



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Ciencias con Mención en
Microbiología

**Estudio de mecanismos de reparación del ADN involucrados en la
resistencia a la radiación UVB de bacterias antárticas y patagónicas.**



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

PAULINA PILAR CIFUENTES URIBE
CONCEPCIÓN-CHILE
2021

Profesor Guía: Dr. 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:

Dra. Carla León Lemus
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dr. Ronald Mennickent
Facultad de Ciencias Físicas y
Matemáticas
Universidad de Concepción

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción
Director de Programa

AGRADECIMIENTOS

Si bien, la decisión de estudiar un post-grado es personal y el éxito y conclusión del mismo dependen del constante trabajo individual, existen maravillosas personas que contribuyeron y permitieron que esta investigación llegara a buen puerto, a las cuales sin duda les dedicaré unas palabras.

Agradezco a las personas que se vieron involuntariamente involucradas durante estos años, como mis grandes amigas y padre y madre, que entregaron un amor incondicional, traducido en la paciencia y orgullo que siempre me han hecho sentir.

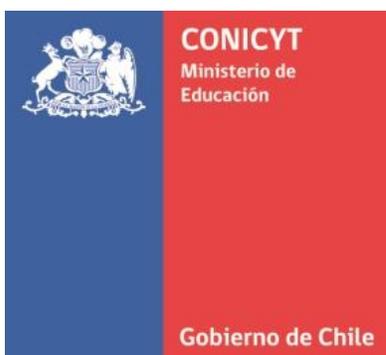
Agradezco a Lionel por el amor e incentivo constante, las horas de trabajo que también dedicó, el interés por lo que hago y las discusiones científicas que me ayudaron más que todo.

El Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación es un lugar donde las ideas pueden fluir y se recibirá una ayuda fraterna de parte de sus integrantes, siempre. Ruth, Boris, Roberto y Meli, muchas gracias. El profesor Miguel Martínez es el mejor representante de aquello, ya que recibí un apoyo incondicional de su parte para desarrollar mis ideas y no decaer a pesar de todas las dificultades. Incentivar a los alumnos a soñar y lograr grandes cosas es una constante en él y agradezco esa confianza.

Por último, agradezco haber pasado por estos años de magíster, ya que me abrió las puertas al reino procarionte desde perspectivas que no conocía. Ahora comprendo un poco más el mundo y a los pequeños organismos que habitan en él y valoro la enorme importancia de su presencia en el ecosistema desde sus comienzos hasta el día de hoy. Razones que me incentivan a seguir investigando.

Esta Tesis fue realizada gracias al financiamiento otorgado por:

Beca CONICYT de Magíster nacional 22172447



Apoyo de Dirección de Postgrado Universidad de Concepción

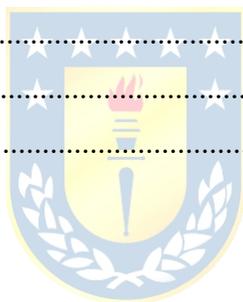


TABLA DE CONTENIDOS

Indice de Figuras.....	7
Indice de Tablas.....	9
I. RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
II. INTRODUCCIÓN.....	11
II.I Radiación ultravioleta y los efectos en el ADN.....	12
II.II Microorganismos radio-resistentes de ambientes fríos como modelo de estudio astrobiológico.....	14
II.III Estrategias de resistencia y reparación del daño a causa de la radiación UV.....	19
II.IV Fotorreactivación o fotorreparación enzimática.....	21
II.V Operones de respuesta SOS frente al UV.....	23
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
V. MATERIALES Y METODOS.....	29
V.I Bacterias y condiciones de cultivo.....	29
V.II Selección de cepas bacterianas resistentes a la radiación UVB.....	31
V.II.I Determinación del tiempo de reducción decimal (valor-D).....	31
V.II.II Curvas de muerte y determinación de la dosis letal 37 (D ₃₇).....	32
V.II.III Cálculo de dosis UVB.....	33
V.III Detección de genes de reparación del ADN mediante PCR.....	33
V.IV Identificación de bacterias con genes de reparación.....	35
V.V Curvas de crecimiento bacteriano a 10°C.....	35
V.VI Ensayos de fotorreparación y recuperación del recuento celular.....	36
V.VII Evaluación de la actividad fotoliasa mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	36
V.VII.I Extracción de proteína total.....	37
V.VII.II Síntesis del sustrato 15mer-CPD.....	38
V.VII.III Ensayo de fotorreparación.....	38



V.VIII Análisis estadístico.....	39
VI. RESULTADOS.....	40
VI.I Selección de bacterias psicotolerantes.....	40
VI.II Selección de bacterias radio-resistentes.....	40
VI.III Detección de genes de reparación del daño-UV en el ADN.....	41
VI.IV Evaluación de sobrevida asociada a actividad fotorreparadora.....	42
VI.IV.I Constantes de decaimiento (k) y dosis letal 37 (D_{37}).....	42
VI.IV.II Recuperación del recuento celular asociado a la actividad fotorreparadora de la CPD-fotoliasa.....	44
VI.IV.III Evaluación de actividad fotoliasa/fotorreactivación.....	48
VII. DISCUSION.....	49
VIII. CONCLUSIONES.....	64
IX. PROYECCIONES.....	65
X. GLOSARIO.....	66
Unidades de Medida.....	68
X. REFERENCIAS.....	69



Índice de Figuras

Figura 1. Generación y reparación enzimática de las principales lesiones UV en el ADN. Los dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD), generados en mayor proporción (75 %) y los foto-productos de (6-4) pirimidina pirimidona (6-4 PP) (25 %) (Essen & Klar, 2006).....	13
Figura 2. Representación de la respuesta molecular de <i>D. radiodurans</i> después de la exposición a condiciones de órbita terrestre baja. Se observa en el esquema las diferentes estrategias de sobrevivencia descritas en <i>D. radiodurans</i> , acumulación de transportadores en sus membranas, mayor abundancia de proteasas en su citoplasma, proteínas reparadoras de escisión de nucleótidos, un aumento de la biosíntesis de poliaminas y aumento citosólico de Fe^{2+} , Mn^{2+} (Ott et al., 2020).....	17
Figura 3. Foto-ciclo completo de reparación de CPD por la enzima fotoliasa. Se indican los pasos elementales resueltos y el mecanismo molecular aclarado de la reparación de la lesión CPD con las escalas de tiempo de reacción ultrarápidas (femtosegundo, $1 \text{ ps} = 1 \times 10^{-12} \text{ s}$; nanosegundo, $1 \text{ ns} = 1 \times 10^{-9} \text{ s}$), mostrando el foto-ciclo de reparación desde la formación del dímero y la absorción de un fotón $h\nu$ ($FADH^*$), el movimiento del electron por los atomos de carbono (C), hasta el retorno del electrón (Zhong, 2007; Liu et al., 2011).....	23
Figura 4. Esquema de formación y fotorreparación de CPD por CPD-fotoliasa activada por UVA. La exposición a UV-R en 15mer (5'-AGAGCAGTTGACACG-3') forma CPD (5'-AGAGCAGT<>TGACACG-3') o 15mer-CPD, que es reparado por la CPD-fotoliasa usando UVA como cofactor. R1 corresponde al resto de nucleótidos (Vallejos-Almirall et al., 2020)....	37
Figura 5. Visualización de los productos de amplificación por PCR de genes <i>PHRB</i> (<i>PHRB+</i>) en gel de agarosa 0,8 %. Peso molecular (PM) 1 kb, amplicones <i>PHRB+</i> de los aislados G3.2, GW185, L7.3, Tem3, VC15 y UDEC-P1.....	43
Figura 6. Comportamiento de bacterias radio-resistentes <i>PHRB+</i> frente a la radiación UVB. (A) Recuento bacteriano en función de la dosis/tiempo de exposición UVB. (B) Curvas de decaimiento de un estado para G3.2 y de dos estados en UDEC-P1, L7.3, Tem3, VC-15 y GW185, en escala logarítmica para la determinación de las constantes de decaimiento k , $k1$ y $k2$	45
Figura 7. Curvas de crecimiento de bacterias radio-resistentes <i>PHRB+</i> a 10°C	48

Figura 8. Porcentaje de reparación de CPD/ng de bacterias radio-resistentes *PHRB+* a 10°C respecto del control negativo sin enzima..... ¡Error! Marcador no definido.



Índice de Tablas

Tabla 1. Características de aislados bacterianos obtenidos desde la Antártida y Patagonia (Cepario Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación de la Universidad de Concepción).....	30
Tabla 2. Partidores utilizados para la detección de genes de reparación del daño-UV mediante PCR.....	35
Tabla 3. Tiempos de reducción decimal (valor-D) frente a la exposición de $120 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación UVB del grupo radio-resistente.....	41
Tabla 4. Detección de los genes para la reparación del daño-UVB en el ADN mediante PCR.....	42
Tabla 5. Origen de las cepas radio-resistentes <i>PHRB+</i> , su identificación, número de acceso y las constantes de decaimiento k , $k1$, $k2$ y el valor D_{37} y D_{99}	46
Tabla 6. Recuperación de los recuentos celulares por incubación bajo luz azul y actividad de fotorreparadora CPD de extractos proteicos.....	47



I. RESUMEN

Numerosos microorganismos de ambientes extremos son también resistentes a la radiación y pueden sobrevivir a dosis de radiación ionizante mucho mayores que las presentes en el medio ambiente natural. Se ha sugerido que la resistencia a la radiación es una adaptación incidental a la resistencia a la desecación, ya que ambos peligros causan un daño celular similar en el ADN. La radiación ultravioleta de tipo B daña el ADN formando dímeros de ciclobutano pirimidina y fotoproductos (6,4) de pirimidina pirimidona. La reparación de las lesiones se realiza por la acción conjunta del repertorio de reparación del ADN. Uno de los mecanismos más antiguos evolutivamente, es la reversión directa del daño por un proceso de fotorreparación dependiente de luz azul mediado por las enzimas fotoliasas .

El objetivo de este trabajo fue la detección de actividad foto-reparadora en bacterias psicotolerantes resistentes a la radiación UVB aisladas de la Patagonia y la Antártida. Para ello, posterior a la exposición de 120 Jm^{-2} UVB se indujo el proceso de fotorreactivación con una lámpara de UVA y se evaluó el efecto en la supervivencia celular y el porcentaje de reparación de CPD mediante HPLC desde el extracto total de proteínas. Se encontró el gen de la CPD-fotoliasa clase I, *PHRB*, en 6 de las 21 cepas psicotolerantes más radio-resistentes, pero solo en *Arthrobacter* sp. VC15 se pudo establecer una relación entre el aumento de la supervivencia celular en 2,5 veces en luz azul y la actividad foto-reparadora que alcanzó $8,8 \pm 2,4$ % reparación CPD/ng a 10°C . La bacteria más eficiente en la recuperación de la viabilidad celular en luz azul y oscuridad fue *Deinococcus* sp. UDEC-P1. En *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Bacillus* sp. GW185 también se observó una alta recuperación del recuento bajo luz azul y una alta actividad fotorreparadora, pero mayores análisis son necesarios en ambas bacterias para confirmar la presencia de fotoliasas. Por lo tanto, si bien el mecanismo de fotorreactivación no estaría ampliamente distribuido en las bacterias psicotolerantes este es un factor que en algunas de ellas contribuye significativamente en la recuperación de la viabilidad celular.

ABSTRACT

Many microorganisms in extreme environments are also resistant to radiation and can survive doses of ionizing radiation much greater than those present in the natural environment. Radiation resistance has been suggested to be an incidental adaptation to desiccation resistance, as both hazards cause similar cellular damage to DNA. Type B UV radiation damages DNA forming cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine pyrimidone photoproducts (6,4). The repair of the lesions is carried out by the joint action of the DNA repair repertoire. One of the oldest mechanisms evolutionarily, is the direct reversion of the damage by a process of photorepair dependent on blue light mediated by the enzymes photoliasases. The objective of this work was the detection of photo-repairing activity in psychrotolerant bacteria resistant to UVB radiation isolated from Patagonia and Antarctica. For this, after the exposure of 120 Jm⁻² UVB, the photoreactivation process was induced with a UVA lamp and the effect on cell survival and the percentage of CPD repair was evaluated by HPLC from the total protein extract. The class I CPD-photolyase gene, PHRB, was found in 6 of the 21 most radio-resistant psychrotolerant strains, but only in *Arthrobacter* sp. VC15 could establish a relationship between the increase in cell survival by 2.5 times in blue light and the photo-repairing activity that reached $8.8 \pm 2.4\%$ CPD repair / ng at 10°C. The most efficient bacteria in recovering cell viability in blue light and dark was *Deinococcus* sp. UDEC-P1. In *Deinococcus* sp. UDEC-P1 and *Bacillus* sp. GW185 also observed a high recovery of the count under blue light and a high photorepair activity, but further analyzes are necessary in both bacteria to confirm the presence of photoliasases. Therefore, although the photoreactivation mechanism would not be widely distributed in psychrotolerant bacteria, this is a factor that in some of them contributes significantly to the recovery of cell viability.

II. INTRODUCCIÓN

II.I Radiación ultravioleta y los efectos en el ADN.

A lo largo de casi 4 mil millones de años la vida en la Tierra ha sido moldeada por las interacciones de los organismos con su medio ambiente y la radiación solar ha sido un factor que en la mayor parte de los casos ha estado presente. La radiación ha sido un factor constante y determinante en el curso de la evolución y diversificación biológica (Cockell, 1998) y además, constituye uno de los bloques básicos para el desarrollo de los procesos químicos y biológicos en los ecosistemas. Las primeras formas de vida en la Tierra primitiva estaban desprotegidas de la radiación solar al no existir una capa de ozono capaz de filtrar la radiación ultravioleta (UV) incidente (Kasting & Donahue 1980). Se ha constatado que la cantidad de oxígeno en la atmósfera terrestre debe haber sido mucho menor en el pasado que en la actualidad (Walker 1977), y sólo cuando los niveles de oxígeno aumentan en la atmósfera y la capa protectora de ozono se expande, diferentes formas de vida se extienden por el planeta hace 420 millones de años. El ozono atmosférico juega un papel importante al proteger de los diferentes tipos de radiación que pueden llegar a la superficie, por lo cual ha sido una barrera que ha moldeado la vida y permitió la evolución de la misma (Lindahl et al. 2008). La luz UV es una forma de radiación con una longitud de onda entre ~40 y 400 nm. Ha sido dividida en los rangos: UVA de 315 a 400 nm, UVB de 280 a 315 nm y UVC de 100 a 280 nm. La corta longitud de onda y la alta energía de la radiación UVC la convierten en la más dañina para los seres vivos, pero es en gran parte filtrada por la capa de ozono (Kasting 1980).

Si bien la vida se ha beneficiado de la energía proveniente del Sol, este factor ambiental puede causar daños severos a nivel celular debido a la absorción directa de los rayos UV por moléculas y estructuras celulares susceptibles. Lo cual puede provocar la fotólisis de

aminoácidos y moléculas de ADN (Cockell et al. 2000). Las longitudes de tipo UVA causan daños indirectos al inducir un estrés oxidativo por la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) que interactúan y dañan al ADN, lípidos y proteínas (Banás et al. 2020). Las radiaciones de longitud de onda más corta de tipo UVB y UVC causa daño directo al ADN por la formación de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) y fotoproductos de (6-4) pirimidina pirimidona (6-4 PP) (Figura 1) (Essen & Klar 2006). Por lo general los fotoproductos que se forman en mayor proporción son los CPD en un 75 %, seguidos de los 6-4 PP en aproximadamente un 20 a 25 % y los hidratos de pirimidina, los fotoproductos de purina, las roturas de hebras y los enlaces cruzados de ADN que se detectan con baja frecuencia en menos de un 4 % (Essen & Klar 2006; Besaratinia et al. 2011). Esta proporción cambiará de acuerdo a factores como la longitud de onda UV, la secuencia de ADN y el organismo (Chandrasekhar et al. 2000; Dany 2001). La formación de CPD provoca una distorsión

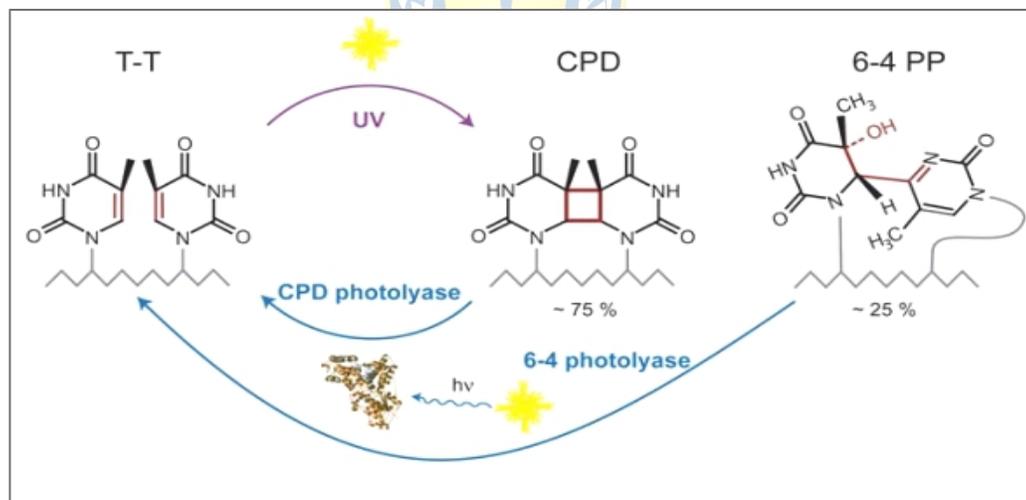


Figura 1. Generación y reparación enzimática de las principales lesiones UV en el ADN. Los dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD), generados en mayor proporción (75 %) y los fotoproductos de (6-4) pirimidina pirimidona (6-4 PP) (25 %) (Essen & Klar 2006).

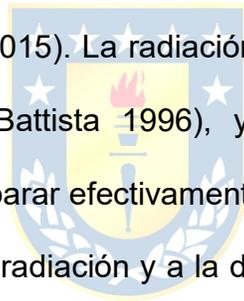
significativa de la doble hélice de ADN, se desenrolla cerca de 15° y dobla al menos 7° con respecto a la forma B del ADN (Osakabe et al. 2015), lo que es suficiente para afectar la formación del híbrido ARN:ADN (Tornaletti 2013), bloquear la progresión de las ADN y ARN polimerasas y alterar el funcionamiento celular a nivel replicativo y transcripcional (Mei-Kwei et al. 2004). La formación de dímeros incrementa la frecuencia de mutación, son citotóxicos y por tanto letales para las células procariontes y eucariontes (Banás et al. 2020). Tener la capacidad de reparación del ADN y estructuras celulares susceptibles es una función vital para los organismos expuestos a radiación UV (Chandrasekhar et al. 2000).

II.II Microorganismos radio-resistentes de ambientes fríos como modelo de estudio astrobiológico.

En los ambientes fríos existe una alta exposición a la radiación UV por encontrarse a grandes alturas o en los polos, donde la capa de ozono se encuentra debilitada. Los niveles de radiación se han calculado en $4,17 \text{ kJ/m}^2$ (2017) y $5,40 \text{ kJm}^2$ (2019) de radiación UV (Aun et al. 2019). Se ha encontrado una correlación positiva entre el aumento en la supervivencia frente a la radiación y, la disminución de la temperatura y la resistencia a la desecación. En otras palabras, los microorganismos adaptados a ambientes fríos capaces de tolerar períodos de anhidrobiosis, toleran mayores dosis de radiación UV (Mattimore & Battista 1996).

En los ambientes fríos el microbioma es de tipo psicrófilo o psicrotolerante, es decir, capaz de desarrollarse a temperaturas óptimas menores de 15°C o por debajo de $20\text{-}25^\circ\text{C}$, respectivamente (Willey et al. 2008). Estos microorganismos han desarrollado una serie de estrategias para asegurar su metabolismo en estos ambientes extremos. Por ejemplo, la reducción del punto de congelación de la fase acuosa citoplasmática, proteínas nucleares y anticongelantes que se unen al hielo e inhiben el crecimiento de cristales, cambio en la

composición lipídica de la membrana, reducción del tamaño celular, excreción de sustancias poliméricas extracelulares crioprotectoras y osmoprotectoras y enzimas protectoras que desintoxican de ROS como, la superóxido dismutasa y la catalasa (Siddiqui & Cavicchioli 2006; Casanueva et al. 2010; De Maayer et al. 2014; Ewert & Deming 2014). Estas estrategias en conjunto no sólo ayudan a tolerar, sino también a tener un metabolismo activo en las condiciones de baja temperatura, desecación e hipersalinidad a las que están expuestos (Rivkina et al. 2000). Desde los Valles Secos de McMurdo en la Antártida, con temperaturas que oscilan entre -20 y -60°C, se han aislado especies bacterianas de *Halomonas*, *Brevundimonas* y *Rhodococcus*, las cuales a -79°C y anhidrobiosos resisten dosis de radiación ionizante (RI) significativamente mayores que a -20°C y a mayores temperaturas (Dartnell et al. 2010; Musilova et al. 2015). La radiación y la desecación conducen al daño en la cadena de ADN (Mattimore & Battista 1996), y se ha demostrado para el género *Deinococcus* que su capacidad de reparar efectivamente los daños del ADN y sus proteínas lo hace extremadamente resistente a la radiación y a la desecación (Cox et al. 2010; Devigne et al. 2019). Las bacterias que pertenecen a la familia *Deinococcaceae* son algunos de los organismos más resistentes a la radiación descubiertos, de ellos, *Deinococcus radiodurans* aislada desde un envase expuesto a rayos X ha demostrado ser extremadamente resistente a la RI (10 kGy), la luz UV (254 nm, 1 kJm⁻²) (Daly et al. 2004; Cox & Battista 2005; Krisko & Radman 2013). *D. radiodurans* es de 30 más resistente a la RI que *E. coli* y más de 1.000 veces más que los seres humanos (Harsojo et al. 1981). Una de sus características de *D. radiodurans* más relevantes es que puede reparar aproximadamente 200 roturas de doble hebra (DSB) por copia del genoma sin pérdida de viabilidad celular (Slade et al. 2011). Esta bacteria en su genoma contiene los genes habituales de reparación encontrados en otras



bacterias, incluso sensibles a la radiación, pero tiene redundancia de funciones de reparación. Por ejemplo, codifica 11 ADN glucosilasas, 2 vías de reparación UV (UvrABC y endonucleasa de daño UV [UVDE]) y 2 proteínas SSB divergentes (White et al. 1999). De esta manera, la capacidad para sobrevivir a altas dosis de RI que no se encuentran comúnmente en entornos naturales en la Tierra presente o pasada, se ha propuesto como una adaptación a la desecación periódica (Mattimore & Battista 1996).

Las bajas temperaturas, la alta radiación, la desecación y la hipersalinidad son características presentes en los ambientes polares que emulan en parte a las descritas en la superficie de Marte y por lo tanto, proporcionan un valioso sitio de investigación sobre los límites de la supervivencia microbiana (Musilova et al. 2015). Los microorganismos radio-resistentes se estudian con respecto a la posibilidad de transferencia interplanetaria de microorganismos viables así como la posible existencia de vida microbiana en entornos fríos extraterrestres como el planeta Marte y otros cuerpos planetarios fríos (Baumstark-Khan & Facius 2001; Merino et al. 2019). Por lo tanto, es fundamental diseñar medidas de protección planetaria y evitar falsos positivos en los experimentos de detección de vida (Cortesão et al. 2019).

Marte es un planeta frío y seco, con una atmósfera más permisiva que la terrestre, con intensa radiación UV (190-400 nm) que promedia 10 Wm^{-2} y RI en forma de radiación cósmica galáctica y eventos de partículas solares. En la atmósfera existen procesos de fotólisis que crean un ambiente oxidativo por los radicales OH y átomos de oxígeno, los que en la superficie formarán de O_2 , O_3 y H_2O_2 (Gargaud et al. 2011). La temperatura fluctúa entre $-125 \text{ }^\circ\text{C}$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ (Cortesão et al. 2019), y la presión atmosférica es baja en comparación a la Tierra, $P_{\text{Marte}}/P_{\text{Earth}} \sim 10^{-2}$ (Martinez et al. 2009). En este contexto diversos microorganismos han sido expuestos a simulaciones de altos niveles de RI y UV con el objetivo de simular

condiciones encontradas en la superficie marciana. La experimentación se ha centrado principalmente en esporas del género *Bacillus* y en la bacteria *Deinococcus radiodurans*, microorganismos con reconocida radio-resistencia (Horneck et al. 2001). Si bien diversas esporas del género *Bacillus* pueden resistir dosis de hasta $105,6 \text{ kJm}^{-2}$ (UVC-UVB), la mayoría se inactivaría en la superficie de Marte en unas pocas decenas de minutos a unas pocas horas en la Cámara de Simulación de Marte (MSC) descrita por Schuerger (2011). Esporas de la bacteria *Bacillus subtilis* dependen del mantenimiento de la deshidratación del núcleo, la protección del ADN y la eliminación y la reparación del foto-producto 5-thyminy-5,6-dihydrothymine, para poder sobrevivir en la MSC a $0,69 \text{ kPa}$, temperaturas de $-10 \pm 2^\circ\text{C}$, una atmósfera de $95,54 \%$ CO_2 ; $2,7 \%$ N_2 , $1,6 \%$ Ar , $0,13 \%$ O_2 , $0,03 \%$ H_2O y una radiación UVB de $92,8 \text{ kJm}^2\text{h}^{-1}$ ($742,5 \text{ kJm}^{-2}$). En la simulación también se pudo demostrar que cuando radiación aumenta los mecanismos de reparación del ADN son esenciales para asegurar la viabilidad de la spora y cuando la radiación es baja y existe un menor daño en el ADN, los mecanismos de protección de multicapa son los principales actores en las esporas de *Bacillus* (Cortese et al. 2019). Por otro lado, la bacteria *D. radiodurans* expuesta a condiciones de órbita terrestre baja por 1 año fuera de la Estación Espacial Internacional (ISS) no presentó ningún daño morfológico, pero sí una acumulación de vesículas asociadas a la membrana externa, el mecanismo de reparación por escisión de endonucleasa UvrABC se activó y aumentaron en abundancia las catalasas y putrescina (Figura 2) (Paulino-Lima et al. 2011; Ott et al. 2020).

En BIOMEX (BIology and Mars EXperiment), experimento de exposición espacial de la ESA / Roscosmos ubicado dentro fuera del módulo de la ISS, destinados a abordar nuevas cuestiones en la investigación planetaria y mejorar los objetivos futuros de la exploración

espacial. Se expusieron análogos de regolitos, mezclas de minerales terrestres, bacterias, biofilms de especies de bacterias y levaduras, cianobacterias, arqueas, líquenes, algas de nieve/permafrost, hongos negros meristemáticos y briófitas de hábitats principalmente alpinos y polares de cepas resistentes a la desecación y a la radiación. Se demostró una menor resistencia y una disminución significativa en el número de células y la vitalidad con respecto al entorno similar a Marte para formas de vida multicelulares como el hongo *Cryomyces antarcticus* y los líquenes *Buellia frigida* y *Circinaria gyrosa*. De todas maneras, concluyen que el Marte actual parece ser habitable para arqueas y bacterias en escalas de tiempo más largas (de Vera et al., 2019).

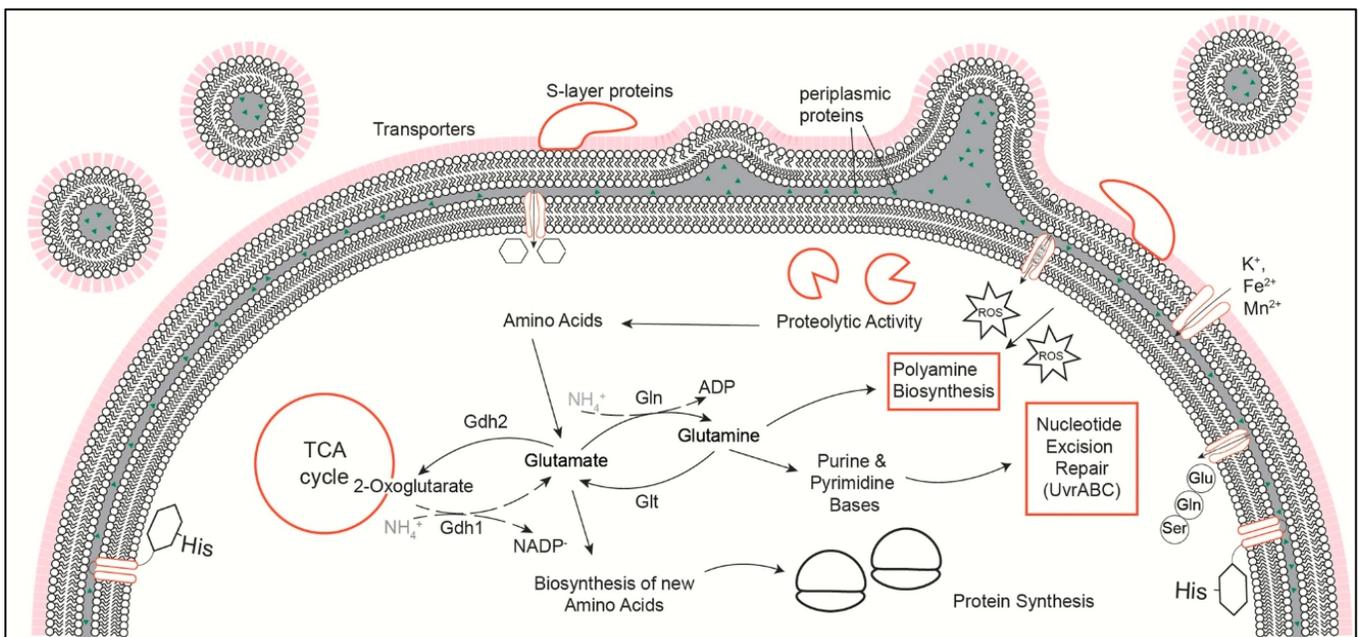


Figura 2. Representación de la respuesta molecular de *D. radiodurans* después de la exposición a condiciones de órbita terrestre baja. Se observa en el esquema las diferentes estrategias de supervivencia descritas en *D. radiodurans*, acumulación de transportadores en sus membranas, mayor abundancia de proteasas en su citoplasma, proteínas reparadoras de escisión de nucleótidos, un aumento de la biosíntesis de poliaminas y aumento citosólico de Fe^{2+} , Mn^{2+} (Ott et al. 2020).

II.III Estrategias de resistencia y reparación del daño a causa de la radiación UV.

La capacidad para reconocer el daño y reparar las conformaciones anómalas del ADN es fundamental y está presente en todas las formas de vida. En los microorganismos los mecanismos de resistencia al UV y reparación involucran de manera general desintoxicación de ROS, la presencia de pigmentos y enzimas de reparación, entre otros (Jones & Bexter 2017). La resistencia a la radiación UV y como consecuencia la supervivencia celular, depende de la interacción constante de todos estos mecanismos de protección.

Por ejemplo, una de las primeras barreras que disponen la bacterias para evitar el daño ocasionado por la UV es la pigmentación, la cual es un mecanismo de protección mediante el *quenching* de radicales libres que se originan por longitudes de onda en el rango UVA o UVB (Lemee et al. 1997). Las esporas de distintas especies del género *Bacillus* exponen diferentes coloraciones dependiendo el rango de exposición de radiación ambiental, así por ejemplo se observan pigmentos rojos en *B. atrophaeus* DSM675, esporas de *B. atrophaeus* DSM7264 gris oscuro y esporas de *B. subtilis* DSM5611 de color gris claro (Moeller et al. 2005). En otros microorganismos existen los pigmentos carotenoides que protegen al ADN del daño oxidativo, a las proteínas de la carbonilación y a las membranas de la peroxidación lipídica (Sy et al. 2015). La bacteria *Deinococcus radiodurans* muestra una pigmentación rosado brillante debido a la expresión de seis pigmentos carotenoides, siendo la deinoxantina la que se encuentra en mayor proporción (Tian et al. 2009; Leuko et al. 2017). Este pigmento es conocido por su capacidad para apagar (o *quench*) ROS, como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y radicales peroxilo (ROO) (Dartnell & Patel 2014). Incluso, se ha sugerido a la deinoxantina como un potencial biomarcador para buscar indicios de vida en otros planetas, ya que ha mostrado una fuerte resistencia al espacio exterior y las condiciones de Marte (Leuko et al.,

2017). La bacteria radio-resistente aislada desde la Patagonia *D. aquaticus* UDEC-P1, produce en alta proporción el pigmento deinoxantina, el que ha mostrado un efecto citotóxico en diversas líneas celulares de cáncer humano, probablemente a través de un mecanismo de desintoxicación de ROS (Tapia et al. 2019).

La protección del proteoma por la acción de los pigmentos corresponde a uno de los primeros mecanismos de defensa para permitir el funcionamiento de la célula frente a una condición de estrés como la radiación UV (Cortesão et al. 2019). Por otro lado, existe una variedad de mecanismos enzimáticos de defensa contra el estrés oxidativo que también contribuyen a la resistencia a la radiación (Ziegelhoffer & Donohue 2009). Este mecanismo enzimático consiste en transformar una radical en otro compuesto químico menos tóxico o no tóxico para la célula.

Las principales proteínas son la superóxido dismutasa, la catalasa y la hidropéroxido reductasa de alquilo (Steele et al. 2010). Las catalasas pueden eliminar eficazmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que las superóxido dismutasas catalizan la desproporción de dos aniones superóxido ($2O_2^-$) en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2). Las catalasas son eficientes en bacterias marinas adaptadas al frío como *Desulfotalea psychrophila*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* y la cepa de *Bacillus* sp. N2a, también es posible encontrar 3 copias del gen en *Colwellia psychrerythraea* y dos genes de la superóxido dismutasa diferentes, una superóxido dismutasa Manganeso/Hierro y otra de Níquel (Methe et al. 2005).

Mecanismos enzimáticos han evolucionado para reparar estas lesiones inducidas por los rayos UV en eucariotas, arqueas y bacterias. En bacterias hay tres mecanismos diferentes de reparación en oscuridad: (i) reparación por escisión de nucleótidos (NER), (ii) reparación recombinacional post replicación y (iii) reparación propensa a errores. Todos los mecanismos

son inducibles como parte del regulón SOS y la inducción depende del daño en el ADN (Goosen & Moolenaar 2008). Otro mecanismo dependiente de luz es la reversión directa por fotoliasas en un proceso llamado fotorreactivación o fotorreparación (Sancar & Sancar 2006). Así, los mecanismos de reparación pueden actuar y complementarse de manera diferente en cada especie bacteriana y por tanto generar diversas respuestas de resistencia (Cockell 1998), como se ha comprobado en especies de *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Cytophaga*, aisladas desde zonas frías de gran altitud en la Patagonia argentina (Fernández et al. 2006). En el estudio las bacterias exhibieron distintos grados de daño CPD en el ADN y por consecuencia, diversas sobrevivencias celulares frente al nivel de daño causado por la radiación.

II.IV Fotorreactivación o fotorreparación enzimática.

La abundancia de energía solar incidente en la Tierra ha impulsado la evolución de sofisticados sistemas foto-bioquímicos que aprovechan y utilizan la energía de la luz directamente para, entre otras cosas, la fotorreparación del ADN (Sinha & Häder 2002). La fotoliasa es la proteína de reparación del daño por rayos UV "más antigua" y que debe haber evolucionado en los primeros organismos que habitaban las regiones expuestas a la luz del sol (Walter 1983; Eisen & Hanawalt 1999; Losi & Gartner 2012) y si bien, es la forma más sencilla de reparar una lesión de CPD es una de las más eficientes (Schul 2002; Marizcurrena et al. 2017).

Esta proteína se encuentra desde bacterias hasta vertebrados, excepto en mamíferos placentarios y algunos marsupiales (Essen & Klar 2006). Las fotoliasas se han dividido en 6,4-fotoliasas y CPD-fotoliasas, y esta última se clasifica en CPD-clase I, II y III (Goosen & Moolenaar 2008). La CPD-fotoliasa de clase I se encuentra sólo en procariotas, hongos y eucariotas basales (Mei & Dvornyk 2015). La clase II también está presente en arqueas,

procariotas y virus (van Oers et al. 2004). Se pueden encontrar homólogos de CPD-fotoliasa en aproximadamente el 50 % de las especies de eubacterias y su ausencia en tantas especies bacterianas se debe probablemente a la pérdida del gen durante los procesos evolutivos del ancestro común originado muy temprano en la evolución (Goosen & Moolenaar 2008).

La primera fotoliasa identificada fue en *Escherichia coli*, una fotoliasa-CPD de clase I de 49 kDa altamente eficiente (Sancar et al. 1984). Con esta proteína se han realizado la mayoría de los estudios estructurales y funcionales de las fotoliasas (Sancar et al. 1985; Mu et al. 2005; Sancar & Sancar 2006). Las fotoliasas pertenecen a la superfamilia de flavoproteínas Fotoliasa / Criptocromo (PL / CRY), que comparten un sitio catalítico conservado de unión a FAD y un segundo cofactor de antena (Kiontke et al. 2011). El cofactor de antena es un cromóforo capaz de absorber luz azul en el rango UVA (315-400 nm) o radiación activa fotosintética (PAR, 400-700 nm). Los cromóforos pueden ser 5,10-meteniltetrahidrofolto (MTHF), 8-hidroxiazaflovina (8-HDF) o flavina mononucleotídica (FMN) (Park et al. 1995; Komori et al. 2001). Las fotoliasas reconocen lesiones CPD con una afinidad bastante alta al ADN monocatenario o bicatenario (Essen & Klar 2006). Primero y en oscuridad, la enzima reconoce la lesión en el ADN y luego, como se indica en la Figura 3 se absorbe luz o un fotón ($h\nu$), para transferir los electrones a la lesión y dividir el enlace covalente entre las pirimidinas en una fracción de segundo (nanosegundos) (Sancar 1994, 2000; Liu et al. 2011 Benjdia 2012).

Estas proteínas fueron y probablemente sean unas de las más efectivas en la reparación de lesiones mutagénicas inducidas por UV, por la poca necesidad de recursos y el poco tiempo que le toma el proceso de reparación (Schul et al., 2002). Pero, las fotoliasas por lo general

están presentes en bajas concentraciones, por ejemplo en bacterias como *E. coli* sólo se encuentran de 10 a 20 moléculas de la enzima (Sancar & Sancar, 2006; Kavaklı & Sancar, 2004).

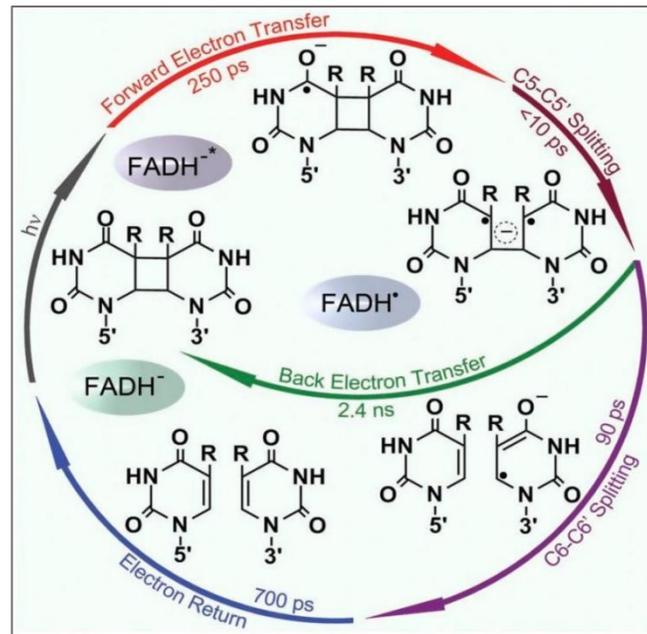


Figura 3. Foto-ciclo completo de reparación de CPD por la enzima fotoliasa. Se indican los pasos elementales resueltos y el mecanismo molecular aclarado, desde la formación del dímero y la absorción de un fotón $h\nu$ (FADH^{-*}), el movimiento del electrón por los átomos de carbono (C), hasta el retorno del electrón, con las escalas de tiempo de reacción ultrarápidas (femtosegundo, $1 \text{ ps} = 1 \times 10^{-12} \text{ s}$; nanosegundo, $1 \text{ ns} = 1 \times 10^{-9} \text{ s}$) (Zhong 2007; Liu et al. 2011).

II.V Operones de respuesta SOS frente al UV.

Plásmidos bacterianos contienen genes que codifican proteínas que participan en la resistencia UV de las células huésped que los albergan, aparentemente por un mecanismo de reparación propenso a errores que conduce a un alto nivel de mutación entre los

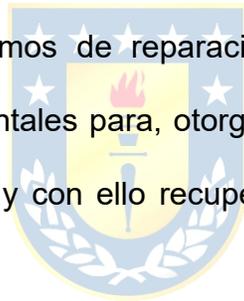
supervivientes. Estos sistemas plasmídicos son análogos del operón *umuDC* de *Escherichia coli* codificado en el cromosoma (Smith & Walker 1998). A este sistema propenso a error también se le conoce como "respuesta SOS" el cual se induce por la radiación UV y diversidad de otros productos químicos (Runyen-Janecky et al. 1999). Cada uno de los genes SOS inducible por daño tiene cerca de su sitio promotor una "caja SOS" específica de 20 nucleótidos de longitud o caja *LexA*, a la que está unida la proteína represora LexA impidiendo la unión de la ARN polimerasa y la expresión génica. La percepción del daño ocurriría a través de la unión de RecA al ADN monocatenario inmediatamente río abajo de la lesión (Sundin et al. 1996), lo que media la autoescisión de LexA y permite la expresión de los genes de respuesta SOS (Little 1993). Así, en respuesta al daño en el ADN las proteínas codificadas por los operones regulan la síntesis de ADN funcionando como una ADN polimerasa que facilita la replicación sobre cualquier lesión de ADN (Reuven et al. 1999).

Diversos genes *umuDC* ortólogos se encuentran en bacterias y muchos están codificados en plásmidos, lo que indica que su distribución actual puede verse influenciada por la transferencia horizontal de genes (Zhang & Sundin 2004). Dentro de estos operones se encuentran: *impCAB*, *mucAB*, *ruIAB*, *rumABR391* y *samAB456*. Los operones *impCAB*, *ruIAB* y *rumAB*, confieren mutagénesis inducible y/o tolerancia a la radiación UV su hospedador (Lodwick et al. 1990; Perry et al. 1985; Sundin et al. 1996). Se ha informado que *ruIAB* se expresa de manera rápida e inducible por UV con una mayor actividad promotora a mayor dosis de UVB (Kim & Sundin 2000). Por estudios de análisis de genomas completos se ha determinado la presencia de los operones *umuDC* y *ruIAB* en plásmidos de bacterias psicrófilas como en la cepa ártica *Pseudomonas* sp. GLE121, en la cepa antártica

Pseudomonas sp. MC1 y en *Sulfuricella denitrificans* skB26 originaria de un lago en Japón (Dziewit & Bartosik 2014).

El operón *impCAB* es funcionalmente análogo al operón *umuDC* y mejora la supervivencia e induce la mutagénesis en *Shigella flexneri* después de la exposición a la radiación UV. La supervivencia de *S. flexneri* SA100 después de la irradiación UV se asoció con la presencia de un plásmido de virulencia que codifica homólogos de *impA* e *impB* (Koch et al. 1995). Estudios indican que la ausencia del gen *impB* determina un fenotipo sensible a la radiación UV en comparación a los aislados que contenían *impB* (Runyen-Janecky et al. 1999). La presencia de estos operones es una función importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y, por lo tanto, aumentan el fitness evolutivo de sus huéspedes (Tark et al. 2005).

La eficiente acción de los mecanismos de reparación del material genético durante los procesos de irradiación son fundamentales para, otorgar tolerancia a la radiación, una rápida recuperación de la sobrevivencia celular y con ello recuperar la capacidad de crecimiento de la población.



Como en los ambientes fríos se puede ver favorecida la selección de microorganismos con la capacidad de resistir la radiación UV, se podría sugerir que presentan mecanismos de reparación del daño ocasionado por la exposición a radiación UV que son funcionales a las bajas temperaturas ambientales. En la presente investigación se trabajará con bacterias de ambientes fríos aisladas desde la Antártida y Patagonia, por lo tanto, en base a los antecedentes expuestos surgen múltiples interrogantes, ¿Son resistentes al UVB las bacterias aisladas de la Antártida y Patagonia?, ¿qué estrategias de protección y reparación asociados al daño-UV en el ADN presentan?, ¿son estas estrategias funcionales a bajas temperaturas?

III. HIPÓTESIS

Considerando que los microorganismos habitantes de ambientes fríos polares o de altura exhiben diversidad de mecanismos para enfrentar temperaturas cercanas a los cero grados Celsius, desecación y periodos de alta exposición a radiación UVB, se postula que:

“Bacterias antárticas y patagónicas disponen de sistemas de reparación del daño en el ADN producido por radiación UVB funcionales a temperaturas próximas a los cero grados Celsius”.





IV. OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar la presencia y funcionalidad de sistemas de reparación del daño-UVB en el ADN a temperaturas cercanas a los cero grados Celsius en bacterias aisladas desde la Antártida y la Patagonia.

Objetivos específicos.

1. Seleccionar e identificar especies bacterianas antárticas y patagónicas de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación resistentes a la radiación UVB y que codifiquen los genes *PHRB*, *ruIAB* o *impCAB* de reparación del ADN.

2. Analizar la sobrevivencia celular, el daño y la reparación del ADN causado por la radiación UVB a temperaturas cercanas a los cero grados Celsius en bacterias antárticas y patagónicas radio-resistentes.



V. MATERIALES Y METODOS

V.I Bacterias y condiciones de cultivo.

Se utilizaron 76 cepas bacterianas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología Básica y Bioremediación de la Universidad de Concepción, aisladas desde diferentes lagos de la Patagonia: Burgos, Queulat, Pingo, Témpanos, Pehoé y Antártida del Islote María Isabel, Islote Kopaitic, Rada Covadonga, Meseta de la Infantería y Bahía de Terra Nova (Tabla 1). Para este trabajo también se incluyeron aislados del Lago Nordenskjold [Lat: -51.033333 | Long: -73] y de Lago Grey [Lat: -51.041548 | Long: -73.180965] ubicado en el Parque Nacional Torres del Paine, Chile, 2018. Para ello, las muestras de agua se recolectaron en tubos cónicos de 50 ml de diferentes áreas de los lagos con una separación mínima de 10 m. Luego, se sembraron alícuotas de 100 µl en placas con agar R2A (Laboratorios DIFCO, EEUU) y se incubaron a 20 o 10°C durante 21 días. Las nuevas colonias se almacenaron en criotubos con glicerol al 15 % a -80°C. De todas las cepas aisladas, se registró la pigmentación de la colonia, afinidad al Gram, forma de la bacteria y temperaturas a las cuales se observó un desarrollo bacteriano en caldo de cultivo. Para los propósitos de esta investigación se seleccionaron microorganismos capaces de crecer a 5°C. Las 76 cepas fueron cultivadas en medio líquido R2A (Liofilchem, Italia) con y sin agitación durante 7 días a 5°C y se registró la turbidez del medio. La información recopilada de las cepas bacterianas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de aislados bacterianos obtenidos desde la Antártida y Patagonia.

Cepa	Origen	Afinidad al Gram	Forma de la bacteria	Pigmento de la colonia	Crecimiento a		
					5°C	10°C	20°C
G11.1	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Coco-bacilar	Morado claro	+	+	+
G11.2a	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Bacilar	Rosado	+	+	-
G11.2b	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Bacilar	Morado claro	+	+	-
G11.4a	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Cocacea	Naranja	+	+	+
G11.4b	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Cocacea	Naranja	+	+	-
G11.6	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Bacilar	Café claro	+	+	-
G11.9	Lago Grey, Magallanes	Positivo	Cocacea	Rosado claro	+	+	-
G1.1	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Coco-bacilar	Blanco	+	+	+
G1.2	Lago Grey, Magallanes	Positivo	Coco-bacilar	Blanco	+	+	+
G3.1	Lago Grey, Magallanes	Positivo	Cocacea	Morado claro	+	+	-
G3.2	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
G7.1	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Cocacea	Morado claro	+	+	+
G10.1	Lago Grey, Magallanes	Negativo	Cocacea	Naranja claro	+	+	-
L2.1	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Negativo	Bacilar	Naranja claro	+	+	-
L2.3	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Positivo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
L6.1	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Positivo	Bacilar	Amarillo	+	+	+
L6.2	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Negativo	Bacilar	Amarillo	+	+	+
L6.3	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Positivo	Cocacea	Blanco	+	+	-
L7.1	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Negativo	Bacilar	Morado	+	+	+
L7.2	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Negativo	Bacilar	Morado claro	+	+	-
L7.3	Lago Nordenskjöld, Magallanes	Positivo	Bacilar	Amarillo	+	+	-
Bur8	Lago Burgos, Coyhaique	Negativo	Bacilar	Amarillo	-	+	+
BurF3	Lago Burgos, Coyhaique	Negativo	Cocacea	Blanco	+	+	+
BurF4	Lago Burgos, Coyhaique	Positivo	Cocacea	Naranja	+	+	+
BurF5	Lago Burgos, Coyhaique	Positivo	Cocacea	Amarillo	-	+	+
FioF3	Lago Burgos, Coyhaique	Positivo	Cocacea	Rosado claro	+	+	+
Que3	Lago Burgos, Coyhaique	Negativo	Cocacea	Blanco	+	+	+
RP1	Río Pingo, Paine	Positivo	Cocacea	Naranja	-	+	+
RG1	Río Grey, Paine	Negativo	Cocacea	Amarillo	+	+	+
Rig1P	Punta Arenas	Negativo	Bacilar	Rosado claro	+	+	+
Rig2P	Punta Arenas	Positivo	Bacilar	Rosado	+	+	+
Rig5P	Punta Arenas	Negativo	Bacilar	Naranja	-	+	+
Rio6P	Punta Arenas	Positivo	Cocacea	Rosado	+	+	+
Rio7P	Punta Arenas	Negativo	Cocacea	Naranja	+	+	+
Tem1	Lago Témpanos, Coyhaique	Positivo	Cocacea	Amarillo	-	+	+
Tem2	Lago Témpanos, Coyhaique	Negativo	Cocacea	Amarillo	+	+	+
Tem3	Lago Témpanos, Coyhaique	Negativo	Bacilar	Blanco	+	+	+
Tem5	Lago Témpanos, Coyhaique	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
TemF2	Lago Queulat, Coyhaique	Negativo	Bacilar	Blanco	-	+	+
UDEC-P1	Lago Pehoé, Paine	Negativo	Coco-bacilar	Rosado	-	+	+
AAA-3	Islote Ma Isabel, Antártida	Positivo	Bacilar	Naranja	-	+	+
AAA-6	Islote Ma Isabel, Antártida	Negativo	Bacilar	Naranja claro	-	+	+
AAA-8	Islote Ma Isabel, Antártida	Negativo	Bacilar	Blanco	+	+	+
AAM-2	Rada Covadonga, Antártida	Positivo	Bacilar	Amarillo claro	-	+	+

AAM-8	Rada Covadonga, Antártida	Negativo	Cocacea	Rosado	+	+	-
AAM-10	Rada Covadonga, Antártida	Positivo	Coco-bacilar	Amarillo	-	+	+
AAM-12	Rada Covadonga, Antártida	Negativo	Bacilar	Amarillo	+	+	+
AAM-13	Rada Covadonga, Antártida	Positivo	Cocacea	Blanco	+	-	-
AAM-15	Rada Covadonga, Antártida	Negativo	Cocacea	Amarillo claro	+	-	-
AP-6	Islote kopaitic, Antártica	Positivo	Bacilar	Blanco	-	+	+
ATH-2	Meseta de la Infantería, Antártida	Negativo	Coco-bacilar	Amarillo	-	+	+
ATH-3	Meseta de la Infantería, Antártida	Negativo	Coco-bacilar	Blanco	+	-	-
ATH-6	Meseta de la Infantería, Antártida	Negativo	Cocacea	Amarillo	-	+	+
ATH-12	Meseta de la Infantería, Antártida	Negativo	Cocacea	Amarillo	+	+	+
AMF-8-ch	Rada Covadonga, Antártida	Positivo	Cocacea	Naranja claro	-	+	+
AMF-8-gr	Rada Covadonga, Antártida	Positivo	Cocacea	Naranja claro	-	+	+
VC-1	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Negativo	Bacilar	Translucida	-	+	+
VC-5	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Positivo	Cocacea	Amarillo claro	+	+	+
VC-7	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Negativo	Coco-bacilar	Blanco	+	+	+
VC-9	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Negativo	Bacilar	Blanco	-	+	+
VC-10	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Positivo	Cocacea	Blanco	-	+	+
VC-12	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Positivo	Cocacea	Blanco	-	+	+
VC-15	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Positivo	Cocacea	Blanco	+	+	+
VC-16	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Positivo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
VC-22	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Negativo	Bacilar	Blanco	+	+	+
VC-23	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Positivo	Cocacea	Blanco	+	+	+
VC-27	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Negativo	Coco-bacilar	Blanco	+	+	+
VC-28	Islote Isabel Riquelme, Antártida	Negativo	Bacilar	Blanco	+	+	+
CAL606 I	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
CAL606 II	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
GW185 I	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Coco-bacilar	Amarillo claro	+	+	+
GW185 II	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Coco-bacilar	Amarillo claro	+	+	+
MER144 I	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
MER144 II	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
GN38N I	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+
GN38N II	Bahía de Terra Nova, Antártida	Negativo	Bacilar	Amarillo claro	+	+	+

(+) Bacterias capaces de crecer y (-) no capaces de crecer a la temperatura ensayada.

Las bacterias pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación de la Universidad de Concepción, Chile.

V.II Selección de cepas bacterianas resistentes a la radiación UVB.

V.II.I Determinación del tiempo de reducción decimal (valor-D).

La supervivencia celular de las 55 cepas se evaluó calculando el tiempo de reducción decimal (valor-D), el cual indica el tiempo o dosis de radiación requerida para lograr una reducción logarítmica del 90 % de la población (FDA de EEUU, 2018). Para ello, desde 2 ml de cultivos

frescos ($DO_{600} \sim 0,7-1,2$), se obtuvo un sedimento bacteriano mediante centrifugación a 6.000 rpm por 5 min. Los sedimentos se lavaron 2 veces con PBS 1X y se diluyeron 10 veces para obtener una concentración aproximada de 10^7 UFCml⁻¹. Por triplicado se añadieron 4 ml de la suspensión a una placa Petri (60x15 mm) y se ubicaron a 15 cm por debajo de una lámpara de radiación UV MRL-58 (UVB 280-320 nm), con una irradiancia de 0,2 Wm⁻². La lámpara UVB se encendió 10 min antes de la exposición para su estabilización. Las muestras se expusieron a 120 Jm⁻²s⁻¹ y se determinaron los recuentos celulares a tiempo inicial y final mediante recuento de células viables (Strahsburger et al. 2016). Se determinó el valor-D según la fórmula: $valor\ D = \frac{x}{\log(N0 / Nx)}$, donde x es el tiempo de exposición en min, $N0$ es el recuento a tiempo 0 y Nx corresponde al recuento a tiempo final, x .

V.II.II Curvas de muerte y determinación de la dosis letal 37 (D₃₇).

La resistencia de los microorganismos a los rayos UVB se puede comparar estimando la dosis de D37 (Arrage et al. 1993). La dosis 37 (D₃₇) se determinó para las 20 cepas bacterianas con el valor D más alto > 1,5 min, para la cual se debe contruir una curva de decaimiento o curva de muerte, según la metodología descrita para determinar el valor-D. Aquí, se obtuvieron alicuotas de 200 µl de la suspensión bacteriana cada 60 s hasta completar 600 s de exposición UVB (120 Jm⁻²s⁻¹). La viabilidad celular se determinó mediante el recuento de células viables mediante el método de microgota. La irradiación se llevó a cabo a 10°C con una lámpara UVB MRL-58 (UVB280-320 nm, 0,2 Wm⁻²) y se construyeron las curvas de decaimiento con la fracción de supervivencia en escala logarítmica en función de la dosisUV. Para la mayoría de los microorganismos generalmente está presente una desintegración lineal, que describe una desintegración de primer orden con una constante, k (Chick et al. 1963). Por

otro lado, las poblaciones de una especie resistente a los rayos UV describen dos comportamientos, por lo tanto, se presenta una curva de desintegración de dos etapas con constantes k_1 y k_2 . La D_{37} y D_{99} se estimaron a partir de la regresión lineal de la disminución exponencial de UFC con el tiempo o dosis, de acuerdo con la fórmula $D_{37} = - (\ln (1 - 0,37)) / kx$, donde kx representa la constante de desintegración UV correspondiente. Por lo tanto, para aquellos con una desintegración de dos fases, la D_{37} se estimó con la constante k_1 (Kowalski & Wladyslaw 2009). Dado que la fracción resistente es a menudo menos del 1 %, la segunda etapa solo se manifiesta con valores D_{99} .

V.II.III Cálculo de dosis UVB.

La dosis de radiación UV o Fluencia expresada en $\text{Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ se calculó de acuerdo a la fórmula: $D = E_t \times I_R$, donde D , es Fluencia ($\text{Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$), E_t es tiempo de exposición en segundos e I_R corresponde a la irradiancia de la lámpara en Wm^{-2} . En este trabajo se utilizó la lámpara MRL-58 (UVB 280-320 nm), con una irradiancia de $0,2 \text{ Wm}^{-2}$.

V.III Detección de genes de reparación del ADN mediante PCR.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron los genes de reparación del daño-UV: *PHRB* para fotoliasas y los genes del sistema SOS plasmidiales *ruIB* e *impB*. Los partidores utilizados para la detección de los genes se informan en la Tabla 2. Se utilizaron distintos sets de partidores para el gen *PHRB*: *EcPL* corresponde al gen de la fotoliasa presente en *Escherichia coli* y *CpPL* corresponde al gen de la fotoliasa de la bacteria psicrófila *Colwellia psychrerythraea* 34H. Los otros partidores de fotoliasa se obtuvieron por diseños previos en donde se alinearon regiones altamente consensuadas de diferentes géneros bacterianos. Para el género *Pseudomonas* se utilizaron los partidores *PsPL*, para

Sphingomonas los partidores *SpPL* y *PHPR* sintetizado por Yasui (1994). La secuencia codificante del operón *ruIAB* fue amplificada por los partidores *ruIAB* y para el operón plasmidial *impCAB* se utilizaron los partidores *impB*. Para *EcPL* se espera un tamaño de amplicon de 700pb

La búsqueda se realizó para las cepas radio-resistentes con los valores-D más altos, desde las cuales se purificó su ADN genómico con Fenol/Cloroformo de acuerdo a Wright (2017). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl con el kit de ADN polimerasa GoTaq Flexi (Promega, EEUU), de la siguiente manera: desnaturalización previa a 95°C por 3 min, seguida de 33 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación en gradiente durante 45 s, elongación a 72°C por 45 s; finalmente una post-elongación a 72°C por 10 min. Diez microlitros de los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 %. Se determinó la temperatura del gradiente a la cual se obtuvo el producto PCR del tamaño esperado y con una buena intensidad de banda.



V.IV Identificación de bacterias con genes de reparación.

Las bacterias en las cuales se detectó la presencia de los genes de reparación indicados en el punto 4.3 se identificaron mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S. Para ello, mediante PCR se amplifica el gen ARNr 16S con los partidores 8F y 1492R (Weisburg et al. 1991). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl con el kit de ADN polimerasa GoTaq Flexi (Promega, EEUU), de la siguiente manera: Predenaturación a 94°C durante 5 min, seguido por 33 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, hibridación por 45 s a 55,6°C, y elongación a 72°C por 1,5 min; finalmente una post-elongación a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 %. Se purificó el

amplicón desde el gel de agarosa mediante el kit de extracción de gel EZNA (Omega Bio-Tek, EEUU). El ADN se envió resuspendido en agua (grado biología molecular), hacia la empresa

Tabla 2. Partidores utilizados para la detección de genes de reparación del daño-UV e identificación bacteriana.

Nombre del gen	Partidores	Secuencias 5'-3'	Microorganismo de procedencia	Referencia
<i>EcPL</i>	<i>EcPLFwr</i>	GGGCTACAAATAGCGCTTGC	<i>Escherichia coli</i>	Monk et al., 2016
	<i>EcPLRev</i>	TCCTGCCAGGCCTGTAAATG		
<i>CpPL</i>	<i>CpPLFwr</i>	CTGT CATATGTTGCTACTTTGGCTCCGTAATGACC	<i>Colwellia psychrerythraea</i> 34H	Munshi et al., 2017
	<i>CpPLRev</i>	CTGTCTCGAGTTACACCTTATAAAAA GCTAACGCTTTTAAC		
<i>PsPL</i>	<i>PsPLFwr</i>	CAYGAYGAYGCNCCNTGYAA	<i>Pseudomonas</i>	Marizcurrena et al., 2017
	<i>PsPLRev</i>	NSWCCAYTGCCANCCNCCR TTRTT		
<i>SpPL</i>	<i>SpPLFwr</i>	TGGTGGYTNCAYCAYWSNYT	<i>Sphingomonas</i>	Marizcurrena et al., 2017
	<i>SpPLRev</i>	NGCNARNG GNACCCA		
<i>PHPR</i>	<i>PHPRFwr</i>	TGGYWYMGVRGBAYYTVCG	-	Yasui et al., 1994
	<i>PHPRRev</i>	GARGCGYCCACTGCCARCCRC		
<i>rulAB</i>	<i>rulABFwr</i>	GGAATTCCATATGAACGTCAAATACTCGGGCGG	<i>Pseudomonas syringae</i>	Kim et al., 2000
	<i>rulBRev</i>	GATCGGATCCTTACTTTACAACCCACAGCTG		
<i>impB</i>	<i>impBFwr</i>	CACTCGATGAACTGAACC	<i>Shigella flexneri</i>	Runyen-janecky et al., 1999
	<i>impBRev</i>	GGTGCTTTGCAATCTGC TG		

Macrogen CO. en Seúl, Corea del Sur, que ofrece el servicio de Secuenciación de Electroforesis Capilar (CES) completa del gen ARNr 16S.

V.V Curvas de crecimiento bacteriano a 10°C.

Para las especies bacterianas radio-resistentes con presencia del gen *PHRB* de reparación (*PHRB+*), se construyeron curvas de crecimiento a 10°C. El objetivo de este experimento fue determinar los tiempos de duplicación para descartar que las incubaciones a 10°C afecten de manera significativa los recuentos celulares. De esta manera, los posibles aumentos en los recuentos podrán atribuirse a un efecto del tratamiento a evaluar y no a la duplicación celular

por efecto del tiempo. Para cada bacteria y por triplicado se preparó un inóculo fresco en medio de cultivo R2A a 10°C. Luego de 72 h de incubación 100 µl de cada suspensión bacteriana fueron inoculados en 50 ml de caldo R2A y se incubaron a 10°C con agitación constante de 120 rpm por aproximadamente 4 días. Se realizó recuento de células viable por microgota luego de 3 días de incubación (Strahsburger et al. 2016).

V.VI Ensayos de fotorreparación y recuperación del recuento celular.

Las pruebas de irradiación UVB para evaluar la capacidad reparadora o fotorreparación se llevaron a cabo como se describió en 4.2.1 pero, posterior a los 10 min de irradiación, una alicuota de 2 ml fue depositada en una placa de Petri y se incubó durante 1 h con una lámpara fluorescente azul PL-36W UVA 2G11, ElectroSect (Vallejos-Almirall et al. 2020). Como control, otra alicuota de igual volumen se incubó en oscuridad sin estimulación de fotorreparación. La recuperación del recuento celular se controló después de 48 ó 72 h mediante recuento de células viables. Se registraron los recuentos (UFCml⁻¹) y se determinó la recuperación celular a causa de la incubación con luz azul y se comparó con la recuperación obtenida en oscuridad. Las irradiaciones fueron realizadas a 10°C. Las UFC se utilizan para establecer recuentos de microorganismos unicelulares como bacterias, la pérdida de las UFC a menudo se equipara con muerte celular (Barendsen 1992).

V.VII Evaluación de la actividad fotoliasa mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En este ensayo se evaluó la actividad fotoliasa del extracto proteico total o extracto crudo (Vallejos-Almirall et al. 2020). La actividad de la CPD-fotoliasa o la restauración del daño en el

ADN se evaluó mediante el incremento del sustrato reparado (15mer) a partir del sustrato mutado (15mer-CPD) como muestra la Figura 4.

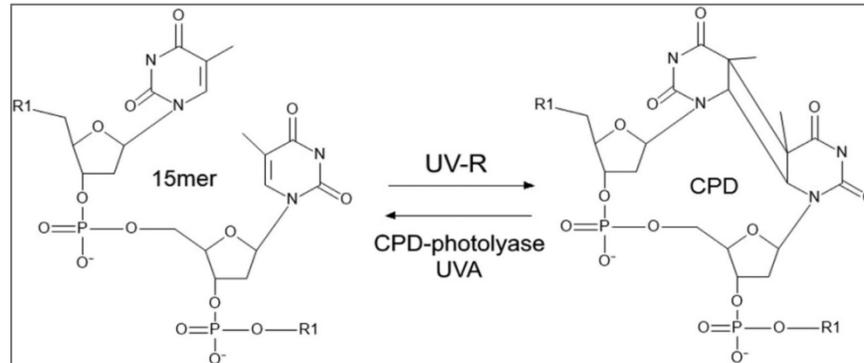


Figura 4. Esquema de formación y fotorreparación de CPD por CPD-fotoliasa activada por UVA. La exposición a radiación ultravioleta en 15mer (5'-AGAGCAGTTGACACG-3') forma CPD (5'-AGAGCAGTTGACACG-3') o 15mer-CPD, que es reparado por la CPD-fotoliasa usando UVA como cofactor. R1 corresponde al resto de nucleótidos (Vallejos-Almirall et al. 2020).

V.VII.I Extracción de proteína total.

Las bacterias *PHRB+* fueron cultivadas durante 48 h con luz blanca con el objetivo de inducir la expresión de la fotoliasa como se ha observado en organismos con foto-periodos (Cheng et al. 2007). Los sedimentos celulares obtenidos se resuspendieron en 3 ml de una solución tampón de lisis (TrisHCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; Inhibidor de proteasa; Glicerol 10 %; NaCl 100 mM; DTT 1 mM). Las células bacterianas fueron sonicadas por un tiempo total de 3 min; Pulso: 10 s; Pausa: 30 s, Amplitud: 80 %; Procesador ultrasónico CPX130 / punta de sonda CV18 (Cole-Parmer Instruments, EEUU). El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 13.000 rpm por 15 min a 4°C (centrífuga Fresco 17R, Thermo Fisher). La cantidad de proteína total fue estimada por Bradford (595 nm) utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Bradford 1976).

V.VII.II Síntesis del sustrato 15mer-CPD.

La actividad CPD-fotoliasa se realizó de acuerdo a Vallejos-Almirall y colaboradores (2020). El sustrato de la enzima fotoliasa-CPD utilizado fue un 15mer (IDT Technologies, EEUU) con un dímero central de timidina ciclobutano 5'-AGAGCAGTTGACACG-3', designado como 15mer-CPD. El sustrato fue sintetizado con 50 μ M del oligonucleótido 15mer en 10 % de acetona (grado HPLC), 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), EDTA 1 mM y purgado con $N_{2(g)}$. Esta solución fue irradiada a 5 cm por 1 h con UVB (lámpara TL20W/12RS, Philips) y se purificó por HPLC según describe Mu (2005). La separación cromatográfica se realizó por HPLC Shimadzu Nexera (Kyoto, Japón), equipado con una columna Oligo-XT de 2,6 μ m (50x2,1 mm) (Phenomenex, EEUU). Esta experimentación fue realizada en el Departamento de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción.



V.VII.III Ensayo de fotorreparación.

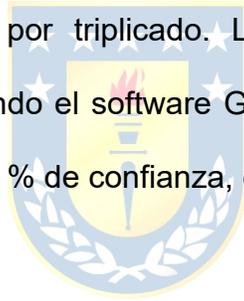
La mezcla de reacción se realizó en 200 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, glicerol al 5 %, EDTA 1 mM y DTT 1 mM y 1,22 μ M dT, a la que se agregaron 15 μ M 15mer-CPD y el estándar interno dT₍₁₅₎ a 1 μ M (5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3') y 10 μ l de extracto crudo. La mezcla se mantuvo durante 10 min en oscuridad para luego ser irradiada por 1 h a 10°C a 2 cm de una lámpara fluorescente azul (PL-36W UVA 2G11, ElectroSect). Los controles fueron: un control sin sustrato (sin 15mer-CPD), un control negativo sin enzima (sin extracto crudo) y como control positivo o de fotorreparación se utilizó un extracto proteico purificado de la cianobacteria *Synechococcus leopoliensis* para el cual ya se ha demostrado actividad fotorreparadora en Vallejos-Almirall (2020).

Las reacciones se detuvieron extrayendo los oligonucleotidos con 500 μ l de NH_4OH al 5 % y 100 μ l de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25/24/1, Sigma-Aldrich) (Zhang et al. 2007).

Luego se centrifugaron a 11.000 g por 5 min 2 veces y se eliminó el exceso de fenol de la fase acuosa. La fase acuosa se secó al vacío y se agregaron 100 µl de fase móvil (15 mM Diisopropiletilamina / 20 mM hexafluoroisopropanol en metanol). Se inyectaron 10 µl de la reacción para detección por HPLC-MS/MS. Se determinó la actividad de la CPD-fotoliasa por el incremento de 15mer reparado desde 15mer-CPD expresado como % de reparación de CPD por nanogramo de extracto de proteína total (% reparación CPD/ng). La reparación registrada por las bacterias en estudio fue corregida con respecto a la determinación del control negativo.

V.VIII Análisis estadístico.

Todas las muestras se analizaron por triplicado. Las diferencias entre tratamientos se compararon mediante ANOVA utilizando el software GraphPad Prism v6.0 y se consideraron estadísticamente diferentes con un 95 % de confianza, cuando el valor $p < 0.05$.



VI. RESULTADOS

VI.I Selección de bacterias psicrotolerantes.

Este trabajo tenía como objetivo detectar la presencia de mecanismos de reparación del ADN funcionales a bajas temperaturas en la colección de bacterias Antárticas y Patagónicas del Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación de la Universidad de Concepción. Para ello, de un total de 76 cepas se seleccionaron las bacterias capaces de crecer a 5°C. El 72,4 % de las cepas utilizadas en este trabajo fueron capaces de crecer a 5°C, de ellos, el 72,7 % fueron Gram negativos y exhibieron diversidad de pigmentaciones en sus colonias (Tabla 1). Además, 73 cepas (96,0 %) pudieron desarrollarse a 10°C y 61 cepas (80,4 %) a 20°C (Tabla 1), lo que sugiere un fenotipo psicrotolerante, con temperaturas óptimas de crecimiento menores a 20°C (Willey et al. 2008). Sólo 2 cepas fueron estrictamente psicrófilas y no mostraron desarrollo microbiano o turbidez a 10 ó 20°C, pero sí a 5°C. Las 55 cepas capaces de crecer a 5°C fueron seleccionadas para evaluar la resistencia a la radiación UVB.

VI.II Selección de bacterias radio-resistentes.

El valor-D indica la dosis necesaria para matar al 90 % de la población microbiana (FDA EEUU 2018). Veintiún bacterias con valores-D mayores a 1,5 min, con recuentos finales cercanos a 10^2 UFCml⁻¹ correspondieron a las más resistentes del grupo de estudio y se informan en la tabla 3. Entre ellas las cepas UDEC-P1, BurF3, Rig1P y GW185 mostraron los valores-D más altos, mayores a 3 min, lo que equivalentes a $36 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación UVB. La mayoría de los 55 aislados no sobrevivieron a la exposición de $120 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ UVB a 10°C y no se registró recuento celular durante los primeros 60 s de exposición UVB ($12 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$) (datos

no mostrados). El grupo de 21 cepas fue seleccionado para la búsqueda de los genes de reparación del daño-UV en el ADN.

Tabla 3. Tiempos de reducción decimal (valor-D) frente a la exposición de $120 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación UVB del grupo radio-resistente.

Aislado	valor-D (min)
UDEC-P1	3,5
G11.4a	2,2
G11.6	2,2
G3.1	2,2
G3.2	1,6
L6.1	1,5
L6.3	1,8
L7.3	1,5
BurF3	3,4
BurF4	2,6
RP1	1,6
Rig1P	3,3
Rig2P	2,7
Tem1	2,7
Tem2	1,9
Tem3	1,7
VC-12	2,6
VC-15	1,7
VC-27	1,7
VC-28	1,8
GW185	4,0

VI.III Detección de genes de reparación del daño-UV en el ADN.

Los genes de reparación del daño-UV, el gen *PHRB*, el gen *ruIB* y el gen *impB* se buscaron mediante la técnica de PCR convencional. La presencia del gen *PHRB* se evaluó utilizando cinco conjuntos diferentes de partidores, lo que permitió la obtención de un o dos productos PCR de diferentes tamaños en 6 cepas bacterianas como se observa en la Tabla 4 y la Figura 5. Se detectó la amplificación de productos PCR en las cepas G3.2, GW185, L7.3, Tem3,

VC15 y UDEC-P1. Sin embargo, en algunos casos el tamaño del producto de PCR no corresponde a los tamaños esperados. Por ejemplo, los productos PCR de la bacteria GW185 no corresponden a los 776 pb esperados, por lo tanto ambos productos PCR deben secuenciarse y comparar las secuencias con las bases de datos para confirmar o descartar homología con el gen de la fotoliasa. Por otro lado, sí se obtuvieron productos del tamaño esperado en las cepas L7.3 y Tem3 con un producto PCR de cerca de 800 pb, y también en las cepas G3.2, VC15 y UDEC-P1 con un producto PCR cercano a 1 kb. Las cepas bacterianas fueron identificadas como miembros de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Deinococcus* y *Pseudomonas* en base a las similitudes de sus secuencias de rADN 16S (BlastX) con cepas de referencia almacenadas en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Tabla 5). No se identificaron genes de reparación SOS plasmidiales.



VI.IV Evaluación de sobrevivencia asociada a actividad fotorreparadora.

VI.IV.I Constantes de decaimiento (k) y dosis letal 37 (D_{37}).

Después de la exposición a $120 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 10°C todas las bacterias mostraron pérdida de viabilidad celular, es decir, una reducción en sus recuentos celulares (UFCml^{-1}). Las cepas G3.2, GW185, L7.3, Tem3 y VC15 redujeron su población en más de 5 logaritmos. *Deinococcus* sp. UDEC-P1, disminuyó dos logaritmos su recuento celular y mostró una curva de decaimiento más lenta y constante en el tiempo en comparación a curvas de las otras cepas *PHRB+* como se observa en la Figura 6A.

La determinación del valor D_{37} se obtuvo desde los datos de la Figura 6B, gráfica que representa la fracción superviviente en relación a la dosis de radiación UVB.

Tabla 4. Detección de los genes para la reparación del daño-UVB en el ADN mediante PCR.

Cepa	Gram	Genes de reparación						
		<i>EcPL</i>	<i>CpPL</i>	<i>PsPL</i>	<i>SpPL</i>	<i>PHPR</i>	<i>ruIAB</i>	<i>impB</i>
UDEC-P1	Negativo	-	-	-	-	+	-	-
G11.4a	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
G11.6	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
G3.1	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
G3.2	Negativo	-	-	+	-	-	-	-
L6.1	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
L6.3	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
L7.3	Positivo	+	-	-	-	-	-	-
BurF3	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
BurF4	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
RPlç1	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
Rig1P	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
Rig2P	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
Tem1	Positivo	-	-	-	-	-	-	-
Tem2	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
Tem3	Negativo	+	-	-	-	-	-	-
VC-12	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
VC-15	Positivo	-	-	-	-	+	-	-
VC-27	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
VC-28	Negativo	-	-	-	-	-	-	-
GW185	Negativo	+	-	-	-	-	-	-

La tabla muestra la presencia (+) o la ausencia (-) del producto PCR correspondiente al gen en estudio: gen *PHRB* se buscó con 5 partidores: *EcPL*, *CpPL*, *PsPL*, *SpPL* y *PHPR* y los genes *ruIAB* e *impB* que codifican para sistemas de reparación propensa a error plasmidiales con los partidores *ruIAB* e *impB*, respectivamente.



Figura 5. Visualización de los productos de amplificación por PCR de genes *PHRB* (*PHRB+*) en gel de agarosa 1 %. Peso molecular (PM) 1 kb, amplicones *PHRB+* de los aislados G3.2, GW185, L7.3, Tem3, VC15 y UDEC-P1.

Las bacterias *Arthrobacter* sp. VC-15, *Arthrobacter* sp. L7.3, *Bacillus* sp. GW185 y *Pseudomonas* sp. Tem3 demostraron un decaimiento de dos fases y el cálculo de la D_{37} se obtuvo tomando en cuenta las constantes de velocidad k_1 informadas en la Tabla 5. La bacteria *Pseudomonas* sp. G3.2 y *Pseudomonas* sp. Tem3 describieron curvas de decaimiento de un estado o logarítmico lineal (log-lineal) (Figura 6B), sin un hombro inicial en la curva, por lo tanto está descrita por sólo una constante, k (Tabla 5). *Deinococcus* sp. UDEC-P1 (UV k_1 de $0,070 \text{ m}^2\text{J}^{-1}$) y *Bacillus* sp. GW185 (UV k_1 de $0,111 \text{ m}^2\text{J}^{-1}$), con una D_{37} de $7 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $4 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente, corresponden a los valores más altos encontrados. El resto de las bacterias mostró una D_{37} por debajo de $3 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

VI.IV.II Recuperación del recuento celular asociado a la actividad fotorreparadora de la CPD-fotoliasa.

El efecto de la fotorreactivación o actividad fotorreparadora en la recuperación de los recuentos celulares se evaluó comparando los recuentos celulares resultantes de la incubación con luz azul y oscuridad luego de la exposición UVB. *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Pseudomonas* sp. Tem3 mostraron la tasa de recuperación más alta en oscuridad (sin luz azul) como se observa en la Tabla 6. Después de $120 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ la población de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 disminuyó de $2,13 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$ a $2,80 \times 10^3 \text{ UFCml}^{-1}$, pero después de 1 h en oscuridad la bacteria alcanzó un recuento de $1,70 \times 10^4 \text{ UFCml}^{-1}$, siendo 6,1 veces más que el recuento resultante posterior a la exposición UVB. Se observó un resultado similar en *Pseudomonas* sp. Tem3 que recuperó su población 6,3 veces en oscuridad, desde $1,4 \times 10^2 \text{ UFCml}^{-1}$ a $8,80 \times 10^2 \text{ UFCml}^{-1}$. Las otras bacterias no mostraron una recuperación significativa e incluso se observaron recuentos más bajos, como en *Pseudomonas* sp. G3.2.

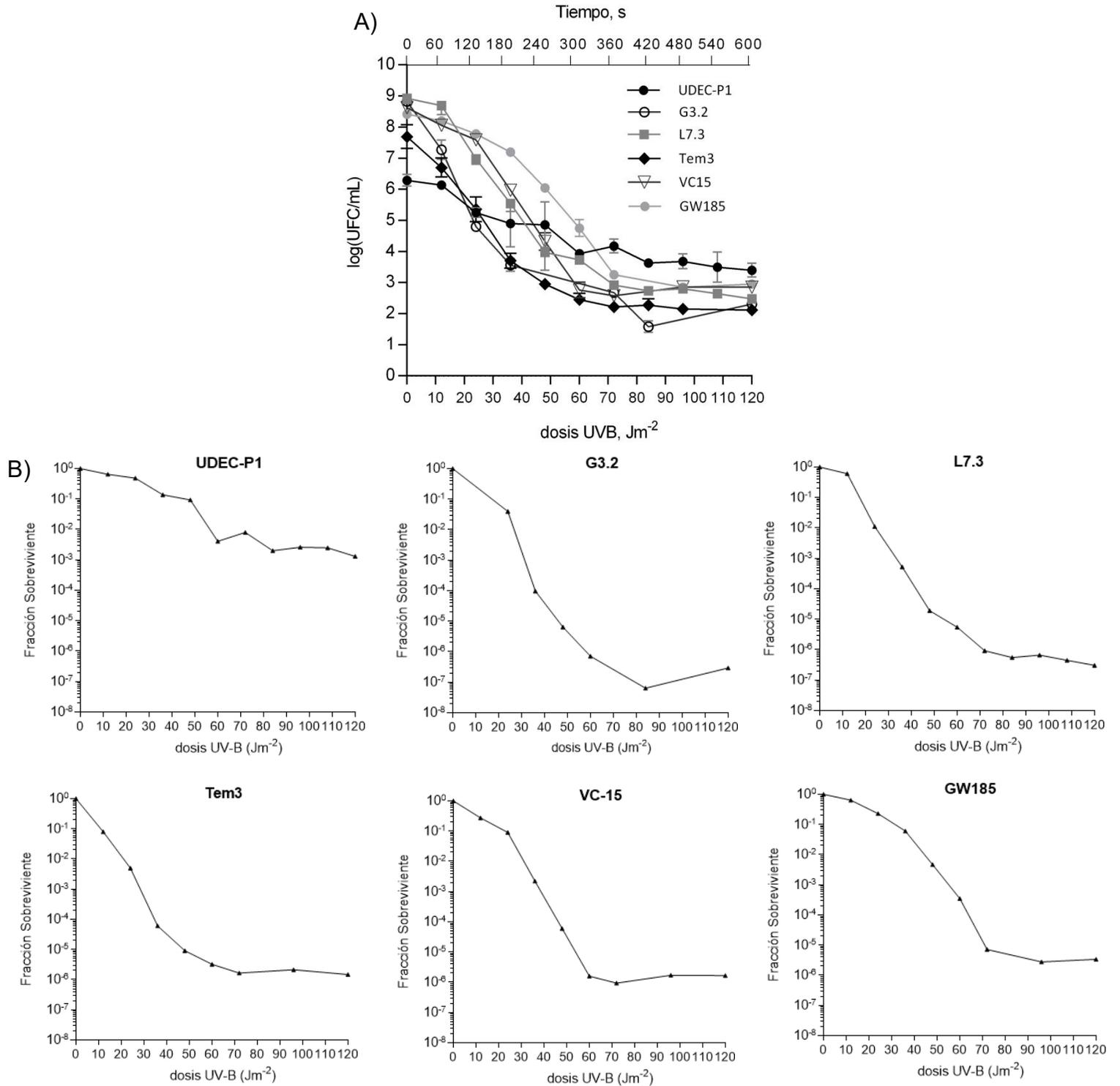


Figura 6. Comportamiento de bacterias radio-resistentes *PHRB+* frente a la radiación UVB. (A) Recuento bacteriano en función de la dosis/tiempo de exposición UVB. (B) Curvas de decaimiento es escala logarítmica para la determinación de las constantes de decaimiento.

Tabla 5. Origen de las cepas radio-resistentes *PHRB+*, su identificación, número de acceso y las constantes de decaimiento k , $k1$, $k2$ y las D_{37} y D_{99} .

Cepas <i>PHRB+</i>	Familiar más cercano	Número de acceso	UV k m^2J^{-1}	UV $k1$ m^2J^{-1}	UV $k2$ m^2J^{-1}	D_{37} Jm^{-2}	D_{99} Jm^{-2}	r^2
UDEC-P1	<i>Deinococcus aquaticus</i>	NR_043472.1	0,062	0,070	0,028	6,60	65,79	0,89
G3.2	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	HQ825056.1	0,217	nd	nd	2,35	23,38	0,94
L7.3	<i>Arthrobacter</i> sp.	AY864629.1	0,155	0,191	0,053	2,42	24,11	0,90
Tem3	<i>Pseudomonas</i> sp.	KR778803	0,155	nd	nd	2,98	18,72	0,98
VC-15	<i>Arthrobacter aurescens</i>	X83405.2	0,148	0,197	0,012	2,35	23,38	0,93
GW185	<i>Bacillus altitudinis</i>	NR_042337.1	0,122	0,111	0,016	4,16	41,49	0,89

La tabla muestra el origen de cada especie bacteriana *PHRB+*, la afiliación filogenética propuesta basada en BLASTn (página web del NCBI), incluido el número de acceso del ADNr 16S, las constantes de desintegración UV k , $k1$, $k2$ y las D_{37} y D_{99} . Las D_{37} se calcularon a partir de la línea de regresión de la disminución exponencial de UFC con el tiempo. Los valores corresponden a los promedios de tres experimentos independientes. El r^2 de la regresión se proporciona como una indicación de la calidad del ajuste. *nd* no determinado.

Los recuentos obtenidos tras la incubación de 1 h en luz azul fueron corregidos con los resultados obtenidos en 1 h de oscuridad (Tabla 6). *Deinococcus* sp. UDEC-P1 obtuvo el recuento de recuperación más alto en luz azul desde $2,80 \times 10^3$ a $9,60 \times 10^4$ UFCml⁻¹, a este se le resta el recuento obtenido en oscuridad y se obtiene una tasa de recuperación en luz azul de 28,2. *Bacillus* sp. GW185 I también mostró una alta tasa recuperación de 11,5, desde un recuento de $8,90 \times 10^2$ a uno de $1,10 \times 10^4$ UFCml⁻¹. *Arthrobacter* sp. VC-15 y L7.3 mostraron una recuperación que no fue significativa bajo luz azul, mientras que en las bacterias *Pseudomonas* sp. G3.2 y Tem3 no se registró un aumento en el recuento a causa de la incubación en luz azul.

Tabla 6. Recuperación de los recuentos celulares por incubación bajo luz azul y actividad fotorreparadora CPD de extractos proteicos.

Bacteria	UFCml ⁻¹ 0Jm ⁻²	UFCml ⁻¹ 120Jm ⁻² s ⁻¹	UFCml ⁻¹ oscuridad	UFCml ⁻¹ luz azul	Tasa de recuperación en oscuridad	Tasa de recuperación en luz azul	% reparación 15mer- CPD/ng	Pigmentación
<i>Deinococcus</i> sp.UDEC-P1	2,13x10 ⁶	2,80x10 ³	1,70x10 ⁴	9,60x10 ⁴	6,1	28,2	9,3 ± 1,8	Rosado
<i>Pseudomonas</i> sp. G3.2	7,00x10 ⁸	2,10x10 ²	8,80x10 ¹	3,80x10 ¹⁰	0,0	0	6,6 ± 3,6	Amarillo claro
<i>Arthrobacter</i> sp.L7.3	9,83x10 ⁸	3,00x10 ²	6,40x10 ²	1,10x10 ³	2,1	1,5	0	Amarillo
<i>Pseudomonas</i> sp.Tem3	1,06x10 ⁸	1,40x10 ²	8,80x10 ²	0,00	6,3	0	0	Blanco
<i>Arthrobacter</i> sp. VC-15	4,25x10 ⁸	7,10x10 ²	4,80x10 ²	2,30x10 ³	0,0	2,6	8,8 ± 2,4	Blanco
<i>Bacillus</i> sp. GW185	2,63x10 ⁸	8,90x10 ²	7,60x10 ²	1,10x10 ⁴	0,0	11,5	8,2 ± 3,8	Blanco
<i>Escherichia coli</i> V517	-	-	-	-	-	-	4,0 ± 1,1	Amarillo claro
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	-	-	-	-	-	-	7,5 ± 0,0	Verde

La tabla muestra los recuentos celulares (UFCml⁻¹) antes (0 min, 0Jm⁻²) y después del tratamiento con 120 Jm⁻²s⁻¹ UVB (10 min), los recuentos después de una hora de incubación en oscuridad y los recuentos obtenidos después de una hora de incubación bajo luz azul (470 nm). La tasa de recuperación en oscuridad se obtuvo con el recuento después de una hora de oscuridad, sobre el recuento después de 120 Jm⁻²s⁻¹. La tasa de recuperación bajo luz azul se calculó corrigiendo el recuento después de una hora bajo luz azul (UFCml⁻¹ Luz azul), con el recuento en oscuridad (UFCml⁻¹ oscuridad), sobre el recuento después de 120 Jm⁻²s⁻¹. Por último, se muestra el % de reparación de CPD por nanogramo de proteína analizado por HPLC. Se utilizó *Escherichia coli* V517 y *Synechococcus leopoliensis* como cepas control de actividad fotoliasa. Diferencias estadísticamente significativas entre % de reparación, en p = 0,0001 (ANOVA y prueba de comparación múltiple de Dunnett).

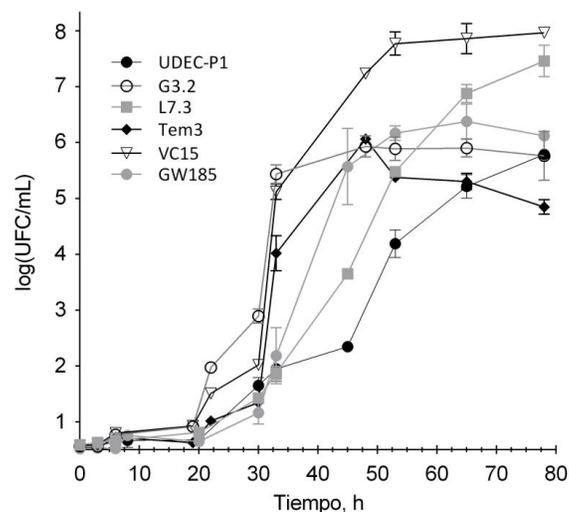


Figura 7. Curvas de crecimiento de bacterias radio-resistentes *PHRB+* a 10°C.

VI.IV.III Evaluación de actividad fotoliasa/fotorreactivación.

El análisis de la actividad enzimática se realizó sobre los extractos de proteínas totales. Se evaluó la actividad fotorreparadora mediante el incremento de 15mer reparado desde 15mer-CPD (% de reparación de CPD/ng). Posterior a 1 h de incubación bajo luz azul a 10°C *Deinococcus* sp. UDEC-P1 alcanzó un porcentaje de reparación de 15mer-CPD de $9,3 \pm 1,8$ %/ng, *Pseudomonas* sp. G3.2 un $6,6 \pm 3,6$ %/ng, *Bacillus* sp. GW185 $8,2 \pm 3,8$ %/ng y *Arthrobacter* sp. VC-15, un $8,8 \pm 2,4$ %/ng ($p < 0.05$), más que lo registrado con el control sin enzima. El control positivo, la cianobacteria *Synechococcus leopoliensis*, registró un porcentaje de reparación de 7,5 %/ng a 10°C, validando la metodología experimental. Así, los resultados indican que las bacterias ensayadas presentan actividad fotorreparadora a 10°C, la cual es significativamente mayor al control negativo (reacción sin enzima), a excepción de *Arthrobacter* sp. L7.3 y *Pseudomonas* sp. Tem3, quienes no registraron actividad reparadora de parte de sus extractos como se indica en la Tabla 6. El control radio-sensible (extracto de

Escherichia coli V517), registró actividad fotorreparadora la cual no fue significativa comparada con el control sin enzima.

VII. DISCUSION

La radiación del sol ha sido un factor constante en el transcurso de la evolución biológica y los organismos han desarrollado una serie de estrategias a nivel celular para proteger las biomoléculas fundamentales, como el ADN y las proteínas. La directa relación entre la disminución de la temperatura y el aumento de la resistencia a la radiación UV sugieren que los ambientes fríos como las zonas polares y los ambientes de altura son adecuados para la búsqueda de bacterias con mecanismos de resistencia a la radiación UV. En efecto, las características de los ambientes polares son similares en temperatura y radiación a las descritas en la superficie de Marte (Musilova et al. 2015), lo que constituye un sitio de investigación importante para los intereses de la astrobiología. La habitabilidad de la superficie marciana, con respecto a la vida terrestre, puede evaluarse comparándola con entornos terrestres similares y los organismos extremófilos que sobreviven en esas condiciones.

Durante este trabajo se evaluó la sobrevivencia frente a la radiación UV de tipo B, de bacterias psicotolerantes aisladas desde la Antártida y la Patagonia y se determinó además la presencia pigmentos protectores y enzimas de reparación del ADN como, fotoliasas y operones plasmidiales de respuesta SOS.

Las 76 bacterias fueron aisladas desde distintos ambientes fríos con temperaturas promedio de entre -20°C a -3°C en la Antártida durante el año (Doran et al. 2002), por ejemplo en la bahía de Terra Nova la temperatura media anual llegó a -13°C en 2018 (Informe ZAEP 2019). Las temperaturas de los lagos Nordenskjöld, Témpanos y Grey desde donde se aislaron gran

parte de las bacterias de la Patagonia, promedian anualmente entre 7 y 9°C, pero los veranos pueden ser más cálidos llegando a 18°C. La mayoría de las bacterias de este estudio demostraron ser capaces de crecer en el rango de temperaturas ensayadas de entre 5°C a 20°C (Tabla 1). El 80,4 % de las cepas se desarrollaron a 20°C en 24 h indicando características de tipo psicotolerante, ya que un porcentaje aún mayor (96,0 %) también pudo crecer a 10°C. Un 72,4 % de las cepas mostró crecimiento a 5°C en 7 días de incubación, lo que sugiere un activo metabolismo bacteriano a bajas temperaturas. Sólo 2 microorganismos fueron considerados como psicrófilos estrictos, pues no crecieron a temperaturas superiores a los 10°C y sólo se observó crecimiento bacteriano a 5°C. La mayoría de los aislados bacterianos de ambientes fríos pueden crecer en el laboratorio a temperaturas muy por encima de las que normalmente son aislados, principalmente por los medios de cultivo ricos en nutrientes (Cavicchioli, 2015). Así, un microorganismo con un fenotipo psicrófilo podría eventualmente desarrollarse a 30°C y considerarse como "mesotolerante". Esto reafirma la versatilidad de los microorganismos de ambientes fríos para aclimatarse en amplios rangos de temperaturas y tener un metabolismo activo, y a la vez el cuidado en su categorización (Achberger 2019).

Se ha descrito que existe una correlación positiva entre las bajas temperaturas y la resistencia a la desecación, con una mayor supervivencia frente a la radiación UV, es decir, los microorganismos adaptados a ambientes fríos capaces de tolerar períodos de anhidrobiosis tolerarían mayores dosis de radiación UV (Mattimore & Battista 1996). Los mecanismos celulares para la recuperación de la desecación confieren resistencia incidental a la radiación como una consecuencia de la selección natural para la supervivencia a la desecación (Mattimore & Battista 1996; Musilova et al. 2015). El ADN de los organismos resistentes, e

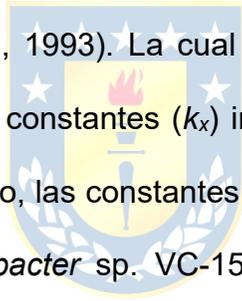
incluso sensibles a la radiación es igualmente susceptible al daño inducido por la radiación y la desecación (Krisko et al. 2013; Hassan & Gupta 2018). Se ha descrito que la reparación de las letales lesiones en el ADN generadas en desecación son determinantes para la supervivencia celular de las bacterias (Cox et al. 2010). Por lo tanto, la resistencia a la radiación es una consecuencia de la capacidad del organismo para tolerar esta y otras condiciones de estrés dañinas para el ADN (Chattopadhyay 2000). Esto se ha demostrado en *Halomonas* spp. (Musilova et al. 2015), en el género de cianobacterias *Chroococcidiopsis* (Billi et al. 2000) y en la bacteria radio-resistente *Deinococcus radiodurans* (La Duc et al. 2007; Ott et al. 2020; Panitz et al. 2019). En *Deinococcus radiodurans* la capacidad para reparar rápidamente las lesiones en el ADN por procesos de recombinación génica y replicación determinan la alta supervivencia a por ejemplo, una fuente de rayos gamma (^{137}Cs) (Slade et al. 2009). *D. radiodurans* puede reparar aproximadamente 200 roturas de doble hebra (DSB) por copia del genoma sin pérdida de viabilidad celular (Slade et al. 2011). Así, la bacteria puede sobrevivir e incluso crecer bajo dosis muy altas de RI como 5 kGy o 60 Gy/h (Lange et al. 1998; Devigne et al. 2019).

Las respuestas de los mecanismos de reparación del ADN frente a la radiación UV pueden ser diversas debido a que la formación de lesiones en el ADN puede ser baja y en otros casos puede ser alta a consecuencia de la acción de mecanismos de protección del proteoma y desintoxicación de ROS que previenen el daño en el ADN (Slade & Radman 2011). La prevención de la oxidación o el daño directo a las proteínas y al ADN es determinante para la supervivencia de las células, así en bacterias radio-sensibles el daño oxidativo a nivel proteico y lipídico puede acontecer antes que el daño en el ADN, desprotegiendo en el material genético y causando una muerte celular temprana (Slade & Radman 2011; Kumar et al. 2019).

Esta situación puede explicar los bajos tiempos de reducción decimal obtenidos (menores a 1,5 min), en el 72,5 % de las cepas en estudio (datos no mostrados), definiendo un fenotipo radio-sensible. Dentro del grupo definido como el grupo radio-resistente (27,6 %), con los valores-D mayores a 1,5 min ($>18 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$), se observó una diversidad de pigmentaciones en sus colonias. Se observaron colonias blancas sin pigmentación y pigmentadas rosadas, naranjas, amarillas, lilas, moradas y en algunos casos, con tonalidades café luego de 7 días de cultivo a 10°C. Estos pigmentos probablemente contribuyen a la resistencia frente a los rayos UVB. Un 33,3 % del grupo radio-resistente no presentó pigmentación en sus colonias, lo que sugiere que en estas bacterias existen otros mecanismos eficientes de protección que le confieren resistencia a la radiación UVB. Es común encontrar bacterias adaptadas a ambientes fríos pigmentadas y en una amplia gama de colores (Sajjad et al. 2020). El 66,7 % de la población podría estar utilizando sus pigmentos como mecanismos de foto-protección. Pero además, los pigmentos pueden ser consumidos como fuente de energía, participan en la fotosíntesis y confrontan al estrés oxidativo, temperaturas extremas y desecación (Martín-Cerezo et al. 2015). En el grupo de 21 bacterias radio-resistentes (valores-D $>1,5 \text{ min}$, $18 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ UVB), se encontró la presencia del gen de la fotoliasa (*PHRB*) en 6 cepas, pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Deinococcus* y *Pseudomonas* (Tabla 5). Todos estos productos (genes de la fotoliasa) deben ser secuenciados para conocer las homologías entre las fotoliasas de las bases de datos y descartar amplificaciones inespecíficas.

Para dimensionar la resistencia UV el modelado matemático de desinfección UV proporciona una base. La desinfección generalmente se modela en términos de supervivencia, o su inversa, la tasa de inactivación, y puede expresarse como una fracción o un porcentaje (Kowalski & Wladyslaw 2009). Para la mayoría de los microorganismos generalmente se

describe un decaimiento lineal con tasa de caída o descomposición de primer orden, lo que se logra a tasas de desinfección del 90 al 99 % (Chick et al. 1963). Pero, en las especies microbianas radio-resistentes se describen dos comportamientos en la población y una fracción de la población susceptible se encuentra en una primera etapa de descomposición o descomposición rápida descrita por una constante k_1 , y otra parte de la población es relativamente resistente, descrita en una segunda etapa de descomposición o descomposición lenta con una constante k_2 (Kowalski & Wladyslaw 2009). Dado que la fracción resistente es a menudo del 1 % o menos, la segunda etapa sólo se manifiesta en aproximadamente el valor D_{99} o más. La radio-resistencia de los microorganismos puede compararse estimando la dosis D_{37} , es decir, la dosis de radiación UV requerida lograr un 37 % de supervivencia (Arrage et al., 1993). La cual se encontrará en la primera etapa de descomposición. Valores altos de las constantes (k_x) implican una D_{37} baja y un decaimiento rápido o muerte rápida. Por el contrario, las constantes bajas describen una muerte más lenta. Por tanto, para las bacterias *Arthrobacter* sp. VC-15, *Arthrobacter* sp. L7.3 y *Bacillus* sp. GW185 que demostraron un decaimiento de dos fases (Figuras 6B), el cálculo de las D_{37} se obtuvo tomando en cuenta las constantes de velocidad k_1 , informadas en la Tabla 5. *Deinococcus* sp. UDEC-P1 mostró la menor k_1 del grupo ($0,070 \text{ m}^2\text{J}^{-1}$) y por lo tanto, la D_{37} más alta ($6,60 \text{ Jm}^{-2}$). Estos valores describen un decaimiento del recuento celular más lento en función del tiempo como se observa en la Figura 6, le siguió *Bacillus altitudinis* GW185 con valores similares a los encontrados en *Acinetobacter johnsonii* A2 ($4,25 \pm 0,37 \text{ Jm}^{-2}$), *Pseudomonas* sp. MF8 ($4,11 \pm 0,51 \text{ Jm}^{-2}$), *Cytophaga* sp. MF7 ($3,25 \pm 1,06 \text{ Jm}^{-2}$) y *Serratia marcescens* MF42 ($3,95 \pm 0,04 \text{ Jm}^{-2}$), bacterias radio-resistentes aisladas desde humedales andinos a 3.600 m de altura. Aquí, las cepas con menores D_{37} expusieron menores



sobrevidas, mientras que en la bacteria que más acumulación de CPD tuvo se registró la menor sobrevida, y la recuperación total de los recuentos se asocio a una disminución en los CPD (Fernández et al. 2006).

Al evaluar la sobrevida celular frente al UVB se utilizó una dosis de $120 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de UVB para todos los microorganismos, lo que corresponde a una dosis mayor que todas las D_{99} calculadas (Tabla 5), por lo tanto, los recuentos observados inmediatamente después del tratamiento UVB representan a la población sobreviviente o la fracción resistente, que corresponde a menos del 1 % de la población (Kowalski & Wladyslaw 2009). Estas bacterias podrían encontrarse dañadas a niveles estructurales y funcionales importantes, comprometiendo su viabilidad celular (Slade & Radman 2011; Cortesão et al. 2019). Por otro lado, se debe considerar que las células no se dividen inmediatamente después de un daño importante en su material genético (Slade et al. 2009). Existe una inhibición del crecimiento durante períodos prolongados de tiempo luego de una alta exposición a radiación UV, por ejemplo en *D. radiodurans* existe una inhibición del crecimiento de 10 horas, para luego recuperar su crecimiento exponencial. El retraso en el crecimiento está asociado a los procesos de degradación y exportación del ADN cromosómico y preparación de procesos de reparación del ADN por endonucleasas y recombinación génica (Makarova et al. 2001).

Teniendo en consideración lo anterior, *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Pseudomonas* sp. Tem3 mostraron las tasas de recuperación celular más altas en oscuridad, llegando a aumentar su recuento 6,1 y 6,3, respectivamente (Tabla 6). Es posible suponer que ambas bacterias en 1 h de oscuridad fueron capaces de reparar las lesiones generadas tras una irradiación de $120 \text{ Jm}^{-1}\text{s}^{-2}$ UVB, mediante mecanismos de reparación que pueden estar activos en oscuridad como la reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación recombinacional post

replicación (Goosen & Moolenaar 2008). Lo anterior se podría traducir en el aumento de células viables en ~6 veces respecto del recuento al final del tratamiento UV. Por el contrario, en una hora de oscuridad la bacteria *Pseudomonas* sp. G3.2 disminuyó aún más su recuento, ya que probablemente las lesiones en el ADN fueron muy importantes y no lograron ser reparadas (Kumar et al. 2019). Pero, si el blanco no fuese el ADN sino los lípidos y proteínas, aunque el daño en el ADN sea insignificante, no se podrán reparar las lesiones estructurales por los daños generados en las enzimas y estructuras fundamentales (Fernández et al. 2006). En la cepa G3.2 los mecanismos de prevención junto con los de reparación no fueron lo suficientes para asegurar la viabilidad celular.

Al evaluar la sobrevivencia celular tras la inducción de la actividad fotorreparadora por luz azul se encontró un aumento en el recuento celular en el control radio-resistente *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y en las cepas *Arthrobacter* sp. VC-15 y *Bacillus* sp. GW185 (Tabla 6). Posiblemente este aumento del recuento estaría asociado a la actividad fotorreparadora inducida durante 1 h de incubación bajo luz azul. *Arthrobacter* sp. VC-15 y *Bacillus* sp. GW185 mostraron las mayores tasas de recuperación bajo luz azul, aumentando su recuento en 2,6 y 11,5 veces más que en oscuridad, respectivamente.

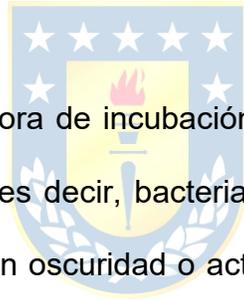
Estos resultados se pueden relacionar con los obtenidos por HPLC (Tabla 6), en donde se evaluó la actividad fotorreparadora de los extractos proteicos del grupo *PHRB+*. En *Arthrobacter* sp. VC-15 se observa una actividad de reparación de $8,8 \pm 2,4$ % CPD/ng y en *Bacillus* sp. GW185 se observa una actividad de $8,2 \pm 3,8$ % CPD/ng, resultados estadísticamente significativos al compararlos con el control sin enzima (Figura 8). Por lo tanto, la recuperación de los recuentos celulares bajo luz azul observados en *Arthrobacter* sp. VC-15 y *Bacillus* sp. GW185 se puede atribuir a la actividad fotorreparadora. Sólo una bacteria

PHRB+, *Pseudomonas* sp. Tem3, no mostró actividad fotorreparadora ni una recuperación del recuento celular asociado a la fotorreparación, en efecto, la viabilidad mostró mayores valores en oscuridad. Esto puede deberse a que la enzima no logró ser lo suficientemente activa a la temperatura ensayada y no logró reparar las lesiones en un contexto real, por lo que no se vio reflejado en las UFC, por otro lado, si no cuenta con los mecanismos de prevención adecuados, el daño en el ADN pudo ser considerable y por consecuencia concluyó en una muerte temprana (Slade & Radman 2011; Cortesão et al. 2019). La baja eficiencia enzimática también puede deberse a la selección de un fenotipo bacteriano radio-sensible con fotoliasas poco eficientes por una baja incidencia de rayos UV en el ambiente desde el cual fueron aisladas (Lucas-Lledó et al., 2009). Esto finalmente se relaciona con la pérdida del gen en diversidad de especies bacterianas (Goosen & Moolenaar 2008).

Pseudomonas sp. G3.2 no logró recuperar su recuento celular en oscuridad ni tampoco bajo luz azul (470 nm), no obstante, en su extracto proteico sí se detectó actividad fotorreparadora ($6,6 \pm 3,6$ % reparación CPD/ng). Probablemente la actividad de la enzima no es lo suficiente para generar un efecto positivo en la recuperación de la viabilidad celular, pero sí muestra actividad al aislar las proteínas totales y evitar el daño celular en general. Esto, también podría explicar el caso del control radio-sensible *E. coli* V517, donde el extracto proteico muestra una actividad fotorreparadora de $4,0 \pm 1,1$ % reparación CPD/ng a 10°C, lo cual no significa un fenotipo radio-resistente para la *Enterobacterias*. De hecho, en células de *E. coli* K-12 se han contabilizado de 16-17 moléculas de fotoliasa que reparan al menos 400 CPD luego de 10 Jm^{-2} , lo que si bien le alcanza para recuperar la viabilidad celular a la dosis evaluada, dosis un poco mayores provocan una rápida muerte bacteriana (Kavaklı and Sancar 2004). En consecuencia, un porcentaje de reparación de alrededor del 6 %/ng de CPD encontrado en

este trabajo de investigación, no sería suficiente en un contexto ambiental real ni mucho menos en un contexto de simulaciones de superficie extra-terrestres con irradiaciones mucho mayores.

Por otra parte, para descartar que el tiempo de incubación utilizado (1 h) fuese un factor que explique los recuentos bacterianos, se contrastaron las cinéticas de crecimiento a 10°C para cada bacteria *PHRB+* (Figura 7). Estas indicaron que luego de una hora de incubación a 10°C las bacterias no alcanzan a duplicar su población. Por lo tanto, considerando estos antecedentes es posible proponer que el aumento en los recuentos celulares posteriores a la exposición UVB no estarían asociados a la duplicación celular, sino que a la recuperación de la viabilidad de las células individuales a causa de la reparación de sus estructuras fundamentales.



Los recuentos observados tras una hora de incubación en oscuridad o en luz azul reflejan el número de la población recuperada, es decir, bacterias dañadas que volvieron a ser viables tras procesos de reparación activos en oscuridad o activados por luz azul (Cockell 1998; Cox et al. 2010; Devigne et al. 2019; Kumar et al. 2019). Esto se traduce en un aumento en la sobrevivencia celular que, en términos radiobiológicos se entiende como la capacidad de reproducción indefinida (Baumstark-Khan & Facius 2001). Las UFC se han utilizado durante mucho tiempo para establecer recuentos de microorganismos unicelulares como bacterias, levaduras y algas así, la pérdida de las UFC a menudo se considera como muerte celular y un aumento en las UFC como una recuperación de la reproducción (Barendsen 1992).

De esta manera, se puede sugerir que las bacterias psicrotolerantes tienen un mecanismo foto-inducible de reparación que en una hora permite la reparación del ADN. Este mecanismo

está catalogado como ultrarápido, ya que dentro de un segundo (nanosegundos), se produce el proceso de fotorreparación (Zhong 2007; Zhang et al. 2017; Liu et al. 2011).

Ahora bien, la reparación de CPD también puede realizarse a través del sistema NER, mediante el complejo proteico UvrABC (Dillon & Castenholz 1999). Sistema altamente conservado que involucra una serie de pasos: detección de daños, verificación de daños, incisión, escisión y ligadura de ADN, mientras que la reversión mediada por fotoliasas sólo involucra a una enzima en un proceso un sólo paso (Kisker et al. 2013). Por lo tanto, se podría sugerir ambos mecanismos están actuando para reparar las lesiones CPD dentro de la hora de incubación bajo luz azul, pero que el que actúa primero y por lo tanto, es más eficiente en la recuperación de la viabilidad, es el mecanismo de fotorreparación (Schul 2002; Marizcurrena et al. 2017).



Las actividades observadas pueden estar viéndose afectadas negativamente por una disminución de la temperatura, ya que el efecto en la disminución de la funcionalidad enzimática por la disminución de la temperatura, se ha demostrado para diversidad de enzimas y también para la fotoliasa de *Synechococcus leopoliensis*, la cual a 37°C muestra una actividad de $1,18 \pm 0,03 \text{ nMs}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ CPD-fotoliasa y a 25°C disminuye a $0,63 \pm 0,03 \text{ nMs}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ CPD-fotoliasa (Vallejos-Almirall et al. 2020). Esto no se ha relacionado a una disminución de la expresión del gen asociado a la disminución temperatura sino a una disminución en la función enzimática. Por lo tanto, es necesario realizar experimentaciones a temperaturas mayores y menores para comparar las distintas actividades. Por otro lado, sólo se ha demostrado la inducción de la expresión de fotoliasas en organismos con foto-periodos como cianobacterias y algas, donde la incubación con luz blanca aumenta la expresión de la enzima. En la alga *Dunaliella salina* los niveles de transcripción del gen *PHRB* tras 24 h de crecimiento

en oscuridad aumentaron rápidamente después de 1 h de exposición a luz blanca y alcanzando un máximo después de 4 h (Cheng et al. 2007).

En *Deinococcus aquaticus* UDEC-P1 se detectó la presencia del gen *PRHB* de fotoliasas, no obstante, para el género *Deinococcus* no se han descrito genes de fotoliasas ni procesos de fotorreparación (Moseley et al. 1983). La obtención del amplicón del gen que codifica para la fotoliasa también podría ser explicada debido a amplificación inespecífica al utilizar partidores degenerados. Estos pudieron encontrar homología en el genoma de *D. aquaticus* UDEC-P1 y para confirmarlo se debe secuenciar el producto PCR obtenido. Por otro lado, también se observó actividad fotorreparadora en el extracto proteico, lo cual podría explicarse por una fotoliasa no descrita en el género o un nuevo mecanismo de fotorreparación o de foto-inducción de otros mecanismos de reparación o protección a por ejemplo, el estrés oxidativo, como se ha visto en *Vibrio cholerae* que mediante las proteínas ChrR, MerR y luz azul captada por proteínas CRY logran una respuesta contra el estrés foto-oxidativo (Tardu et al. 2017).

Las distintos resultados observadas en las sobrevividas celulares y las actividades de los extractos es de esperar por la diversidad de especies en estudio y por lo tanto, los distintos repertorios enzimáticos y no enzimáticos para defenderse y contrarrestar los daños causados por una exposición a radiación UV. La eficiencia de cada uno, la duplicidad de genes e incluso el contexto celular influyen en las distintas respuestas celulares y el amplio abanico de resistencia frente al UV que existe en el ambiente (Cockell 1998; Kowalski & Wladyslaw 2009). El género *Pseudomonas* demostró ser el menos resistente del grupo y las bacterias pertenecientes a los géneros de *Bacillus* y *Deinococcus* correspondieron a las más resistentes del grupo.

La sobrevivencia bacteriana y actividades fotorreparadoras del grupo *PHRB+* se obtuvieron a una temperatura de 10°C, lo que indica que los mecanismos de radio-resistencia son funcionales a esa temperatura y contribuirían en la resistencia en un contexto ambiental real de exposición UVB a bajas temperaturas. Por ejemplo, la fotoliasa aislada desde la bacteria antártica psicrófila *Colwellia psychrerythraea* 34H ha demostrado actividad fotorreparadora a 0°C (Munshi et al. 2017). Su funcionalidad a bajas temperaturas se explica por el sitio de unión altamente flexible, con más bucles y residuos más pequeños (Glicina, Serina, Alanina), lo que permite que la proteína funcione y transporte los electrones incluso a temperaturas cercanas a los cero grados Celsius. La mayoría de los estudios sobre reacciones de transferencia de electrones foto-inducidas se han centrado en proteínas de organismos mesófilos, para las cuales se ha descrito una relación directa entre la disminución de la actividad enzimática con la disminución de la temperatura (More et al. 1995). Sin embargo, el estudio de los extremófilos de tipo psicrófilo plantea preguntas interesantes sobre lo que ha proporcionado la evolución para optimizar las reacciones químicas sensibles a la temperatura sobre todo si puede extrapolarse a un contexto similar a la superficie de Marte u otros cuerpos planetarios fríos (Baumstark-Khan & Facius 2001; Merino et al. 2019). Por lo tanto, si bien anteriormente se ha demostrado la disminución de la actividad de las fotoliasas por la disminución de la temperatura, estos nuevos antecedentes de nuevas enzimas aisladas desde ambientes fríos, sugiere que podrían encontrarse enzimas con altas capacidades reparatoras a bajas temperaturas.

Esto es interesante desde el punto de vista astrobiológico, ya que plantea la posibilidad de que formas de vida radio-resistentes de tipo extremófilo terrestres puedan explicar el comportamiento de formas de vida de Marte u otros mundos con condiciones extremas

(Baumstark-Khan & Facius 2001). Las condiciones ambientales actuales en la superficie de Marte presentarían un severo desafío para la vida, pero el estudio de microbios extremófilos que sobreviven en hábitats terrestres análogos a Marte sugiere que ciertos lugares marcianos pueden permanecer habitables (Horneck 2000).

El entorno de radiación UV de Marte no es un factor limitante de la vida por sí sólo, los ataques agregados, y potencialmente sinérgicos, de la baja temperatura, la desecación y otros factores pueden explicar la aparente falta de una biota marciana en la superficie (Cockell 1998). Aunque, la mayoría de las bacterias no resiste o no resistiría las extremas condiciones de la superficie del planeta Marte, sí podrían encontrarse formas de vida en estado de espora o dormancia metabólica o incluso con un metabolismo activo, bajo una superficie de polvo, rocas o irregularidades en la superficie (Cortês et al. 2019). Esto es relevante si consideramos que los microorganismos radio-resistentes se estudian por la posibilidad de transferencia interplanetaria de microorganismos viables (Horneck et al. 2000; Baumstark-Khan & Facius 2001). Los organismos transferidos podrían haber estado protegidos de las duras condiciones del espacio al estar incrustados unos centímetros debajo de la superficie, mejorando así la capacidad de supervivencia (Gomez-Silvo 2018).

Los microorganismos resistentes a la radiación pueden sobrevivir a dosis de radiación UV mucho mayores en el laboratorio que a las que están expuestas en el medio ambiente natural e incluso resisten a aquellas radiaciones que no alcanzan la superficie de la Tierra. Por ejemplo, *D. radiodurans* sobrevive a exposiciones agudas (10 kGy) de RI y radiación UV (UV 254 nm, 1 kJm⁻²) (Daly et al. 2004) e incluso, puede crecer sin disminuir su tasa de crecimiento bajo exposición crónica de RI (60 Gy/h) (Lange et al. 1998). Las células cultivadas en medio mínimo e irradiadas crónicamente con 60 Gy/h pierden rápidamente la viabilidad

junto con una degradación severa del ADN, lo cual es revertido al proporcionar altas concentraciones de aminoácidos (Venkateswaran et al. 2000). Por lo tanto, la reparación es crucial para la posible persistencia de vida microbiana marciana latente que acumula daño por radiación a lo largo del tiempo (Cockell 1998) y la disponibilidad de nutrientes debe ser un factor a considerar para aquello.

Diversos microorganismos han sido expuestos a altos niveles de RI y UV con el objetivo de simular condiciones encontradas en la superficie marciana. Esporas del género *Bacillus* (105,6 kJm⁻², UVC+UVB), en el género *Deinococcus*, en el género *Pseudomonas*, la bacteria halófila *Halococcus dombrowskii* y en cianobacterias. Por ejemplo, *D. radiodurans* sobrevive a 1 año de exposición a condiciones de baja atmósfera terrestre, es decir, una fluencia UV total de 3,1x10³ kJm⁻² (200-315 nm), radiación cósmica total de 250-298 mGy, fluctuaciones de temperatura entre -21,0±5°C y 23,9±5°C, presión entre 10⁻⁷ Pa y 10⁻⁴ Pa y 0 % de humedad (Ott et al. 2020). También, *Deinococcus geothermalis* permaneció viable durante más de 2 años en el espacio exterior en desecación, vacío, bajo una atmósfera artificial de Marte (95,55 % CO₂, 2,70 % N₂, 1,60% Ar y 0,15 % O₂, 370 ppm H₂O; presión 980 Pa) y una exposición UV 200-400 nm extraterrestre de 505 kJm⁻² (Panitz et al. 2019).

Durante este trabajo se evaluó la sobrevivencia de bacterias psicrotolerantes aisladas desde la Antártida y la Patagonia frente a la radiación UV de tipo B, e independiente del entorno de aislamiento, las bacterias muestran diferentes grados de resistencia, definidos probablemente por la acción conjunta de diversas estrategias de protección como, pigmentos, enzimas antioxidantes y mecanismos de reparación. En las bacterias en estudio no se detectaron genes de respuesta SOS plasmidiales, pero sí se encontró en un 7,9 % del total del grupo de estudio el gen *PHRB* de la CPD-fotoliasas de clase I. Por lo tanto, esta enzima no fue un

mecanismo predominante o altamente distribuido entre las bacterias psicrotolerantes aisladas. Además, en sólo 1 especie *Arthrobacter* sp. VC15 se pudo relacionar la actividad de fotorreparación de CPD a 10°C, con una mayor sobrevida. En *Bacillus altitudinis* GW185 es necesario secuenciar los productos PCR obtenidos para asegurar la presencia de una fotoliasa y relacionarlo con la alta capacidad fotorreparadora del extracto proteico. En la bacteria *Deinococcus aquaticus* UDEC-P1 además, es necesario realizar experimentaciones respecto del efecto de la luz en el proteoma celular y relacionarlo con mecanismos de resistencia a la radiación.

Las bacterias adaptadas a ambientes fríos exponen distintos grados de resistencia a la radiación UVB y las fotoliasas, aunque presentes en baja proporción de la población estudiada, contribuyen de manera significativa en la sobrevivencia celular en las bacterias que la contienen. Aunque, este estudio se basa en un número limitado genes, la identificación de los genes de fotoliasas puede resultar útil en estudios futuros, en la caracterización de la biodiversidad del lugar, en el ámbito biotecnológico (Schleicher et al. 2005), cambio climático y astrobiológico, en su relación con los límites de la vida (de Vera et al. 2019; Munshi et al. 2017).



VIII. CONCLUSIONES

Existe un mecanismo de reparación de CPD activo a 10°C en bacterias Antárticas y que puede recuperar la viabilidad celular significativamente en la bacteria *Arthrobacter* sp. VC15

El mecanismo de fotorreactivación no estaría ampliamente distribuido en las bacterias psicrotolerantes, pero para aquellas bacterias que lo poseen contribuiría en la recuperación de la sobrevivencia en un ambiente con exposición a radiación UVB.



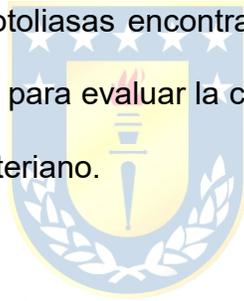
IX. PROYECCIONES

La caracterización de los mecanismos de reparación así como la cuantificación de CPD, 6-4 PP o cualquier daño en el ADN en cada bacteria debe ser determinado para evaluar la contribución tanto, de las fotoliasas en particular, como la de otros mecanismos de reparación del ADN.

La CPD-fotoliasa encontrada en *Arthrobacter* sp. VC-15 deben ser evaluadas en cuanto a su capacidad fotorreparadora a diferentes temperaturas con propósitos biotecnológicos.

La actividad fotorreparadora de las fotoliasas encontradas debe ser probada a temperaturas por debajo de los cero grados Celsius para evaluar la capacidad de transferencia electrónica a bajas temperaturas en un modelo bacteriano.

Las bacterias radio-resistentes encontradas deben exponerse a tasas de radiación más prolongadas y otras condiciones de la superficie de Marte para poder tener un modelo microbiano de interés astrobiológico resistente a la radiación.



X. GLOSARIO

6-4 PP: fotoproductos de (6-4) pirimidina pirimidona

8-HDF: 8-hydroxy-5-deazaflavin

15mer: sustrato reparado

15mer-CPD: sustrato mutado

ADN : ácido desoxirribonucleico

ARN : ácido ribonucleico

BIOMEX: BIOlogy and Mars EXperimen

CES : secuenciación de electroforesis capilar

CPD : dímero de pirimidina de ciclobutano

CRY : criptocromo (proteína)

D₃₇ : dosis letal 37, inactivación del 63 %

D₉₉ : dosis letal 99, inactivación del 99 %

DO : densidad óptica

DSB : roturas de doble hebra

dT₍₁₅₎ : estándar interno, 5'-TTT...TTT-3'

DTT : ditioneitol

EDTA : ácido etilendiaminotetraacético

FAD : dinucleótido de flavina-adenina

FDA : Administración de medicamentos y alientos

FMN : flavin mononucleótido

H₂O₂ : peróxido de hidrógeno

HPLC : cromatografía líquida de alta eficiencia

HPLC-MS/MS: cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectroscopia de masas

ISS : Estación Espacial Internacional

k : constante de descomposición de un estado

*k*₁ : constante de descomposición rápida

*k*₂ : constante de descomposición lenta

hν : fotón

MSC : Cámara de Simulación de Marte



MTHF : ácido 5,10-metiltetrahidrofólico

NaCl : cloruro de sodio

$^1\text{O}_2$: oxígeno singlete

O_2^- : anión superóxido

OH : radical eshidroxilo

PAR : radiación fotosintética activa

PBS : tampón fosfato salino

PCR : reacción en cadena de la polimerasa

PHRB : fotoliasa (gen)

PL : fotoliasa (proteína)

PM : peso molecular

RI : radiación ionizante

ROO : radicales peroxilo

ROS : especies reactivas de oxígeno

SSB : proteínas ligantes de ADN de cadena sencilla

TrisHCl: tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro

UFC : unidad formadora de colonias

UV : ultravioleta

valor-D: tiempo de reducción decimal



Unidades de Medida

kDa : kilodaltons

μM : micromolar

mM : milimolar

nM : nanomolar

Gy : Gray, dosis de un julio por kilogramo

my : millones de años

ppm : partes por millón

nm : nanometros

Pa : pascal

f

ps : femtosegundos

ns : nanosegundos

Wm^{-2} : irradiancia

$\text{J}^{-2}\text{s}^{-1}$: joules por segundo



X. REFERENCIAS

1. Achberger A, Michaud A, Vick-Majors T, Christner B, Skidmore M, Priscu J, Tranter M (2017) Microbiology of subglacial environments. In: Margesin R (ed) Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 83–110.
2. Arrage, A. A., Phelps, T. J., Benoit, R. E., & White, D. C. (1993). Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3545–3550. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3545-3550.1993>
3. Aun M., Lakkala K., Sanchez R., Asmi E., Nollas F., Meinander O., Sogacheva L., De Bock L., Arola A., de Leeuw G., Aaltonen V., Bolsee D., Cizkova K., Mangold F., Metelka L., Jakobson E., Svendby T., Gillotay D & Van Opstal B. (2019). UV radiation measurements in Marambio, Antarctica during years 2017–2019 in a wider temporal and spatial. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*. (1-21) <https://doi.org/10.5194/acp-2019-896>
4. Banaś, A. K., Zgłobicki, P., Kowalska, E., Bażant, A., Dżiga, D., & Strzałka, W. (2020). All You Need Is Light. Photorepair of UV-Induced Pyrimidine Dimers. *Genes*, 11(11), 1304. <https://doi.org/10.3390/genes11111304>
5. Barendsen G. W. (1992). Radiation-induced DNA damage in relation to linear and quadratic terms of dose-effect relationships for cell reproductive death. *BJR supplement*, 24, 53–56.
6. Battista, J. R., Earl, A. M., & Park, M. J. (1999). Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation?. *Trends in microbiology*, 7(9), 362–365. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01566-8](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01566-8)
7. Baumstark-Khan C., Facius R. (2002) Life under Conditions of Ionizing Radiation. In: Horneck G., Baumstark-Khan C. (eds) *Astrobiology*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 261-284
8. Benjdia A. (2012). DNA photolyases and SP lyase: structure and mechanism of light-dependent and independent DNA lyases. *Current opinion in structural biology*, 22(6), 711–720. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.10.002>

9. Besaratinia, A., Yoon, J. I., Schroeder, C., Bradforth, S. E., Cockburn, M., & Pfeifer, G. P. (2011). Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(9), 3079–3091. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187336>
10. Billi, D., Friedmann, E. I., Hofer, K. G., Caiola, M. G., & Ocampo-Friedmann, R. (2000). Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1489–1492. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1489-1492.2000>
11. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
12. Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C., & Cowan, D. A. (2010). Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends in microbiology*, 18(8), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.05.002>
13. Cavicchioli R. (2016). On the concept of a psychrophile. *The ISME journal*, 10(4), 793–795. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.160>
14. Chandrasekhar, D., & Van Houten, B. (2000). In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and nucleotide level in *Escherichia coli*. *Mutation research*, 450(1-2), 19–40. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00014-2)
15. Chattopadhyay, MK. (2000). Radiation resistance in bacteria. *Current science*. 79. 1523-1523.
16. Cheng, L., Qiao, D. R., Lu, X. Y., Xiong, Y., Bai, L. H., Xu, H., Yang, Y., & Cao, Y. (2007). Identification and expression of the gene product encoding a CPD photolyase from *Dunaliella salina*. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 87(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.01.002>
17. Chick E.W., Hudnell A.B., Sharp D.G. (1963). Ultraviolet sensitivity of fungi associated with mycotic keratitis and other mycoses. *Sabouviad* 2(4):195–200. <https://doi.org/10.1080/00362176385190331>

18. Cockell C. S. (1998). Biological effects of high ultraviolet radiation on early earth--a theoretical evaluation. *Journal of theoretical biology*, 193(4), 717–729. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0738>
19. Cockell, C.S. (2000). The ultraviolet history of the terrestrial planets - implications for biological evolution. *Planetary and space science*, 48(2-3), 203-214.
20. Cortesão, M., Fuchs, F. M., Commichau, F. M., Eichenberger, P., Schuerger, A. C., Nicholson, W. L., Setlow, P., & Moeller, R. (2019). *Bacillus subtilis* Spore Resistance to Simulated Mars Surface Conditions. *Frontiers in microbiology*, 10, 333. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00333>
21. Cox, M. M., Keck, J. L., & Battista, J. R. (2010). Rising from the Ashes: DNA Repair in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS genetics*, 6(1), e1000815. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000815>
22. Daly, M. J., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Venkateswaran, A., Hess, M., Omelchenko, M. V., Kostandarithes, H. M., Makarova, K. S., Wackett, L. P., Fredrickson, J. K., & Ghosal, D. (2004). Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), 1025–1028. <https://doi.org/10.1126/science.1103185>
23. Dany, A. L., Douki, T., Triantaphylides, C., & Cadet, J. (2001). Repair of the main UV-induced thymine dimeric lesions within *Arabidopsis thaliana* DNA: evidence for the major involvement of photoreactivation pathways. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 65(2-3), 127–135. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00254-8](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00254-8)
24. Dartnell, L. R., Hunter, S. J., Lovell, K. V., Coates, A. J., & Ward, J. M. (2010). Low-temperature ionizing radiation resistance of *Deinococcus radiodurans* and Antarctic Dry Valley bacteria. *Astrobiology*, 10(7), 717–732. <https://doi.org/10.1089/ast.2009.0439>
25. Dartnell, L., & Patel, M. (2014). Degradation of microbial fluorescence biosignatures by solar ultraviolet radiation on Mars. *International Journal of Astrobiology*, 13(2), 112-123. <https://doi:10.1017/S1473550413000335>

26. De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., & Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO reports*, 15(5), 508–517. <https://doi.org/10.1002/embr.201338170>
27. de Vera, J. P., Alawi, M., Backhaus, T., Baqué, M., Billi, D., Böttger, U., Berger, T., Bohmeier, M., Cockell, C., Demets, R., de la Torre Noetzel, R., Edwards, H., Elsaesser, A., Fagliarone, C., Fiedler, A., Foing, B., Foucher, F., Fritz, J., Hanke, F., Herzog, T., ... Zucconi, L. (2019). Limits of Life and the Habitability of Mars: The ESA Space Experiment BIOMEX on the ISS. *Astrobiology*, 19(2), 145–157. <https://doi.org/10.1089/ast.2018.1897>
28. Devigne, A., Meyer, L., de la Tour, C. B., Eugénie, N., Sommer, S., & Servant, P. (2019). The absence of the RecN protein suppresses the cellular defects of *Deinococcus radiodurans* irradiated cells devoid of the PprA protein by limiting recombinational repair of DNA lesions. *DNA repair*, 73, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.011>
29. Doran, P. T., Priscu, J. C., Lyons, W. B., Walsh, J. E., Fountain, A. G., McKnight, D. M., Moorhead, D. L., Virginia, R. A., Wall, D. H., Clow, G. D., Fritsen, C. H., McKay, C. P., & Parsons, A. N. (2002). Antarctic climate cooling and terrestrial ecosystem response. *Nature*, 415(6871), 517–520. <https://doi.org/10.1038/nature710>
30. Dziejewit, L., & Bartosik, D. (2014). Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments. *Frontiers in microbiology*, 5, 596. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00596>
31. Eisen, J. A., & Hanawalt, P. C. (1999). A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutation research*, 435(3), 171–213. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(99\)00050-6](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(99)00050-6)
32. Essen, L. O., & Klar, T. (2006). Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(11), 1266–1277. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5447-y>
33. Ewert, M., & Deming, J. W. (2014). Bacterial responses to fluctuations and extremes in temperature and brine salinity at the surface of Arctic winter sea ice. *FEMS microbiology ecology*, 89(2), 476–489. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12363>

34. Fendrihan, S., Bérces, A., Lammer, H., Musso, M., Rontó, G., Polacsek, T. K., Holzinger, A., Kolb, C., & Stan-Lotter, H. (2009). Investigating the effects of simulated martian ultraviolet radiation on *Halococcus dombrowskii* and other extremely halophilic archaeobacteria. *Astrobiology*, 9(1), 104–112. <https://doi.org/10.1089/ast.2007.0234>
35. Fernández Zenoff, V., Siñeriz, F., & Farías, M. E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7857–7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
36. Food and Drug Administration U.S. "Inspection Guides - Sterilizing Symbols (D, Z, F)". www.fda.gov. Retrieved 2018-09-28.
37. Gargaud, M., Amils, R., and Cleaves, H. J. (2011). *Encyclopedia of Astrobiology*. Berlin: Springer.
38. Goosen, N., & Moolenaar, G. F. (2008). Repair of UV damage in bacteria. *DNA repair*, 7(3), 353–379. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.002>
39. Gómez-Silva B. (2018). Lithobiontic life: "Atacama rocks are well and alive". *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1333–1343. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1033-9>
40. Harsojo, Kitayama, S., & Matsuyama, A. (1981). Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *Journal of biochemistry*, 90(3), 877–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133544>
41. Hassan, F., & Gupta, R. S. (2018). Novel Sequence Features of DNA Repair Genes/Proteins from *Deinococcus* Species Implicated in Protection from Oxidatively Generated Damage. *Genes*, 9(3), 149. <https://doi.org/10.3390/genes9030149>
42. Horneck, G. (2000) The microbial world and the case for Mars. *Planet Space Sci* 48:1053–1063.
43. Horneck, G., Rettberg, P., Reitz, G., Wehner, J., Eschweiler, U., Strauch, K., Panitz, C., Starke, V., & Baumstark-Khan, C. (2001). Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on Panspermia. *Origins of life and evolution of the biosphere : the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*, 31(6), 527–547. <https://doi.org/10.1023/a:1012746130771>

44. INFORME ZAEP, Plan de Gestión para la Zona Antártica Especialmente Protegida (ZAEP) n.º 173 Cabo Washington y Bahía Silverfish, Bahía Terra Nova, Mar de Ross. (2019) Medida 9. Informe final de la XLII RCTA.
45. Jones, D. L., & Baxter, B. K. (2017). DNA Repair and Photoprotection: Mechanisms of Overcoming Environmental Ultraviolet Radiation Exposure in Halophilic Archaea. *Frontiers in microbiology*, 8, 1882. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01882>
46. Kasting, J. F., and Donahue, T. M. (1980), The evolution of atmospheric ozone, *J. Geophys. Res.*, 85(C6), 3255– 3263. <https://doi.org/10.1029/JC085iC06p03255>
47. Kavakli, I. H., & Sancar, A. (2004). Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry*, 43(48), 15103–15110. <https://doi.org/10.1021/bi0478796>
48. Kim, J. J., & Sundin, G. W. (2000). Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability in vitro and in planta. *Journal of bacteriology*, 182(21), 6137–6144. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.6137-6144.2000>
49. Koch, W. H., Henrikson, E., Eisenstadt, E., & Cebula, T. A. (1995). *Salmonella typhimurium* LT7 and LT2 strains carrying the *imp* operon on *colla*. *Journal of bacteriology*, 177(7), 1903–1905. <https://doi.org/10.1128/jb.177.7.1903-1905.1995>
50. Komori, H., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Shibata, T., Inoue, Y., & Miki, K. (2001). Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13560–13565. <https://doi.org/10.1073/pnas.241371398>
51. Kowalski W. (2009). Introduction. *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for Air and Surface Disinfection*, 1–16. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-01999-9>
52. Krisko, A., & Radman, M. (2013). Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(7), a012765. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012765>
53. Kumar, R., Acharya, V., Mukhia, S., Singh, D., & Kumar, S. (2019). Complete genome sequence of *Pseudomonas frederiksbergensis* ERDD5:01 revealed genetic bases for

- survivability at high altitude ecosystem and bioprospection potential. *Genomics*, 111(3), 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.03.008>
54. Kumar, J., Ghosh, P., & Kumar, A. (2021). Ultraviolet-B Radiation Stress-Induced Toxicity and Alterations in Proteome of *Deinococcus radiodurans*. *Microbial physiology*, 31(1), 1–15. <https://doi.org/10.1159/000512018>
55. La Duc, M. T., Benardini, J. N., Kempf, M. J., Newcombe, D. A., Lubarsky, M., & Venkateswaran, K. (2007). Microbial diversity of Indian Ocean hydrothermal vent plumes: microbes tolerant of desiccation, peroxide exposure, and ultraviolet and gamma-irradiation. *Astrobiology*, 7(2), 416–431. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.0060>
56. Lange, C. C., Wackett, L. P., Minton, K. W., & Daly, M. J. (1998). Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. *Nature biotechnology*, 16(10), 929–933. <https://doi.org/10.1038/nbt1098-929>
57. Lemee, L., Peuchant, E., Clerc, M., Brunner, M., & Pfander, H. (1997). Deinoxanthin: A new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*. Volume 53, Issue 3. Pages 919-926.
58. Leuko, S., Bohmeier, M., Hanke, F., Böettger, U., Rabbow, E., Parpart, A., Rettberg, P., & de Vera, J. P. (2017). On the Stability of Deinoxanthin Exposed to Mars Conditions during a Long-Term Space Mission and Implications for Biomarker Detection on Other Planets. *Frontiers in microbiology*, 8, 1680. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01680>
59. Lindahl S. G. (2008). Oxygen and life on earth: an anesthesiologist's views on oxygen evolution, discovery, sensing, and utilization. *Anesthesiology*, 109(1), 7–13. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31817b5a7e>
60. Little J. W. (1993). LexA cleavage and other self-processing reactions. *Journal of bacteriology*, 175(16), 4943–4950. <https://doi.org/10.1128/jb.175.16.4943-4950.1993>
61. Liu, Z., Tan, C., Guo, X., Kao, Y. T., Li, J., Wang, L., Sancar, A., & Zhong, D. (2011). Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(36), 14831–14836. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110927108>

62. Lodwick, D., Owen, D., & Strike, P. (1990). DNA sequence analysis of the imp UV protection and mutation operon of the plasmid TP110: identification of a third gene. *Nucleic acids research*, 18(17), 5045–5050. <https://doi.org/10.1093/nar/18.17.5045>
63. Losi, A., & Gärtner, W. (2012). The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annual review of plant biology*, 63, 49–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105538>
64. Lucas-Lledó, J. I., & Lynch, M. (2009). Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family. *Molecular biology and evolution*, 26(5), 1143–1153. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp029>
65. 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 : MMBR*, 65(1), 44–79. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.44-79.2001>
66. Marizcurrena, J. J., Morel, M. A., Braña, V., Morales, D., Martínez-López, W., & Castro-Sowinski, S. (2017). Searching for novel photolyases in UVC-resistant Antarctic bacteria. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 21(2), 409–418. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0914-y>
67. Martín-Cerezo, M. L., García-López, E., & Cid, C. (2015). Isolation and Identification of a Red Pigment from the Antarctic Bacterium *Shewanella frigidimarina*. *Protein and peptide letters*, 22(12), 1076–1082. <https://doi.org/10.2174/0929866522666150915122247>
68. Martínez, G., Valero F., Vásquez L. (2009). Characterization of the Martian Surface Layer. *Journal of the Atmospheric Sciences* 66(1).
69. Mattimore, V., & Battista, J. R. (1996). Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of bacteriology*, 178(3), 633–637. <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.633-637.1996>
70. Mei Kwei, J. S., Kuraoka, I., Horibata, K., Ubukata, M., Kobatake, E., Iwai, S., Handa, H., & Tanaka, K. (2004). Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine

- dimer and 6-4 photoproduct. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(4), 1133–1138. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.066>
71. Mei, Q., & Dvornyk, V. (2015). Evolutionary History of the Photolyase/Cryptochrome Superfamily in Eukaryotes. *PloS one*, 10(9), e0135940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135940>
 72. Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in microbiology*, 10, 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
 73. Methé, B. A., Nelson, K. E., Deming, J. W., Momen, B., Melamud, E., Zhang, X., Moulton, J., Madupu, R., Nelson, W. C., Dodson, R. J., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Durkin, A. S., DeBoy, R. T., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., Zhou, L., Davidsen, T. M., Wu, M., Huston, A. L., ... Fraser, C. M. (2005). The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10913–10918. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504766102>
 74. Moeller, R., Horneck, G., Facius, R., & Stackebrandt, E. (2005). Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. *FEMS microbiology ecology*, 51(2), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.008>
 75. Monk, J. M., Koza, A., Campodonico, M. A., Machado, D., Seoane, J. M., Palsson, B. O., Herrgård, M. J., & Feist, A. M. (2016). Multi-omics Quantification of Species Variation of *Escherichia coli* Links Molecular Features with Strain Phenotypes. *Cell systems*, 3(3), 238–251.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.08.013>
 76. More, N., Daniel, R. M., & Petach, H. H. (1995). The effect of low temperatures on enzyme activity. *The Biochemical journal*, 305 (Pt 1)(Pt 1), 17–20. <https://doi.org/10.1042/bj3050017>
 77. Mu, W., Zhang, D., Xu, L., Luo, Z., & Wang, Y. (2005). Activity assay of His-tagged *E. coli* DNA photolyase by RP-HPLC and SE-HPLC. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 63(2), 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.03.005>

78. Munshi, S., Rajamoorthi, A., & Stanley, R. J. (2017). Characterization of a cold-adapted DNA photolyase from *C. psychrerythraea* 34H. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 21(5), 919–932. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0953-z>
79. Osakabe, A., Tachiwana, H., Kagawa, W. et al. (2015). Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6–4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. *Scientific reports* 5, 16330 . <https://doi.org/10.1038/srep16330>
80. Osakabe, A., Tachiwana, H., Kagawa, W. et al. (2015). Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6–4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. *Scientific reports* 5, 16330 . <https://doi.org/10.1038/srep16330>
81. Ott, E., Kawaguchi, Y., Kölbl, D. et al (2019) Molecular repertoire of *Deinococcus radiodurans* after 1 year of exposure outside the International Space Station within the Tanpopo mission. *Microbiome* 8, 150 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54742-6>
82. Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A., & Deisenhofer, J. (1995). Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5219), 1866–1872. <https://doi.org/10.1126/science.7604260>
83. Paulino-Lima, I. G., Fujishima, K., Navarrete, J. U., Galante, D., Rodrigues, F., Azua-Bustos, A., & Rothschild, L. J. (2016). Extremely high UV-C radiation resistant microorganisms from desert environments with different manganese concentrations. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 163, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.017>
84. Panitz, C., Frösler, J., Wingender, J., Flemming, H. C., & Rettberg, P. (2019). Tolerances of *Deinococcus geothermalis* Biofilms and Planktonic Cells Exposed to Space and Simulated Martian Conditions in Low Earth Orbit for Almost Two Years. *Astrobiology*, 19(8), 979–994. <https://doi.org/10.1089/ast.2018.1913>
85. Perry, K. L., Elledge, S. J., Mitchell, B. B., Marsh, L., & Walker, G. C. (1985). *umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light- and chemical-induced mutagenesis: *UmuD*, *MucA*, and *LexA* proteins share homology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(13), 4331–4335. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.13.4331>
86. Pulschen, A. A., Rodrigues, F., Duarte, R. T., Araujo, G. G., Santiago, I. F., Paulino-Lima, I. G., Rosa, C. A., Kato, M. J., Pellizari, V. H., & Galante, D. (2015). UV-resistant

yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *MicrobiologyOpen*, 4(4), 574–588. <https://doi.org/10.1002/mbo3.262>

87. Reuven, N. B., Arad, G., Maor-Shoshani, A., & Livneh, Z. (1999). The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *The Journal of biological chemistry*, 274(45), 31763–31766. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31763>
88. Rivkina, E. M., Friedmann, E. I., McKay, C. P., & Gilichinsky, D. A. (2000). Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3230–3233. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3230-3233.2000>
89. Runyen-Janecky, L. J., Hong, M., & Payne, S. M. (1999). The virulence plasmid-encoded impCAB operon enhances survival and induced mutagenesis in *Shigella flexneri* after exposure to UV radiation. *Infection and immunity*, 67(3), 1415–1423. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.3.1415-1423.1999>
90. Sajjad, W., Din, G., Rafiq, M., Iqbal, A., Khan, S., Zada, S., Ali, B., & Kang, S. (2020). Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 24(4), 447–473. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01180-2>
91. Sancar, A., Smith, F. W., & Sancar, G. B. (1984). Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase. *The Journal of biological chemistry*, 259(9), 6028–6032.
92. Sancar A. (1994). Mechanisms of DNA excision repair. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5193), 1954–1956. <https://doi.org/10.1126/science.7801120>
93. Sancar G. B. (2000). Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutation research*, 451(1-2), 25–37.
94. Sancar, G. B., & Sancar, A. (2006). Purification and characterization of DNA photolyases. *Methods in enzymology*, 408, 121–156. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)08009-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)08009-8)
95. Schleicher, E., Hessling, B., Illarionova, V., Bacher, A., Weber, S., Richter, G., & Gerwert, K. (2005). Light-induced reactions of *Escherichia coli* DNA photolyase monitored by Fourier transform infrared spectroscopy. *The FEBS journal*, 272(8), 1855–1866. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04617.x>

96. Schuerger, A. C., Richards, J. T., Newcombe, D. A., & Venkateswaran, K. (2006). Rapid inactivation of seven *Bacillus* spp. under simulated Mars UV irradiation. *Icarus*, vol. 181, no. 1, pp. 52–62.
97. Schuerger, A. C., Clausen, C., and Britt, D. (2011). Methane evolution from UV-irradiated spacecraft materials under simulated martian conditions: implications for the Mars Science Laboratory (MSL) mission. *Icarus* 213, 393–403.
98. Schul, W., Jans, J., Rijksen, Y. M., Klemann, K. H., Eker, A. P., de Wit, J., Nikaido, O., Nakajima, S., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H., & van der Horst, G. T. (2002). Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice. *The EMBO journal*, 21(17), 4719–4729. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf456>
99. Siddiqui, K. S., & Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted enzymes. *Annual review of biochemistry*, 75, 403–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723>
100. Sinha, R. P., & Häder, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 1(4), 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
101. Slade, D., Lindner, A. B., Paul, G., & Radman, M. (2009). Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell*, 136(6), 1044–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.018>
102. Slade, D., & Radman, M. (2011). Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(1), 133–191. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-10>
103. Smith, B. T., & Walker, G. C. (1998). Mutagenesis and more: umuDC and the *Escherichia coli* SOS response. *Genetics*, 148(4), 1599–1610.
104. Steele, K. H., Baumgartner, J. E., Valderas, M. W., & Roop, R. M., 2nd (2010). Comparative study of the roles of AhpC and KatE as respiratory antioxidants in *Brucella abortus* 2308. *Journal of bacteriology*, 192(19), 4912–4922. <https://doi.org/10.1128/JB.00231-10>

105. Strahsburger, Erwin, Retamales, Patricio, Estrada, Juan, & Seeger, Michael. (2016). Microdot method: used with chromogenic agar is a useful procedure for sanitary monitoring in aquaculture. *Latin american journal of aquatic research*, 44(4), 742-749. <https://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-9>
106. Sundin, G. W., Kidambi, S. P., Ullrich, M., & Bender, C. L. (1996). Resistance to ultraviolet light in *Pseudomonas syringae*: sequence and functional analysis of the plasmid-encoded *ruAB* genes. *Gene*, 177(1-2), 77–81. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00273-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00273-9)
107. Sy, C., Dangles, O., Borel, P., & Caris-Veyrat, C. (2015). Interactions between Carotenoids from Marine Bacteria and Other Micronutrients: Impact on Stability and Antioxidant Activity. *Marine drugs*, 13(11), 7020–7039. <https://doi.org/10.3390/md13117020>
108. 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. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1698574>
109. Tardu, M., Bulut, S., & Kavakli, I. H. (2017). MerR and ChrR mediate blue light induced photo-oxidative stress response at the transcriptional level in *Vibrio cholerae*. *Scientific reports*, 7, 40817. <https://doi.org/10.1038/srep40817>
110. Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Hōrak, R., & Kivisaar, M. (2005). A DNA polymerase V homologue encoded by TOL plasmid pWW0 confers evolutionary fitness on *Pseudomonas putida* under conditions of environmental stress. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5203–5213. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5203-5213.2005>
111. Tian, B., Sun, Z., Shen, S., Wang, H., Jiao, J., Wang, L., Hu, Y., & Hua, Y. (2009). Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Letters in applied microbiology*, 49(6), 689–694. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02727.x>
112. Tornaletti S. (2009). DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(6), 1010–1020. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8738-x>

113. Vallejos-Almirall, A., Folch-Cano, C., Rosas, A., & Vergara, C. (2020). Development of liquid chromatography tandem mass spectrometry method to quantify cyclobutane pyrimidine dimer photolyase activity by detection of 15mer oligonucleotide as reaction product. *Journal of chromatography. A*, 1611, 460577. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460577>
114. van Oers, M. M., Herniou, E. A., Usmany, M., Messelink, G. J., & Vlak, J. M. (2004). Identification and characterization of a DNA photolyase-containing baculovirus from *Chrysodeixis chalcites*. *Virology*, 330(2), 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.032>
115. Venkateswaran, A., et al. 2000. . *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2620–2626.
116. Walker, J. C. G., *Evolution of the Atmosphere*, Macmillan, New York, 1977.
117. Walter, M. R. (1983). Archean stromatolites: evidence of the Earth's earliest benthos. In: *Earth's Earliest Biosphere: its Origins and Evolution* (Schopf, J. W., ed.) pp. 187–203. Princeton, NJ: Princeton University Press.
118. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
119. Willey, Joanne M., Linda Sherwood, Christopher J. Woolverton, and Lansing M. Prescott. Prescott, Harley, and Klein's *Microbiology*. New York: McGraw-Hill Higher Education, 2008. Print.
120. White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., Moffat, K. S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J. J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., ... Fraser, C. M. (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5444), 1571–1577. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1571>
121. Wright, M. H., Adelskov, J., & Greene, A. C. (2017). Bacterial DNA Extraction Using Individual Enzymes and Phenol/Chloroform Separation. *Journal of microbiology & biology education*, 18(2), 18.2.48. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v18i2.1348>

122. Yasui, A., Eker, A. P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M., & Oikawa, A. (1994). A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *The EMBO journal*, 13(24), 6143–6151.
123. Zhang, G., Lin, J., Srinivasan, K., Kavetskaia, O., & Duncan, J. N. (2007). Strategies for bioanalysis of an oligonucleotide class macromolecule from rat plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 79(9), 3416–3424. <https://doi.org/10.1021/ac0618674>
124. Zhang, M., Wang, L., & Zhong, D. (2017). Photolyase: Dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair. *Archives of biochemistry and biophysics*, 632, 158–174. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.08.007>
125. Zhong D. (2007). Ultrafast catalytic processes in enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 11(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.034>
126. Ziegelhoffer, E. C., & Donohue, T. J. (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature reviews. Microbiology*, 7(12), 856–863. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2237>

