus* son *Trueperaceae*, *Thermales* (*Marinithermus*, *Thermus*, *Oceanithermus* y *Vulcanithermus*); Ningún miembro de este género ha sido implicado como patógeno (Gerber et al. 2015).

Se han aislado más de 60 especies diferentes en ambientes muy diversos, tales como como polvo de aire y muestra de aire , suelos del desierto, agua contaminada por arsénico, ambientes fríos en la Antártida, aguas termales, biopelículas en la superficie de las máquinas de papel, sitios radiactivos, intestino de una termita que se alimenta de madera (Gerber et al. 2015), la superficie de la nave espacial Phoenix en el Centro Espacial Kennedy de agencia espacial NASA, donde se ensambló la nave (Stepanov et al. 2014; Vaishampayan et al. 2014) y lagos patagónicos chilenos (Fernández et al. 2012)

*Deinococcus radiodurans* cepa R1 fue la primera deinobacteria descubierta, aislada en 1956 de la carne enlatada irradiada con rayos X (Anderson et al. 1956). *D. geothermalis* es una bacteria termófila resistente a las radiaciones reportado de aguas termales (Ferreira et al. 1997). *D. geothermalis* y *D. radiodurans* son igualmente resistentes a la radiación ionizante y UV a sus temperaturas de crecimiento óptimas de 50 y 32 ° C, respectivamente (Ferreira et al. 1997). Ambos tienen un conjunto conservado de genes responsables de la resistencia extrema (Ferreira et al. 1997). La supervivencia de las bacterias *Deinococcus* después de la irradiación ha dado lugar a algunas descripciones caprichosas, incluyendo que tenían un origen extraterrestre (Ranawat & Rawat 2017). Sin embargo, la comparación del genoma completo de *D. geothermalis* con *D. radiodurans* y dos especies de *Thermus*, ha establecido firmemente los pasos evolutivos que llevaron a la aparición del grupo *Deinococcus-Thermus* en sus ancestros terrestres (Makarova et al. 2007).

El género *Deinococcus*, originalmente identificado como *Micrococcus*, corresponde a bacterias no esporulantes en forma de bacilos o coccoides (Ranawat & Rawat 2017). *Deinococcus* a menudo forma tétradas (Gerber et al. 2015).

La mayoría de las bacterias se pueden clasificar fácilmente como Gram-positivas o Gram-negativas debido a la presencia o ausencia, respectivamente, de una pared celular gruesa de peptidoglicano. La envoltura celular de *Deinococcus* difiere según la especie y muestra una estructura y composición inusuales (Gerber et al. 2015).



*Deinococcus indicus*, *D. grandis* y *D. deserti* cepa YIM 007T poseen tinción Gram-negativa, mientras que la mayoría de las otras especies de *Deinococcus* presentan tinción Gram-positiva (Gerber et al. 2015).

Según lo señalado por Makarova et al. 2001, las siguientes seis capas de la envoltura celular se han identificado mediante microscopía electrónica, en *D. radiodurans* (i) la capa más interna es la membrana plasmática común a todas las células y está compuesta de lípidos inusuales, incluidas las cadenas de alquilamina, (ii) le sigue una pared celular de peptidoglicano (iii) la tercera capa es única y puede estar compuesta por una matriz de pequeños compartimentos no caracterizados, (iv) la cuarta capa es otra membrana y es la membrana externa, (v) la quinta capa es una zona electrolúcida distinta y (vi) la sexta capa consiste en subunidades de proteínas hexagonales empaquetadas regularmente (conocida como capa S o capa intermedia empaquetada hexagonalmente).

*D. radiodurans* puede crecer bajo radiación ionizante (dosis de hasta 20 kGy de radiación gamma) y bajo radiación UV (dosis de hasta 1.000 J m) (Kumar et. al 2010). Su estrategia de supervivencia consiste principalmente en la inducción de ciertos genes, proteínas y enzimas específicas de la vía en el mecanismo de reparación del ADN (Singh & Gabani 2011).

El sistema de eliminación de EROs en *D. radiodurans* consisten en enzimas antioxidantes como la SOD y la CAT que juegan un papel importante en la resistencia de *D. radiodurans* (Tian et al. 2009), la actividad de la SOD es 6 veces y la CAT es 30 veces más alta que la de *Escherichia coli* (Zeng et al. 2017). La enzima SOD representa la primera línea de defensa de las células frente al estrés oxidativo, cataliza la conversión del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Rosales 2006). Las CAT también forman parte de la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo, catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, transformándolo en agua y oxígeno (Rosales 2006).

Además varias propiedades metabólicas ayudan a este microorganismo a superar el estrés oxidativo (Slade & Radman 2011): proteólisis e importación de péptidos y aminoácidos exógenos, la conversión de glucosa en precursores de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP), supresión de la producción de EROs por la inducción del bypass de glioxilato del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y una reducción en el número de enzimas de la cadena respiratoria y enzimas con grupos de hierro-azufre, y gránulos de almacenamiento de carbohidratos y polifosfatos (Slade & Radman 2011; Krisko & Radman 2013).

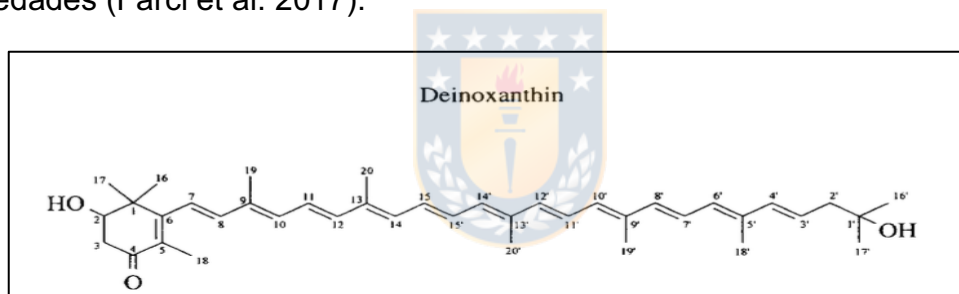
Como bacteria proteolítica, *D. radiodurans* codifica sistemas para la degradación de proteínas y el catabolismo de aminoácidos (Slade & Radman 2011). Se postula que el reciclaje de proteínas que no sobrevivieron a las condiciones de estrés, minimice las demandas biosintéticas y contribuya a los complejos antioxidantes de aminoácidos y péptidos con manganeso, pues esta cepa tiene un contenido de manganeso intracelular excepcionalmente alto, que está presente como pequeños complejos con ortofosfato y péptidos, que al eliminar  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , protegen específicamente las proteínas contra el daño oxidativo (Slade & Radman 2011).

El metabolismo de la glucosa también es importante para la recuperación de los agentes que dañan el ADN (Slade & Radman 2011).

Además, presenta mecanismos no enzimáticos principalmente pigmentos carotenoides como el licopeno,  $\beta$ -caroteno y deinoxantina, esta última con una mayor habilidad para secuestrar  $H_2O_2$  (Slade & Radman 2011) y  $^1O_2$  (Tian et al. 2007). Los carotenoides son un grupo de pigmentos con propiedades antioxidantes que se distribuyen por igual entre diferentes grupos de organismos con funciones que abarcan desde los elaborados procesos de protección contra las EROs que ocurren en condiciones de estrés oxidativo (Farci et al. 2016) hasta la fotoprotección relacionada con la fotooxidación en organismos fotosintéticos (Farci et al. 2016).

Se ha descrito a algunos pigmentos como los carotenoides como “atrapadores” eficaces de EROs (Fraser & Bramley 2004). El  $O_2$  transfiere la energía al carotenoide generando el estado base de oxígeno ( $^3O_2$ ) y el estado de triplete del carotenoide, que vuelve a su estado fundamental por la liberación de su energía

(Foote 1968). Los carotenoides protegen al ADN del daño oxidativo, a las proteínas de carbonilación y a las membranas de peroxidación lipídica (Slade & Radman 2011). La deinoxantina es un carotenoide monocíclico que contiene funciones de unión al oxígeno, como los grupos hidroxilo y cetónicos, organizados en un extremo 2-hidroxi-4-oxo- $\beta$  (Fig.1) (Tian et al. 2009), que existe de forma peculiar en *Deinococcus* y está relacionado con el color de la cepa (Zeng et al. 2017), conocida por su capacidad para eliminar las EROs y, en general, por sus propiedades antioxidantes (Ji 2010). Debido a sus características estructurales, la deinoxantina cae en el grupo reactivo de las xantofilas, a causa de su contenido de oxígeno, son más polares que los carotenoides normales y también más reactivos, lo que explica sus propiedades biológicas (Farci et al. 2017). Además, como es típico de los carotenoides, la larga cadena de polieno e incluso su grupo hidroxilo asociado en la posición C-1' puede jugar un papel fundamental en la configuración de estas propiedades (Farci et al. 2017).



**Figura. 1** Estructura química de la deinoxantina (obtenido de Lemee et al. 1997).

Se descubrió que este carotenoide estaba involucrado en la protección de la bacteria de la luz UV-C, durante la desecación (Farci et al. 2016). Investigaciones anteriores descubrieron que *CrtI*, *CrtB* y *CrtO* corresponden a tres genes principales que influyen en la biosíntesis de la deinoxantina, la eliminación de estos genes hizo que la bacteria perdiera su coloración (Zeng et al. 2017) y que sufriera hipersensibilidad frente al estrés oxidativo inducido por EROs (Tian et al. 2009). Un mutante incoloro aislado de la cepa parental de *D. radiodurans* es aproximadamente 100 veces más sensible al tratamiento que la de tipo salvaje, al  $H_2O_2$  a una concentración de 50 mM (Farci et al. 2016).

No obstante, otro estudio demostró que *D. radiodurans* era casi 100 veces más sensible que *E. coli* (una bacteria no carotenogénica) al oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) producido fotodinámicamente a partir de la luz visible (Farci et al. 2016). Sin embargo, *D. radiodurans* exhibió aproximadamente cinco órdenes de magnitud mayor resistencia que *E. coli* a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) (Farci et al. 2016).

Además, la deinoxantina ha sido descrita como un cofactor no covalentemente unido a la proteína A (Farci et al. 2017), constituyente principal de la capa S que corresponde a matrices paracristalinas bidimensionales de proteínas o glicoproteínas (Farci et al. 2016), que cubren el lado externo de la pared celular, y contribuye a proporcionar diferentes propiedades, desde la forma hasta la protección celular (Farci et al. 2017). Estudios con mutantes a las que se le eliminó la proteína A de la capa S mostraron una disminución significativa de la resistencia a la radiación UV-C, especialmente en condiciones de desecación (Farci et al. 2016). Además, se demostró que la misma proteína se une a la deinoxantina, un potente antioxidante con características espectrales que podrían proporcionar la base para el posible mecanismo de resistencia a la radiación UV (Farci et al. 2016).

Las bacterias antárticas y patagónicas, como consecuencia de la disminución de la capa de ozono, se encuentran más expuestas a elevada radiación ultravioleta, además deben hacer frente condiciones extremas debido a las bajas temperaturas (Helbling et al. 1995). Pues en ambientes fríos, los microorganismos están frecuentemente expuestos a un aumento del estrés oxidativo, debido a su menor demanda de ATP y la acumulación de electrones derivados de la cadena respiratoria, que aumentan concomitantemente la síntesis de moléculas de EROs, sin embargo, para ello poseen distintas estrategias de supervivencia (Fernández et al. 2012). Para este estudio se utilizó la cepa patagónica, *Deinococcus* sp UDEC-P1 cepa aislada de muestras de agua de lagos patagónicos chilenos (Fernández et al. 2012). La Patagonia se distingue por estar compuesta por una extensa estructura de fiordos fríos y canales. Los lagos están caracterizados por una baja concentración de nutrientes y bajo contenido de carbono orgánico disuelto (Aguayo

et al. 2017) además de variaciones de temperaturas afectadas por la temporada que van desde -4°C en invierno hasta 20°C en verano como lo que ocurre en el caso del Lago Gris (Aguayo et al. 2017). Se ha informado además la presencia de formado numerosos campos hidrotermales (Orellana et al. 2018), que incluyen las termas de Porcelana y las aguas termales de Cahuelmo, que contiene aguas ricas en minerales metálicos y elementos como como pirita, polonio, magnetita y calcopirita (Orellana et al. 2018). Por otro lado, las aguas termales de Porcelana están ubicadas a 100 m.s.n.m. en el norte de la Patagonia. Porcelana es un manantial prístino caracterizado por una bastante extensa gradiente térmico (38°–69°C) y pH neutro (Orellana et al. 2018).

*Deinococcus* sp UDEC-P1 se caracteriza por ser una cepa que se tiñe de Gram positiva, aunque su envoltura celular comparte algunas características con las bacterias Gram negativas (Lin et al. 2016) como su pared celular multicapa, propiedad estructural del género *Deinococcus* (Fernández et al. 2012) y composición lipídica (Slade & Radman 2011), con temperatura de crecimiento de 30°C (Tapia 2017). *Deinococcus* sp cepa UDEC-P1 posee un circuito de Quorum Sensing completo, y esta propiedad está relacionada con el estrés oxidativo, permitiendo que la especie colonice ambientes que se consideran extremos (Fernández et al. 2012), ya que un estresor puede aumentar la expresión de un gen similar a luxS en el género, que codifica para LuxS-ribosilhomocisteinasa, esta enzima es la responsable de la síntesis de la señal AI-2 que corresponde a un receptor del circuito de Quorum Sensing, que aumenta a su vez la transcripción de genes que participan en la respuesta a un aumento de estrés oxidativo (Fernández et al. 2012).

*Deinococcus* sp UDEC-P1, posee particularidades estructurales similares a *D. radiodurans* (Fernández et al. 2012), como su resistencia a múltiples estresores entre ellas, la radiación UV, pues absorbe en el rango de los 300 nm aproximadamente, lo que sugiere que puede participar en la absorción de la radiación ultravioleta, debido a que la luz ultravioleta, tiene una longitud de onda entre 1nm y cerca de 380 nm, donde comienza el espectro visible, radiaciones

ionizantes, desecación, entre otros (Tortora et al. 2007). El sistema de eliminación de EROs descrito para esta especie bacteriana consiste en enzimas antioxidantes como la SOD y CAT principalmente, además de antioxidantes no enzimáticos, principalmente pigmentos carotenoides, similar a la deinoxantina de *Deinococcus radiodurans* (Tapia et al. 2019) con una gran eficiencia para secuestrar  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  (Lemee et al. 1997) sin embargo no participaría directamente en proteger al ADN (Mardones 2013).

### 1.7 Cepas susceptibles a estrés.

La cepa y *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 caracterizada por ser aerobia, Gram negativa, no esporulada y flagelada. Se puede encontrar tanto en el suelo como en el agua. Posee crecimiento óptimo a 30°C (Sato 2006) y es un modelo de biodegradación de cloroaromáticos (Pérez et al. 2008), pues al igual que muchas otras bacterias ambientales, utiliza una gama de estos compuestos como fuentes de carbono degradando a partir de vías bioquímicas especializadas (Pérez et al. 2015), ya que transporta el conjunto completo de genes de *tfd* que codifican la vía enzimática para la completa mineralización de compuestos como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4-metil-2-clorofenoxiacetato (MCPA) (Svenningsen et al. 2017)

Esta bacteria, así como el derivado isogénico resistente a tetraciclina *Cupriavidus pinatubonensis* AEO106, se ha estudiado extensamente en relación con la comprensión de la degradación de xenobióticos del tipo cloroaromáticos (Svenningsen et al. 2017).

La radiación UV solar ha sido reconocida durante mucho tiempo como un agente nocivo capaz de interferir con el crecimiento normal de *E. coli* (Muela et al. 2002; Pizarro 1995). Los efectos letales de la radiación UV-B causa la formación dímeros de timina en los ácidos nucleicos de las células expuestas a la radiación (Muela et

al.2002), además de potenciar reacciones fotodinámicas con la posterior formación de radicales libres (Muela et al.2002).

*E. coli* HB101 es una cepa auxotrófica de tipo K12 para leucina, prolina y tiamina (Rothen et al. 1998). *E. coli* HB101 pGEc47 recombinante contiene un plásmido con los genes de oxidación de alcano de *Pseudomonas oleovorans* para la conversión de alcanos a los respectivos ácidos alcanóicos (Rothen et al. 1998).

Se espera presentar, a través de esta tesis , las bases para determinar un posible efecto de protección frente a la radiación UV-B y daño oxidativo, utilizando como modelo células bacterianas, para contribuir con antecedentes, sobre si este efecto, es potencialmente extrapolable hacia otras células. Pues se conoce que este pigmento posee efectos protectores para células neoplásicas, pues mostraron una actividad citotóxica a una concentración de 40 µg/ml (Tapia et al. 2019).

Considerando lo anterior se postula la siguiente pregunta

¿El pigmento Deinoxantina obtenido de *Deinococcus* sp. UDEC-P1, protegerá de la radiación UV-B, y de la presencia de EROs, a cepas bacterianas susceptibles como *E. coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106?

## 2. HIPOTESIS

Considerando las características del pigmento deinoxantina, como su eficacia para secuestrar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y anión radical superóxido ( $O_2^-$ ) y su contribución a la resistencia a la radiación UV, se postula que este pigmento, protegerá a microorganismos susceptibles frente a la exposición a radiación UV-B y daños por estrés oxidativo ocasionado por EROs como,  $H_2O_2$ .

### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el pigmento deinoxantina obtenido de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 protegerá, frente a la radiación UV-B y al daño oxidativo a cepas bacterianas susceptibles a la radiación como *Escherichia coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106.

#### 1.8 Objetivos Específicos.

1.- Determinar la sobrevivencia de las cepas *E.coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106, expuestas a radiación UV-B en presencia y ausencia del pigmento deinoxantina obtenido a partir de la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1.

2.- Determinar en las cepas *E. coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106, el efecto protector de la deinoxantina frente a la presencia de EROs como, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.9 Cepas bacterianas.

Las cepas utilizadas corresponden a *Deinococcus* sp UDEC-P1, *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB 101, las cuales pertenecen a la colección de cepas existentes en el Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. *Deinococcus* sp UDEC-P1 y *Cupriavidus pinatubonensis* AEO106 fueron incubadas a 30°C y *E. coli* HB101 a 37°C, todas fueron cultivadas en caldo LB durante 48 h. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado para la validación estadística de los datos a obtener.

### 1.10 Crecimiento bacteriano.

Para las cepas *Deinococcus* sp UDEC-P1, *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB 101 se utilizaron matraces de 100 ml que contenían 50 ml de caldo LB, los cuáles fueron inoculados con cultivos de cada cepa correspondiente con aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/ml de densidad celular. Posteriormente fueron incubadas a 30°C para el caso de *C. pinatubonensis* AEO106 y *Deinococcus* sp UDEC-P1 con agitación constante de 120 rpm, para esta última (Svenningsen et al. 2017; Tapia 2017; Mardones 2013) y para el caso de *E. coli* HB 101 incubada a 37°C (Rothen 1998).

Se determinó el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro (TU-1810 Split Beam, UV-VIS Spectrophotometer, Bausch & Lomb) (Mardones 2013) obteniendo alícuotas de 1 ml al inicio del experimento y luego de incubar por 2,4, 6,8,10,12,14, 24,26,28,30,32 y 48 h, además de recuento en placa de células viables por la técnica de la microgota, a los tiempos 0,10,32 y 48 h.

### 1.11 Extracción del pigmento deinoxantina de *Deinococcus* sp UDEC- P1.

La cepa bacteriana pigmentada, *Deinococcus* sp UDEC-P1 fue cultivada en matraces Erlenmeyer conteniendo 1 L de caldo LB en agitación constante a 120 rpm a 30 °C hasta alcanzar una densidad celular de  $1,0 \times 10^9$  UFC/ml. El contenido fue centrifugado a 9000 g por 5 minutos a 4 °C (Fernández et al. 2012). El pellet celular fue lavado 3 veces con agua destilada estéril, y nuevamente centrifugado y resuspendido en 25 ml de metanol. El contenido fue centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante filtrado a través de filtros de acetato de celulosa de 0,22  $\mu$ m y posteriormente concentrado por evaporación a presión reducida, el extracto seco fue reextraído con acetona, concentrado en rotavapor y finalmente almacenado a 4° C (Tapia et al. 2019).

### 1.12 Ensayo UV-B para las cepas bacterianas *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB 101 en ausencia y presencia del pigmento deinoxantina.

Para evaluar el efecto de la radiación UV-B, en las cepas bacterianas *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB 101 se cultivaron en caldo LB a 30° C y 37° C respectivamente, por 48 h; luego, alícuotas de 1 ml se lavaron 3 veces con medio salino mínimo (MSM), centrifugando a 5000 r.p.m. por 5 minutos finalmente el pellet de células fue resuspendido en 9 ml de MSM (Gerhardt 1981). Esta resuspensión bacteriana, se dispuso en una placa Petri, cuya altura de la suspensión bacteriana no superó 2 mm (Slaninova et al. 2018; Mardones 2013) y se obtuvo una alícuota de 0,5 ml al inicio del experimento. Posteriormente se expuso a una lámpara de tipo UV-B con una altura de 15 cm (Watrin & Prieur 1996). Las suspensiones bacterianas, se expusieron radiación UV-B durante 1, 2, 5, 10 y 15 minutos. Se determinó la sobrevivencia bacteriana mediante recuento de células viables por la técnica de la microgota sembrando por triplicado, alícuotas de 20  $\mu$ l de las diluciones seriadas en la superficie de placas con agar LB.

Se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente, pero se realizó el ensayo frente a la exposición a radiación UV-B adicionando el pigmento deinoxantina extraído de *Deinococcus* sp UDEC-P1, a una concentración de 75  $\mu$ g/ml (Tapia et al. 2019).

### 1.13 Ensayo con Peróxido de Hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Desde un cultivo bacteriano en LB, conteniendo aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/ml de las cepas *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB 101, se agregó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a las concentraciones de 1, 3, 5 y 10 mM (Mardones 2013). Se obtuvieron alícuotas de 0,5 ml al inicio del experimento, y cada 10 minutos hasta completar los 30 minutos además de un control sin peróxido. Con el propósito de evaluar la sobrevivencia de las cepas por la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Se determinó el recuento de bacterias viables por el método de la microgota (Wang & Schellhorn 1995).

### 1.14 Estimación de la actividad protectora del pigmento en las cepas *E. coli* HB 101 y *C. pinatubonensis* AEO106 , frente a la presencia de Peróxido de Hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

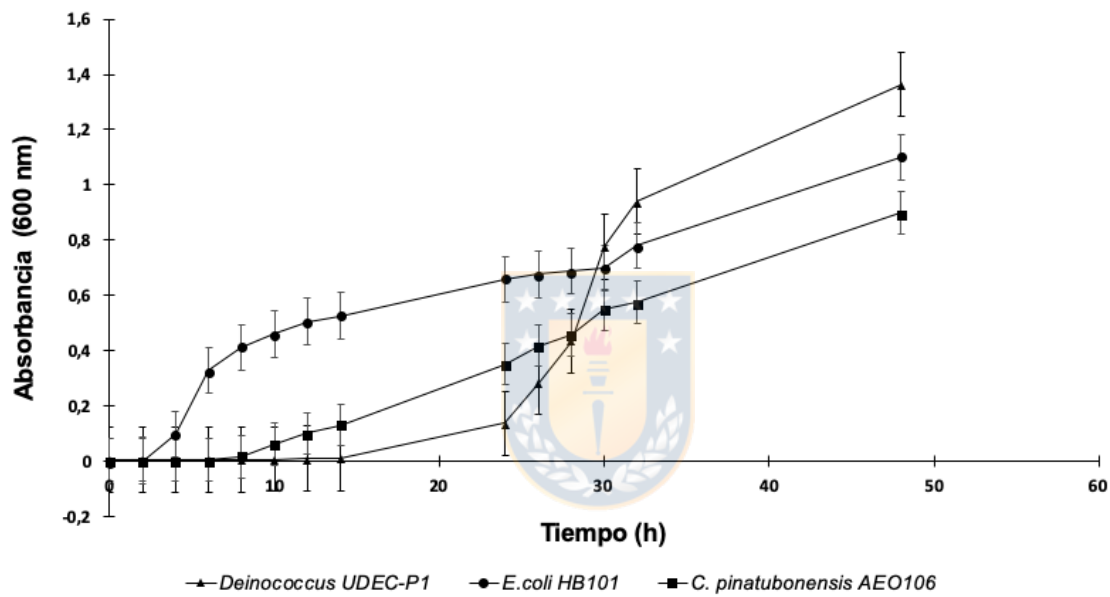
Utilizando el protocolo descrito en el punto 3.5, se realizó el ensayo frente a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las cepas en estudio, pero adicionando el pigmento deinoxantina, a una concentración de 75 µg/ml (Tapia et al. 2019).



## 5. RESULTADOS

### 1.15 Crecimiento bacteriano.

La cinética de crecimiento se muestra en la (Figura 2) de las cepas bacterianas, cultivadas a 30 °C para el caso de *Deinococcus* sp UDEC-P1 y *C. pinatubonensis* AEO106 y 37°C para *E. coli* HB101. Durante 48 h. Mediante densidad óptica y recuento de células viables cultivables a las 0,10,32 y 48 horas (Figura 3).



**Figura. 2** Cinética de crecimiento de las cepas bacterianas en estudio.

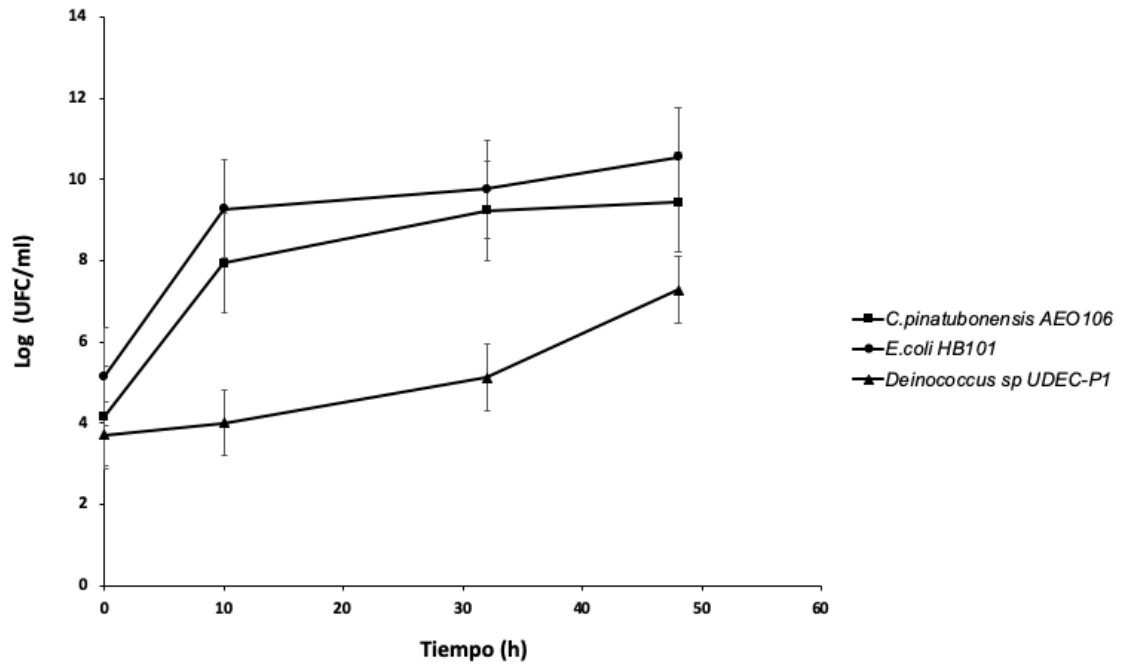
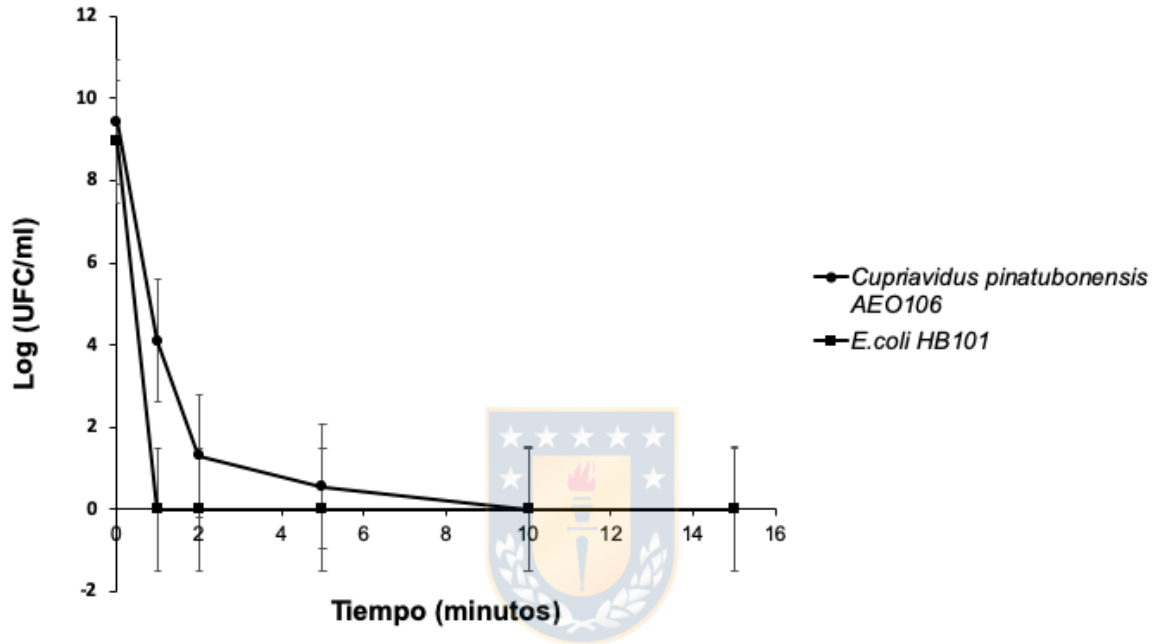


Figura. 3 Recuento viable de las cepas en estudio.

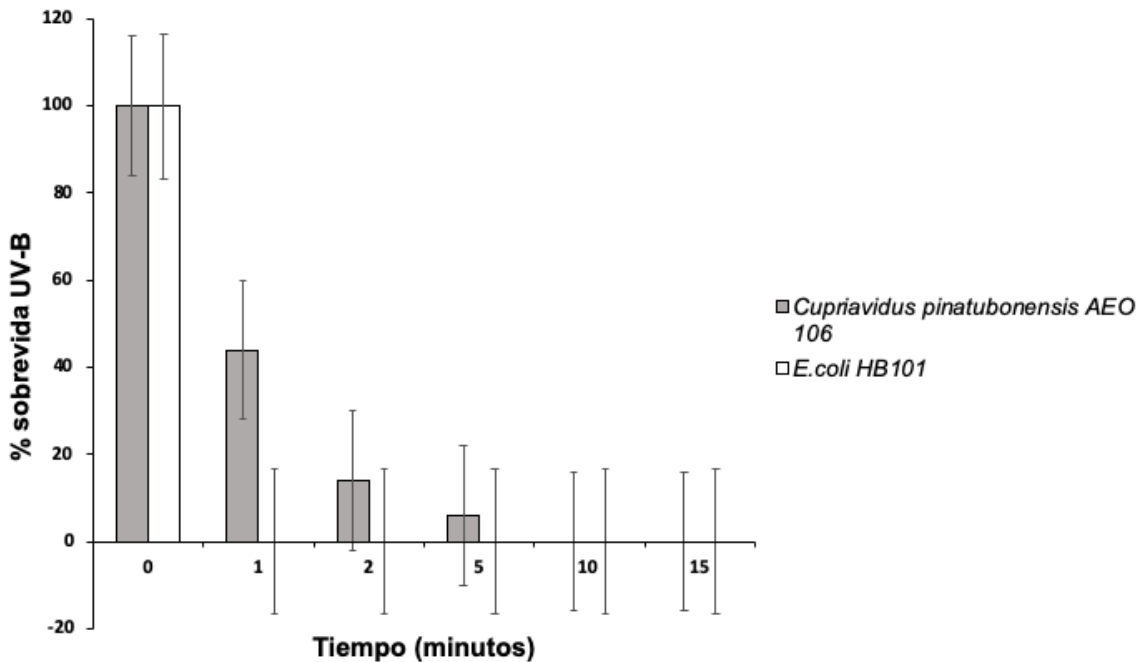


### 1.16 Efecto de la radiación UV-B en la sobrevivencia de las bacterias susceptibles.

Se determinó la sobrevivencia bacteriana de las cepas en estudio *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB101, a la radiación UV-B, realizando recuento viable de las cepas al inicio del experimento y luego de someter a pulsos de 1,2,5,10 y 15 minutos (Figuras 4 y 5).



**Figura. 4** Efecto de la radiación UV-B en la sobrevivencia de las cepas bacterianas *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB101.



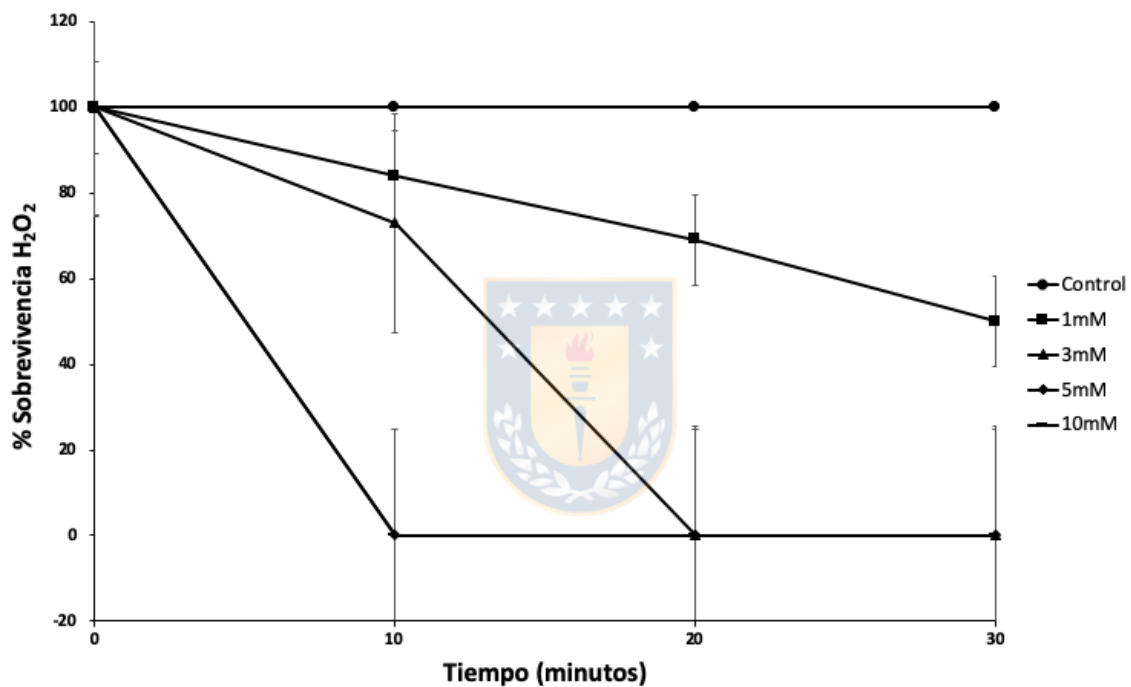
**Figura. 5** Porcentaje de sobrevivencia de cepas bacterianas *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB101 a la exposición a la radiación UV-B.

Para 1 minuto de exposición el recuento de células viables de la cepa *C. pinatubonensis* AEO106 decrece un 56% (5,32 logaritmos) aproximadamente, para los 2 minutos un 86% (8,13 logaritmos) y para los 5 minutos un 94% (8,87 logaritmos) y a los 10 y 15 minutos disminuye en un 100%, no siendo detectada mediante la técnica de recuento viable. Produciéndose muerte celular con respecto a la densidad celular inicial de  $10^9$  UFC/ml (9,43 Log UFC/ml), pues la disminución en la viabilidad en más de 3 logaritmos se considera muerte celular según el criterio de Pearson et al. 1980 (Figuras 4 y 5).

Mientras que la cepa *E. coli* HB101 disminuye su sobrevivencia al minuto de exposición en un 100% y durante el transcurso del tiempo de ensayo (15 minutos en total) no siendo detectada por la técnica de recuento viable. Produciéndose muerte celular (Pearson et al. 1980), con respecto a la densidad celular inicial de  $10^9$  UFC/ml (8,95 Log UFC/ml) (Figuras 4 y 5).

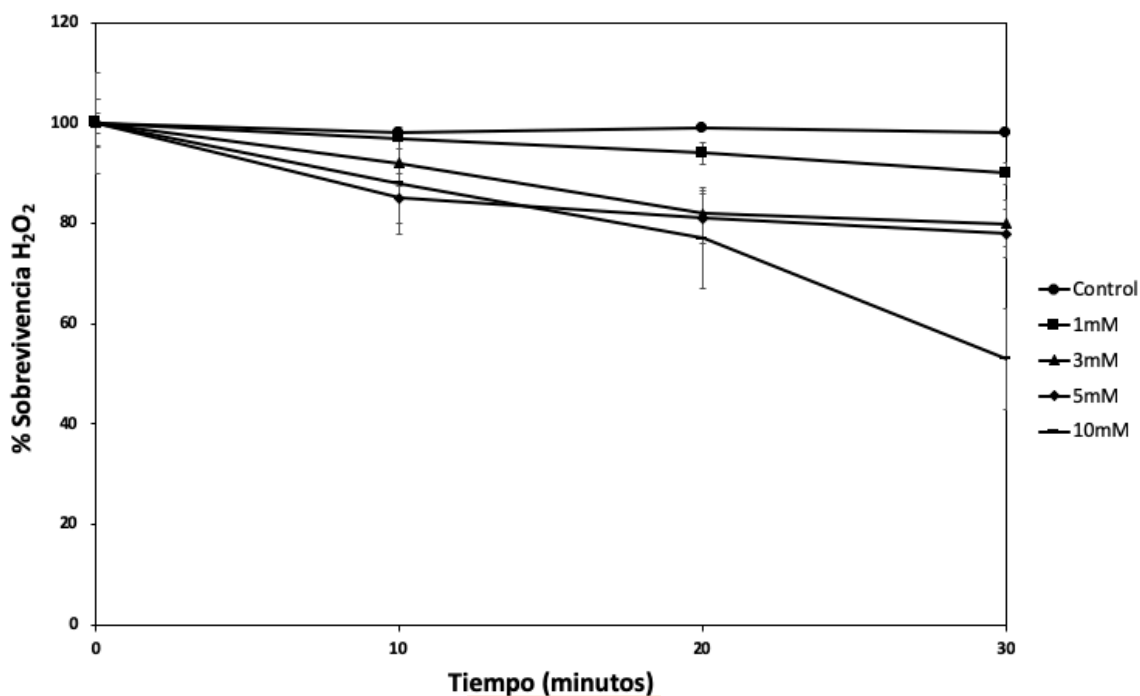
### 1.17 Ensayo de Peróxido de Hidrógeno.

Se realizó un ensayo de viabilidad en presencia de Peróxido de Hidrógeno para determinar el efecto que produce un aumento de  $H_2O_2$  en el medio y como puede influir en el crecimiento bacteriano. Para ello se realizó recuento viable de las cepas en estudio *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB101 al inicio del experimento y durante 30 minutos utilizando las concentraciones de 1,3,5 y 10 mM de  $H_2O_2$  (Figuras 6 y 7).



**Figura. 6** Efecto del Peróxido de Hidrógeno en la viabilidad bacteriana de la cepa *C. pinatubonensis* AEO106. Concentraciones 1,3,5 y 10 mM. Control: sin  $H_2O_2$ .





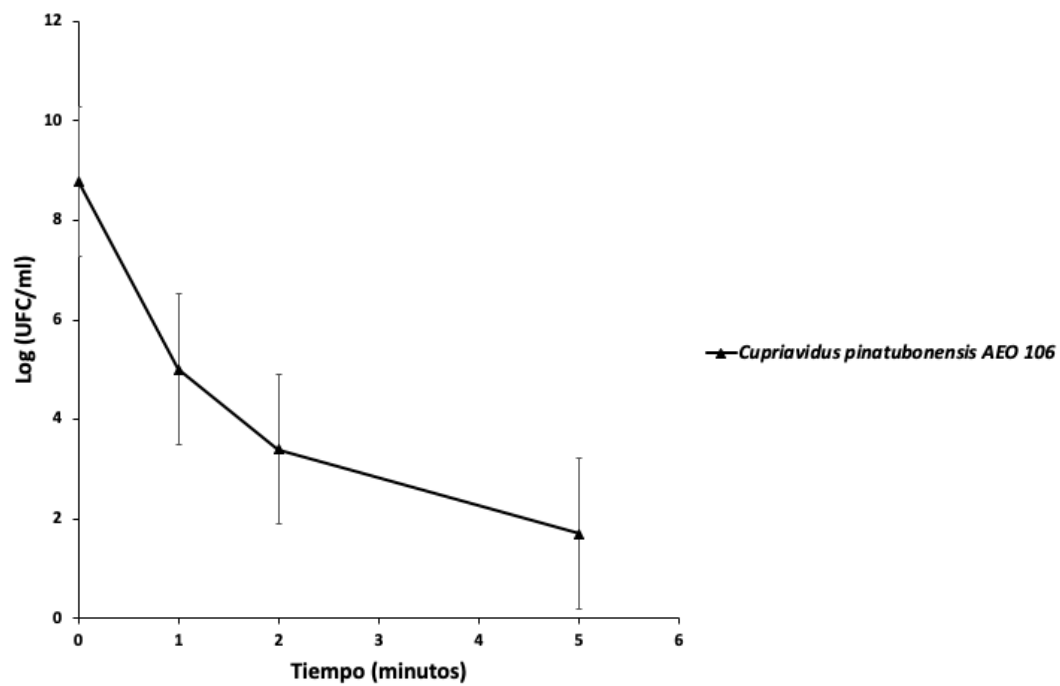
**Figura. 7** Efecto del Peróxido de Hidrógeno en la viabilidad bacteriana de la cepa *E. coli* HB101. Concentraciones 1,3,5 y 10 mM. Control: sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La cepa *C. pinatubonensis* AEO106 para una concentración de 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disminuye a los 10 minutos su sobrevivencia en un 16% (1,11 logaritmos), a los 20 minutos disminuye un 31% (2,11 logaritmos) y a los 30 minutos disminuye un 50% (3,41 logaritmos), considerado muerte celular según el criterio de Pearson et al. (1980), con respecto a la densidad celular inicial de 10<sup>6</sup> UFC/ml (6,81 Log UFC/ml). Para 3mM de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la cepa bacteriana disminuye su viabilidad a los 10 minutos de exposición en un 27% (1,7 logaritmos) y a los 20 y 30 minutos decrece en un 100%, con respecto a la densidad celular inicial de 10<sup>6</sup> UFC/ml (6,18 Log UFC/ml), considerado muerte celular (Pearson et al.1980) no siendo detectada por la técnica de recuento viable. Para 5mM y 10mM, disminuye el recuento de células viables a los 10 minutos de exposición en un 100%, con respecto a la densidad inicial de 10<sup>6</sup> y 10<sup>5</sup> UFC/ml (6,00 y 5,40 Log UFC/ml), respectivamente (Figura 6). Considerado muerte celular (Pearson et al.1980), no siendo detectado por la técnica de recuento viable.

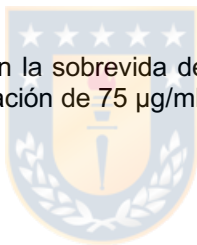
La cepa *E. coli* HB101 para una concentración de 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disminuye a los 10 minutos su sobrevivencia en un 3%, a los 20 minutos disminuye en un 6% y a los 30 minutos disminuye un 10%, con respecto a la densidad celular inicial de 10<sup>6</sup> UFC/ml (6,98 Log UFC/ml). Para 3mM de concentración la cepa bacteriana a los 10 minutos de exposición disminuye su viabilidad en un 8%, a los 20 minutos disminuye un 18% (1,33 logaritmos) y a los y 30 minutos se redujo en un 20% (1,43 logaritmos) con respecto a la densidad celular inicial de 10<sup>7</sup> UFC/ml (7,30 Log UFC/ml). Para 5mM, a los 10 minutos disminuye el recuento de células viables en un 15% (1,07 logaritmos), a los 20 minutos en un 19% (1,35 logaritmos), y a los 30 minutos en un 22% (1,52 logaritmos), con respecto a la densidad celular inicial de 10<sup>7</sup> UFC/ml (7,0 Log UFC/ml). Para 10 mM de concentración a los 10 minutos de exposición se redujo el recuento bacteriano en un 12%, a los 20 minutos disminuyó en un 23% (1,47 logaritmos), y a los 30 minutos se redujo en un 47% (3,07 logaritmos), con respecto a la densidad celular inicial de 10<sup>6</sup> UFC/ml (6,47 Log UFC/ml) (Figura 6). Considerado muerte celular según el criterio de Pearson et al.1980 (Figura 7).

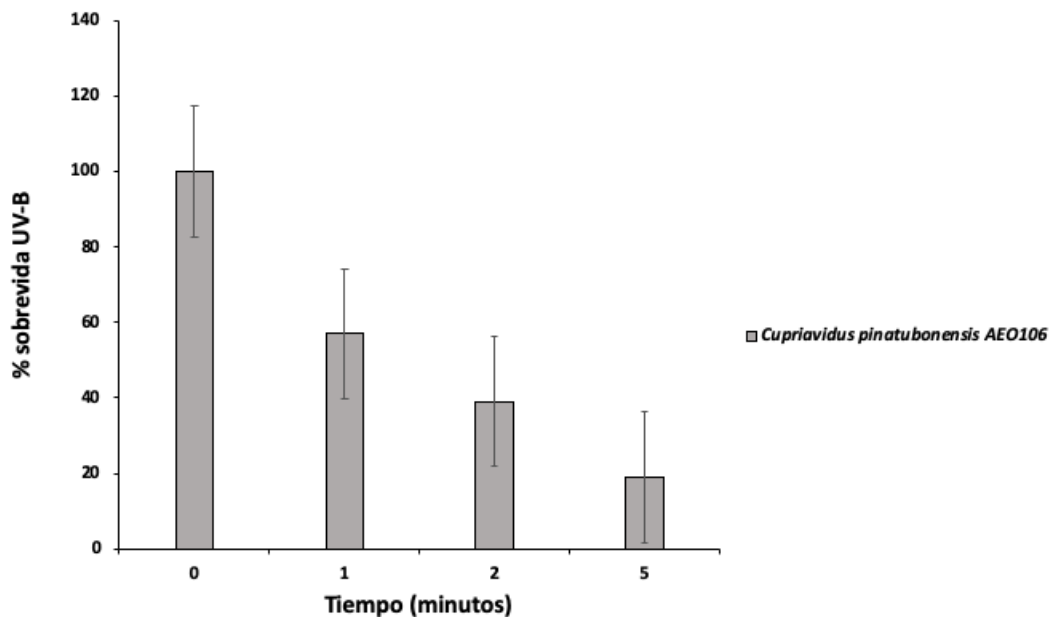
#### **1.18 Efecto de la radiación UV-B en la sobrevivencia de las bacterias susceptibles en presencia del pigmento deinoxantina extraído de *Deinococcus* UDEC-P1.**

Se determinó la sobrevivencia bacteriana de las cepas en estudio *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB101, a la radiación UV-B, en presencia de una concentración de 75 µg/ml pigmento deinoxantina previamente extraído de *Deinococcus* sp UDEC-P1. Realizando recuento viable de las cepas al inicio del experimento y luego de someter a pulsos de 1,2 y 5 minutos (Figuras 8 y 9).



**Figura. 8** Efecto de la radiación UV-B en la sobrevivencia de las cepas bacterianas *C. pinatubonensis* AEO106 más la adición de una concentración de 75 µg/ml del pigmento deinoxantina.





**Figura. 9** Porcentaje de sobrevivencia de la cepa bacteriana *C. pinatubonensis* AEO106 a la exposición a la radiación UV-B mas la adición de una concentración de 75 µg/ml del pigmento el pigmento deinoxantina.

Para 1 minuto de exposición el recuento de células viables de la cepa *C. pinatubonensis* AEO106 decrece un 43% (3,78 logaritmos), en comparación con el ensayo sin pigmento decrece un 13% menos, para los 2 minutos un 61% (5,38 logaritmos) en comparación con el ensayo sin pigmento decrece un 25% menos, y para los 5 minutos un 81% (7,08 logaritmos), respecto a la desidad celular inicial de  $10^8$  (8,78 Log UFC/ml) decrece un 13% menos en comparación con el ensayo sin pigmento (Figuras 8 y 9).

## 6. DISCUSIÓN

La radiación UV en la luz solar es considerada un factor abiótico de estrés importante, ocurriendo en numerosos nichos ecológicos (Slaninova et al. 2018). Produce efectos perjudiciales en las células vivas y en microorganismos afectando la diversidad, dinámica, eficiencia y productividad de la estructura comunitaria microbiana (Pérez et al. 2017). El mecanismo de acción de la radiación UV-B es tanto directo produciendo reacciones fotodinámicas (Krisko & Radman 2010) en las células expuestas a la radiación, provocando cambios en la estructura molecular de lípidos, proteínas, ARN y ADN (Slaninova et al. 2018) debido a la fuerte absorción en las longitudes de onda por debajo de 320 nm por la molécula de ADN (Zhang et al. 2007). Como indirecto, ejerciendo presión oxidativa (Slaninova et al. 2018; Zhang et al. 2007). Produce cambios en la capacidad de crecimiento (Muela et al. 2002) como la desaceleración del metabolismo y funciones que afectan principalmente la capacidad de formación de colonias (Muela et al. 2002). Por ende, una deficiente maquinaria que repare el daño celular a las proteínas reparadoras del ADN, puede conllevar a la muerte celular por radiación, causada principalmente por daño oxidativo con la consiguiente pérdida de actividades de mantenimiento, alterando las interacciones catalíticas de las proteínas conduciendo a la interrupción de funciones celulares (Slade & Radman 2011), incluida la reparación del ADN provocando actividades propensas a errores que resultan en mutaciones del mismo (Krisko & Radman 2013; Slade & Radman 2011; Krisko & Radman 2010; Tian et al. 2009).

Los resultados de la exposición de las cepas *E. coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106, mostraron que ambas cepas son susceptibles a la exhibición a radiación UV-B (Figuras 4 y 5) causando disminución de la viabilidad celular al minuto de exposición y finalmente muerte al transcurrir los 15 minutos del tiempo de ensayo, pues la reducción en más de 3 logaritmos, se considera muerte celular (Pearson et al. 1980). Esto puede deberse a una menor capacidad antioxidante tanto a nivel enzimático (Zeng et al. 2017), cómo a la ausencia de metabolitos protectores de los

rayos UV tales como, pigmentos y gránulos de polihidroxicanoatos (PHAs) (Slaninova et al. 2018), de almacenaje de carbono y energía que además confieren una mejora de la supervivencia de las células bacterianas cuando se exponen a numerosos factores de estrés, incluida la radiación UV siendo capaz de dispersarla eficientemente (Slaninova et al. 2018). Además de deficiencias en vías de reparación al daño del ADN, presentes en cepas radiotolerantes como las pertenecientes al género *Deinococcus* (Slade & Radman 2011).

Para el caso de la cepa *E. coli* HB101 se observó que es más sensible a la exposición a radiación UV-B (Figuras 4 y 5) que la cepa *C. pinatubonensis* AEO106. Pues al minuto de exposición disminuye su supervivencia en un 100% y se mantiene en esta condición durante todo el tiempo de ensayo (15 minutos). Lo que se considera muerte según el criterio de Pearson et al. 1980. Esto puede deberse debido a una saturación de la capacidad antioxidante de las células, particularmente a nivel enzimático tanto de catalasas como de las superóxido dismutasas, las cuales se ha encontrado que poseen una expresión de actividad de entre 30 a 6 veces respectivamente, menor que en las cepas radiotolerantes (Zeng et al. 2017). Tal como lo informó Muela et al. 2000 los componentes de la radiación solar tienen un efecto subletal en *E. coli*, siendo el efecto más dañino y evidente en el componente UV-B, encontrado cuando el comportamiento de las bacterias se analiza de acuerdo con la capacidad de cultivo.

*C. pinatubonensis* AEO106 es sensible al igual que *E. coli* HB101 a la exposición a radiación UV-B (Figuras 4 y 5) aunque en menor medida. Disminuyendo gradualmente su viabilidad y solo llegando a una disminución del 100% en la supervivencia a los 10 y 15 minutos de exposición. Considerada muerte según el criterio de Pearson et al. 1980. Esto puede deberse a la falta de mecanismos antioxidantes complementarios para hacer frente al daño ocasionado por la exposición a la irradiación. Slaninova et al. 2018 y Obruca et al. 2010 describieron que *C. pinatubonensis* es un microorganismo del suelo que acumula gránulos de PHAs. Otorgando crioprotección mejora osmótica, y disminución en el nivel intracelular de EROs en células expuestas a rayos UV pues los gránulos se unen específicamente

al ADN (Slaninova et al. 2018). *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 contiene dos genes de PHAs sintasa: phaC1 y phaC2 (Jian et al 2015). Sin embargo, se podría deducir que para los ensayos realizados no existió presencia de gránulos de PHAs, dada la sensibilidad de la cepa *C. pinatubonensis* AEO106 expuesta a la radiación UV-B, pues según Slaninova et al. 2018 en presencia de PHAs la sobrevivencia no se ve afectada en más de un 25% para un tiempo de exposición de 30 minutos de exposición.

Esto se podría explicar a que no se dieron las condiciones indicadas de nutrientes en el medio pues, el ensayo se realizó utilizando medio salino mínimo y la síntesis metabólica de PHAs se encuentra condicionada por ciertos parámetros en la concentración de nutrientes sintetizándose en escenarios donde exista limitación de nitrógeno, fósforo y azufre, con un exceso de carbono (Jian et al. 2015 ;Than et al. 2014).

Cabe destacar que los ensayos se realizaron bajo lámparas UV-B que no corresponden a todo el espectro en la luz solar y que en algunas especies bacterianas como *Rhodobacter* sp (Pérez et al. 2017) la respuesta a la radiación UV natural es más diversa que bajo ensayos de lámparas UV en el laboratorio.

Como consecuencia de vivir en un ambiente aeróbico, los organismos enfrentan el estrés oxidativo, causado principalmente por desequilibrios entre la producción y eliminación de EROs (Cabisco et al. 2000). Seguido de una posterior acumulación de estos niveles que exceden la capacidad de defensa de la célula (Svenningsen et al. 2017). El daño biológico causado por estas moléculas incluyen la oxidación de los ácidos grasos de membrana, resultando en peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño en el ADN (Wang & Schellhorn 1995). Además la exposición a algunos agentes ambientales, como la radiación ionizante, radiación UV o numerosos compuestos que generan  $O_2^-$  intracelular, llevan a reacciones en cadena de producción de EROs, causando estrés oxidativo (Cabisco et al. 2000).

En el suelo, las bacterias se enfrentan a condiciones subóptimas causadas por fluctuaciones en la disponibilidad del sustrato, pH, temperatura, disponibilidad de agua, así como exposición a tóxicos, compuestos antropogénicos (Svenningsen et al. 2017).

Para los ensayos llevados a cabo en este estudio se utilizó  $H_2O_2$  como generador de estrés oxidativo. La mayoría de sus efectos dañinos se deben a su conversión en  $OH^\cdot$  por la reacción de Fenton en presencia de hierro (Imlay, 2003). La reactividad del radical  $OH^\cdot$  puede llevar a entrecruzamiento de cadenas polipeptídicas y rotura de enlaces peptídicos (Di Capua 2011). Difunde pasivamente a través de la membrana celular y se acumula en las células expuestas (Svenningsen et al. 2017; Herrera 2015). Se ha descrito que si bien el  $OH^\cdot$  es altamente reactivo con todas las macromoléculas celulares, el  $O_2^\cdot$  y el  $H_2O_2$  no son particularmente reactivos con el ADN (Slade & Radman 2011). El  $H_2O_2$  puede oxidar residuos de cisteína (-SH) o metionina (SCH<sub>3</sub>) de proteínas, con grupos de hierro-azufre o hemo expuestos (Di Capua 2011). Varias proteínas como quinasas, fosfatasas y factores de transcripción con importante función fisiológica son capaces de reaccionar reversiblemente con el  $H_2O_2$  (Imlay, 2003).

Se expusieron a las cepas en estudio *C. pinatubonensis* AEO106 y *E. coli* HB101 a concentraciones milimolares que incluyeron 1, 3, 5 y 10 mM de  $H_2O_2$  (Figuras 6 y 7 respectivamente). Con el objetivo de conocer como se ve afectada la viabilidad de estas cepas bacterianas cuando aumenta la concentración de este compuesto por la exhibición a ciertos factores ambientales que producen estrés. Los resultados de los efectos del  $H_2O_2$  en la cepa *E. coli* HB101 (Figura 7) indican una disminución del recuento viable leve para las concentraciones de 1,3 y 5 mM de  $H_2O_2$ , pero progresiva conforme aumenta la concentración y tiempo de exposición.

Mostrando un valor significativo para la concentración de 10 mM a los 30 minutos de exposición, alcanzando un 47% de disminución en la sobrevivencia llegando a la muerte bacteriana según el criterio de Pearson et al. 1980, utilizando una concentración inicial de  $10^7$  UFC/ml.



Se ha descrito para *E. coli* que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se elimina mediante dos catalasas: la hidroperoxidasa I (HPI), que está presente durante el crecimiento aeróbico y se controla de manera transcripcional a diferentes niveles (Cabisco et al. 2000), y la hidroperoxidasa II (HPII), que se induce durante la fase estacionaria (Cabisco et al. 2000). La actividad de la enzima catalasa en bacterias Gram negativas bien estudiadas, como *E. coli* (Wang & Schellhorn 1995), se ve afectada por la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pues la exposición a un pretratamiento de los cultivos a un nivel subletal de este compuesto induce una respuesta protectora que aumenta la resistencia a la exposición letal posterior, tanto frente a la exhibición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como a la radiación UV, mostrando, además mayores niveles de catalasa (Wang & Schellhorn 1995). Así mismo, se ve modificada por la acción de la radiación ionizante y la fase de crecimiento, con un mayor nivel de actividad de catalasa en las células de fase estacionaria (Slade & Radman 2011). La poca disminución de la viabilidad del ensayo para *E. coli* HB101 se puede deber a la fase de crecimiento en la que se encontraba pues se utilizó una concentración inicial de 10<sup>7</sup> UFC/ml, en fase exponencial tardía y entrando al inicio de la fase estacionaria. Tal como describieron Slade & Radman 2011; Cabisco et al. 2000 y Wang & Schellhorn 1995, para los cultivos en fase estacionaria de *Bacillus subtilis* y *E. coli*, los cuáles mostraban viabilidad completa después del tratamiento con 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se sugiere que las células bajo estrés nutricional podrían prepararse por adelantado para la posibilidad de estrés ambiental, ya que su capacidad de respuesta rápida se ve gravemente comprometida (Cabisco et al. 2000).

Las células de *E. coli* poseen, además, una defensa específica contra los peróxidos, mediada por el gen *oxyR* que controla, entre otros, los genes que codifican la catalasa HPI, la glutaredoxina, la glutatión reductasa, la hidropéroxido de alquilo dependiente de NADPH y una proteína protectora del daño oxidativo al ADN (Dps) (Åslund et al. 1999). La activación de estas respuestas aumenta enormemente la resistencia celular a los agentes oxidativos (Cabisco et al. 2000).

Se ha estudiado, sin embargo, que las actividades de la catalasa son entre 16 a 50 veces mayor en cepas del género *Deinococcus* en comparación con *E.coli* (Slade & Radman 2011; Wang & Schellhorn 1995).

Los resultados de los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la cepa *C. pinatubonensis* AEO106 indican una disminución del recuento viable a las concentraciones de 1, 3, 5 y 10 mM (Figura 6) siendo progresiva la disminución conforme transcurre el tiempo de exposición y a mayor concentración del compuesto, con respecto al control. Llegando a causar muerte bacteriana según el criterio de Pearson et al. (1980) a las concentraciones de 3 mM a los 30 minutos de exposición y a los 5 y 10 mM desde los 10 minutos de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no siendo determinado por recuento viable. Lo que puede explicarse por una falta de inducción de la maquinaria enzimática. Debido a la insuficiencia de un pretratamiento con dosis leves de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante los ensayos, que permiten la inducción temprana de los sistemas de defensas (Svenningsen et al. 2015). D'Autréaux & Toledano 2007 describieron que las EROs son tóxicas pero también funcionan como moléculas de señalización. Para contrarrestar el estrés oxidativo las bacterias mantienen sistemas de defensa inducibles para desintoxicar oxidantes y reparar daños (Tarassova et al. 2009). Utilizando mecanismos de detección distintos para las diferentes formas de estrés oxidativo. Por ejemplo, el sistema SoxRS es un regulador del estrés por O<sub>2</sub><sup>-</sup> mientras que los reguladores OxyR y PerR responden al estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tarassova et al. 2009). OxyR corresponde a un regulador de doble función. Puede reprimir en condiciones normales o activar durante el estrés oxidativo la expresión de katG una enzima bifuncional con actividades de catalasa y peroxidasa (Jangiam et al. 2010). OxyR cumple la definición de un receptor de peróxido y es activado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones que solo superan niveles fisiológicos celulares (20 nM) (D'Autréaux & Toledano 2007). Se ha demostrado para cepas de *E. coli* que deleciones de oxyR las transforman en hipersensibles a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tienen mayores tasas de mutación espontánea durante el crecimiento aeróbico (Jangiam et al. 2010), además la exposición a bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo a OxyR aumentando los niveles de catalasa hasta 10 veces (Imlay & Linn 1987). Para *C. pinatubonensis* AEO106

también esta descrito la actividad de las proteínas homólogas Ohr / OsmC que participan en la descomposición de los hidroperóxidos involucradas así en la defensa contra el estrés oxidativo (Svenningsen et al. 2017). La actividad de estas proteínas se activa después de 30 minutos de exposición a 1 mM de concentración  $H_2O_2$ , de lo que se deduce que no presentaron actividad para los ensayos pues como se ha mencionado no se expuso la cepa a más de 30 minutos de exposición para esa concentración de  $H_2O_2$ .

*E.coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106 son más sensibles en comparación a cepas resistentes como *Deinococcus radiodurans* a los efectos letales del  $H_2O_2$  la cual puede tolerar la exposición al  $H_2O_2$  a con poca pérdida de viabilidad, mostrando un amplio hombro en la curva de supervivencia (Wang & Schellhorn 1995) soportando concentraciones de hasta 40 mM de  $H_2O_2$  con disminución en el recuento viable menos de un logaritmo y solo llegando a una disminución considerable a una concentración de 80 mM de  $H_2O_2$  (Wang & Schellhorn 1995), solo concentraciones superiores a 100 mM de  $H_2O_2$  producen muerte bacteriana para *Deinococcus* (Mardones 2013).

Para el ensayo de exposición a la radiación UV-B de la cepa *C. pinatubonensis* AEO106 más la adición del pigmento deinoxantina a una concentración de 75  $\mu\text{g/ml}$  (Figuras 8 y 9) se puede apreciar una sobrevivencia en términos de porcentaje con respecto al ensayo previo sin la adición de pigmento (Figuras 4 y 5), aunque harían falta más ensayos para afirmar si este incremento corresponde a un cambio significativo. Pues para 1 minuto de exposición en lámpara UV-B la presencia de UFC decrece un 13% menos respecto al ensayo sin pigmento, para los 2 minutos un 25% y para los 5 minutos decrece un 13% menos según el ensayo de recuento viable. Lo cual no sería un resultado difícil de esperar pues se ha descrito que in vitro, los carotenoides de *Deinococcus radiodurans* pueden eliminar todos los tipos de EROs (Slade & Radman 2011), exhibiendo protección al ADN (Zhang et al. 2007), pues el 80% de los daños causados al ADN son ocasionado por EROs (Tian & Hua 2010). Salvaguardando además a las proteínas, incluidas aquellas involucradas en la vía de reparación del ADN, y las enzimas involucradas en la

recuperación celular (Tian & Hua 2010). Lo que correspondería al principal determinante de la restauración del daño por radiación (Tian & Hua 2010, Tian et al 2009).

Finalmente se puede concluir de esta investigación que las cepas *E.coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106 son susceptibles a la exposición radiación UV, tal como se había planteado, al igual que a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aunque la cepa *E.coli* HB101 muestra una mayor resistencia al ensayo frente a la adición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a mecanismos intrínsecos de la propia cepa activados por su fase de crecimiento. Sin embargo, la resistencia sigue siendo mucho menor a estos agentes externos, que para el caso cepas tolerantes a estrés como *Deinococcus* sp según la información documentada. Es por esta razón que al extraer el pigmento deinoxantina de esta cepa la cepa susceptible *C. pinatubonensis* AEO106 muestra una mejoría en términos de porcentaje de sobrevivencia frente a la exposición a radiación UV-B. Cabe destacar que según lo planeado por Tapia et al. 2019 el pigmento deinoxantina extraído de *Deinococcus* sp UDEC-P1 es similar a la deinoxantina obtenida de *Deinococcus radiodurans* pues poseen espectros de absorción idénticos.

## 7. CONCLUSIONES

La exposición a radiación UV-B afectó la viabilidad de *E.coli* HB101 y *C. pinatubonensis* AEO106.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> influye sobre la viabilidad de las 2 cepas ensayadas aunque existe una notable sobrevivencia en la cepa *E.coli* HB101, debido a mecanismos intrínsecos de la propia cepa relacionado con respuestas enzimáticas y su fase de crecimiento. Aun así comparado con cepas resistentes como las de género *Deinococcus* esta sobrevivencia es sustancialmente menor según la información documentada.

La presencia del pigmento deinoxantina extraído de *Deinococcus* sp UDEC-P1 a una concentración de 75 µg/ml, mejoró la subsistencia de la cepa *C. pinatubonensis* AEO106 expuesta a la radiación UV-B.



## 8. PROYECCIONES

El interés del uso potencial de este pigmento podría recaer en su aptitud para aumentar la resistencia de cepas bacterianas modificadas, como lo que se intentó postular en el presente estudio. Así como su promesa para su uso en estudios de la rama de investigación de la astrobiología.

Al igual que su posibilidad de uso en salud humana como antioxidante natural, como lo descrito en trabajos anteriores como el de Tapia et al. 2019.

## 9. LITERATURA CITADA

- ANDERSON A.W, NORDAN H.C, CAIN R.F, PARRISH G, DUGGAN D. 1956. Studies on a radio-resistant *Micrococcus* 1. The isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation. *Food Technol* 10:575–577 2.
- AGUAYO, P., GONZÁLEZ, P., CAMPOS, V., MAUGERI, T. L., PAPALE, M., GUGLIANDOLO, C., & MARTINEZ, M. A. 2017. Comparison of prokaryotic diversity in cold, oligotrophic remote lakes of chilean Patagonia. *Current microbiology*, 74(5), 598-613.
- ALSCHER, R., DONAHUE, J., Y CRAMER, C. 1997. “Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells,” *Physiologia Plantarum*”, 100: 224–233.
- ÅSLUND, F., ZHENG, M., BECKWITH, J., & STORZ, G. 1999. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6161-6165.
- D'AUTRÉAUX, B., & TOLEDANO, M. B. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 813-824.
- BAIS, A. F., MCKENZIE, R. L., BERNHARD, G., AUCAMP, P. J., ILYAS, M., MADRONICH, S., & TOURPALI, K. 2015. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(1), 19-52.
- CABISCOL CATALÀ, E., TAMARIT SUMALLA, J., & ROS SALVADOR, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000, vol. 3, núm. 1, p. 3-8.
- CORDERO, R. R., DAMIANI, A., SECKMEYER, G., JORQUERA, J., CABALLERO, M., ROWE, P., ... & MATUS, M. 2016. The solar spectrum in the Atacama Desert. *Scientific reports*, 6, 22457.

- DI CAPUA, C. B. 2011. Defensa antioxidante bacteriana: determinantes funcionales de la superóxido dismutasa. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina.
- DIFFEY, B. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology*. 36:299-328.
- DUTHIE, M. S., I. KIMBER Y M. NORVAL. 1999. "The effects of ultraviolet radiation on the human immune system." *British Journal Dermatology*. 140(6): 995-1009.
- FARCI, D., ESPOSITO, F., EL ALAOUI, S., & PIANO, D. 2017. S-layer proteins as a source of carotenoids: Isolation of the carotenoid cofactor deinoxanthin from its S-layer protein DR\_2577. *Food Research International*, 99, 868-876.
- FARCI, D., SLAVOV, C., TRAMONTANO, E., & PIANO, D. 2016. The S-layer protein DR\_2577 binds deinoxanthin and under desiccation conditions protects against UV-radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Frontiers in microbiology*, 7, 155.
- FRASER, P. D., & BRAMLEY, P. M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-265.
- FERNÁNDEZ-BUNSTER G, GONZALEZ C, BARROS J, MARTINEZ M. 2012. Quorum sensing circuit and reactive oxygen species resistance in *Deinococcus* sp. *Current Microbiology*. 65(6):719-725.
- FERREIRA, A. C., NOBRE, M. F., RAINEY, F. A., SILVA, M. T., WAIT, R., BURGHARDT, J., ... & DA COSTA, M. S. 1997. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 939-947.

- FOOTE, C. S. 1968. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162:963–970.
- GERBER, E., BERNARD, R., CASTANG, S., CHABOT, N., COZE, F., DREUX-ZIGHA, A., ... & LETELLIER, G. 2015. *Deinococcus* as new chassis for industrial biotechnology: biology, physiology and tools. *Journal of applied microbiology*, 119(1), 1-10.
- GERHARDT, P., MURRAY, R. G. E., COSTILOW, R. N., NESTER, E. W., WOOD, W. A., et al.,(ed)., 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1-20.
- HELBLING, E., MARGUET, E., VILLAFAN, V., HOLM-HANSEN, O. 1995. Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series*. 166: 293–298.
- HERRERA MARTÍN, G. 2015. Mecanismos de control de estrés oxidativo en *Escherichia coli*: desarrollo de ensayos citómicos bacterianos basados en cepas modificadas genéticamente. Tesis de Doctorado. Universidad de Valencia. Valencia. España.
- HUSSEIN, M.R. 2005. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *Journal of cutaneous pathology*, 32(3), 191-205.
- IMLAY, J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 395-418.
- IMLAY, J. A., & LINN, STUART. 1987. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 2967-2976.



- JANGIAM, W., LOPRASERT, S., SMITH, D. R., & TUNGPRADABKUL, S. 2010. Burkholderia pseudomallei RpoS regulates OxyR and the katG-dpsA operon under conditions of oxidative stress. *Microbiology and immunology*, 54(7), 389-397.
- Jl, H. F. 2010. Insight into the strong antioxidant activity of deinoxanthin, a unique carotenoid in *Deinococcus radiodurans*. *International journal of molecular sciences*, 11(11), 4506-4510.
- JIANG, X., LUO, X., & ZHOU, N. Y. 2015. Two polyhydroxyalkanoate synthases from distinct classes from the aromatic degrader *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 exhibit the same substrate preference. *Plos one*, 10(11).
- KEHRER, J. P. 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- KHODADAD, C. L., WONG, G. M., JAMES, L. M., THAKRAR, P. J., LANE, M. A., CATECHIS, J. A., & SMITH, D. J. 2017. Stratosphere conditions inactivate bacterial endospores from a Mars spacecraft assembly facility. *Astrobiology*, 17(4), 337-350.
- KRISKO, A., & RADMAN, M. 2013. Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(7), a012765.
- KRISKO, A., & RADMAN, M. 2010. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14373-14377.
- KUMAR, R., PATEL, D. D., BANSAL, D. D., MISHRA, S., MOHAMMED, A., ARORA, R., ... & TRIPATHI, R. P. 2010. Extremophiles: sustainable resource of natural compounds-extremolytes. In *Sustainable Biotechnology* (pp. 279-294). Springer, Dordrecht.

- LEMEE, L., PEUCHANT, E., CLERC, M., BRUNNER, M., & PFANDER, H. 1997. Deinoxanthin: a new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 53(3), 919-926.
- LIN, L., DAI, S., TIAN, B., LI, T., YU, J., LIU, C., ... & HUA, Y. 2016. DqsIR quorum sensing-mediated gene regulation of the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans* in response to oxidative stress. *Molecular microbiology*, 100(3), 527-541.
- MACELROY, R. D. 1974. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1), 74-75.
- MARDONES, A. A. 2013. Participación de enzimas antioxidantes en protección frente a estrés oxidativo generado por radiación ultravioleta en bacterias aisladas desde la Patagonia y Antártica chilena. Tesis de Magíster. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- MAKAROVA, K. S., OMELCHENKO, M. V., GAIDAMAKOVA, E. K., MATROSOVA, V. Y., VASILENKO, A., ZHAI, M., ... & MAVROMATIS, K. 2007. *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS One*, 2(9), e955.
- MAKAROVA, K. S., ARAVIND, L., WOLF, Y. I., TATUSOV, R. L., MINTON, K. W., KOONIN, E. V., & DALY, M. J. 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 65(1), 44-79.
- MCKENZIE, R. L., AUCAMP, P. J., BAIS, A. F., BJÖRN, L. O., ILYAS, M., & MADRONICH, S. 2011. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(2), 182-198.

MUELA, A., GARCIA-BRINGAS, J. M., SECO, C., ARANA, I., & BARCINA, I. 2002. Participation of oxygen and role of exogenous and endogenous sensitizers in the photoinactivation of *Escherichia coli* by photosynthetically active radiation, UV-A and UV-B. *Microbial ecology*, 44(4), 354-364.

MUELA, A., GARCIA-BRINGAS, J. M., ARANA, I., & BARCINA, I. 2000. The effect of simulated solar radiation on *Escherichia coli*: the relative roles of UV-B, UV-A, and photosynthetically active radiation. *Microbial Ecology*, 39(1), 65-71.

NEIFAR, M., MAKTOUF, S., GHORBEL, R. E., JAOUANI, A., & CHERIF, A. 2015. Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*. Wiley, Hoboken, 245-268.

ORELLANA, R., MACAYA, C., BRAVO, G., DOROCHESE, F., CUMSILLE, A., VALENCIA, R., ... & SEEGER, M. 2018. Living at the frontiers of life: extremophiles in Chile and their potential for bioremediation. *Frontiers in microbiology*, 9, 2309.

OBRUCA, S., MAROVA, I., STANKOVA, M., MRAVCOVA, L., & SVOBODA, Z. 2010. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 26(7), 1261-1267.

OBRUCA, S., MAROVA, I., SVOBODA, Z., & MIKULIKOVA, R. 2010. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly (3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia microbiologica*, 55(1), 17-22.

PEARSON, R. D., STEIGBIGEL, R. T., DAVIS, H. T., & CHAPMAN, S. W. 1980. Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(5), 699-708.

- PÉREZ, V., HENGST, M., KURTE, L., DORADOR, C., JEFFREY, W. H., WATTIEZ, R., ... & MATALLANA-SURGET, S. 2017. Bacterial survival under extreme UV radiation: a comparative proteomics study of *Rhodobacter* sp., isolated from high altitude wetlands in Chile. *Frontiers in microbiology*, 8, 1173.
- PÉREZ-PANTOJA, D., LEIVA-NOVOA, P., DONOSO, R. A., LITTLE, C., GODOY, M., PIEPER, D. H., & GONZÁLEZ, B. 2015. Hierarchy of carbon source utilization in soil bacteria: hegemonic preference for benzoate in complex aromatic compound mixtures degraded by *Cupriavidus pinatubonensis* strain JMP134. *Applied and environmental microbiology*, 81(12), 3914-3924.
- PEREZ-PANTOJA, D., DE LA IGLESIA, R., PIEPER, D. H., & GONZÁLEZ, B. 2008. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS microbiology reviews*, 32(5), 736-794.
- PIZARRO, R. A. 1995. UV-A oxidative damage modified by environmental conditions in *Escherichia coli*. *International journal of radiation biology*, 68(3), 293-299.
- RADDADI, N., CHERIF, A., DAFFONCHIO, D., NEIFAR, M., & FAVA, F. 2015. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 7907-7913.
- RAINEY, F. A., RAY, K., FERREIRA, M., GATZ, B. Z., NOBRE, M. F., BAGALEY, D., ... & SMALL, A. M. 2005. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5225-5235.

- RANAWAT, P., & RAWAT, S. 2017. Radiation resistance in thermophiles: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 112.
- RAVANAT, J. L., DOUKI, T., & CADET, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 63(1-3), 88-102.
- ROCHETTE, P. J., J. P. THERRIEN, R. DROUIN, D. PERDIZ, N. BASTIEN, E. A. DROBETSKY Y E. SAGE. 2003. "UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells." *Nucleic Acids Research*. 31(11): 2786-2794.
- ROSALES, P. 2006. Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología, Universidad de Málaga, España.
- ROTHEN, S. A., SAUER, M., SONNLEITNER, B., & WITHOLT, B. 1998. Growth characteristics of *Escherichia coli* HB101 [pGEc47] on defined medium. *Biotechnology and bioengineering*, 58(1), 92-100.
- SATO, Y., NISHIHARA, H., YOSHIDA, M., WATANABE, M., RONDAL, J. D., CONCEPCION, R. N., & OHTA, H. 2006. *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(5), 973-978.
- SINGH, O. V., & GABANI, P. 2011. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. *Journal of applied microbiology*, 110(4), 851-861.

- SHIU, C. T. Y T. M. LEE. 2005. "Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*." *Journal of Experimental Botany*, 56(421): 2851-2865.
- SLADE, D., & RADMAN, M. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 133-191
- SLANINOVA, E., SEDLACEK, P., MRAVEC, F., MULLEROVA, L., SAMEK, O., KOLLER, M., ... & OBRUCA, S. 2018. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(4), 1923-1931.
- SULZBERGER, B., AUSTIN, A. T., CORY, R. M., ZEPP, R. G., & PAUL, N. D. 2019. Solar UV radiation in a changing world: roles of cryosphere–land–water–atmosphere interfaces in global biogeochemical cycles. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 28: 1-3.
- STEPANOV, V. G., VAISHAMPAYAN, P., VENKATESWARAN, K., & FOX, G. E. 2014. Draft genome sequence of *Deinococcus phoenicis*, a novel strain isolated during the Phoenix Lander spacecraft assembly. *Genome Announcements.*, 2(2), e00301-14.
- SVENNINGSEN, N. B., DAMGAARD, M., RASMUSSEN, M., PÉREZ-PANTOJA, D., NYBROE, O., & NICOLAISEN, M. H. 2017. *Cupriavidus pinatubonensis* AEO106 deals with copper-induced oxidative stress before engaging in biodegradation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid. *BMC microbiology*, 17(1), 211.
- SVENNINGSEN, N. B., PÉREZ-PANTOJA, D., NIKEL, P. I., NICOLAISEN, M. H., DE LORENZO, V., & NYBROE, O. 2015. *Pseudomonas putida* mt-2 tolerates reactive oxygen species generated during matrix stress by inducing a major oxidative defense response. *BMC microbiology*, 15(1), 202.

- SVOBODOVA, A., D. WALTEROVA Y J. VOSTALOVA. 2006. "Ultraviolet light induced alteration to the skin." Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czechoslovakia Republic 150(1): 25-38.
- TAN, G. Y. A., CHEN, C. L., LI, L., GE, L., WANG, L., RAZAAD, I. M. N. & WANG, J. Y. 2014. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. *Polymers*, 6(3), 706-754
- TANGHE, A., VAN DIJCK, P., Y THEVELEIN, J. 2003. Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance, and biotechnological applications. *Advances in applied Microbiology*, 53, 129-176.
- TAPIA, C., LÓPEZ, B., ASTUYA, A., BECERRA, J., GUGLIANDOLO, C., PARRA, B., & MARTÍNEZ, M. 2019. Antiproliferative activity of carotenoid pigments produced by extremophile bacteria. *Natural Product Research*, 1-5.
- TAPIA, C.R. 2017. Actividad Antitumoral de pigmentos y metabolitos secundarios sintetizados por Bacterias Antárticas y Patagónicas. Teis de Magíster. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
- TARASSOVA, K., TEGOVA, R., TOVER, A., TERAS, R., TARK, M., SAUMAA, S., & KIVISAAR, M. 2009. Elevated mutation frequency in surviving populations of carbon-starved rpoS-deficient *Pseudomonas putida* is caused by reduced expression of superoxide dismutase and catalase. *Journal of bacteriology*, 191(11), 3604-3614.
- TIAN, B., & HUA, Y. 2010. Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus–Thermus* bacteria. *Trends in microbiology*, 18(11), 512-520.
- TIAN, B., SUN, Z., SHEN, S., WANG, H., JIAO, J., WANG, L., ... & HUA, Y. 2009. Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Letters in applied microbiology*, 49(6), 689-694.

- TIAN, B., XU, Z., SUN, Z., LIN, J., & HUA, Y. 2007. Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(6), 902-911.
- TORTORA, G., FUNKE, B., & CASE, C. 2007. Introducción a la Microbiología. 9a edición, Buenos aires: Médica Panamericana. 988 pp.
- VAISHAMPAYAN, P., ROBERTS, A. H., AUGUSTUS, A., PUKALL, R., SCHUMANN, P., SCHWENDNER, P. & VENKATESWARAN, K. 2014. *Deinococcus phoenicis* sp. nov., an extreme ionizing-radiation-resistant bacterium isolated from the Phoenix Lander assembly facility. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(10), 3441-3446.
- WANG, P., & SCHELLHORN, H. E. 1995. Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 170-176.
- WATRIN, L., & PRIEUR, D. 1996. UV and ethyl methanesulfonate effects in hyperthermophilic archaea and isolation of auxotrophic mutants of *Pyrococcus* strains. *Current microbiology*, 33(6), 377-382.
- ZHANG, L., YANG, Q., LUO, X., FANG, C., ZHANG, Q., & TANG, Y. 2007. Knockout of crtB or crtI gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability. *Archives of microbiology*, 188(4), 411-419.
- ZENG, Y., MA, Y., XIAO, F., WANG, W., & HE, S. 2017. Knockout of pprM Decreases Resistance to Desiccation and Oxidation in *Deinococcus radiodurans*. *Indian journal of microbiology*, 57(3), 316-321.



