

ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE IMAGEN APLICADA AL ESTUDIO DE METABOLITOS SINTETIZADOS DURANTE INTERACCIONES MICROBIANAS E INTERACCIONES PATÓGENO-HUÉSPED

TRABAJO FINAL DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Laura Les Bueno

Dirigido por Dra. María García-Altares Pérez

Departamento de Ingeniería Electrónica, Eléctrica y Automática maria.garcia-altares@urv.cat

En cooperación con MIL@b-URV

Tarragona, Julio 2020

Yo, **Laura Les Bueno**, con DNI **78777060-J**, soy conocedora de la guía de prevención del plagio de la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio de 2017) (<u>http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-</u> <u>nuclears/plagi/</u>) y afirmo que este Trabajo Final de Grado no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, **10** de julio de **2020**.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al grupo MIL@b la oportunidad de poder formar parte de su equipo de investigación. En especial a María García-Altares, por ser mi guía durante todo este trabajo. Su cercanía, dedicación y constante disponibilidad han sido esenciales para mí durante estos meses.

Gracias a los datos facilitados por Anna Komor y Ron Hermenau, miembros del Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute (HKI) - Jena – Alemania y por el Departamento de Biomolecular Chemistry Centro de Ciencias Ómicas (COS) Eurecat-URV he podido realizar el análisis y discusión de este trabajo.

Agradecer a Ricardo Cordero el abrirme las puertas de su grupo de microbiología y dedicar parte de su tiempo a enseñarme a cultivar los microorganismos.

También me gustaría dar las gracias a María Marco. Complementándonos desde el primer día hasta el último, ha hecho de estos 4 años de carrera una experiencia que nunca olvidaré. Juntas formamos un gran equipo. Me llevo una amiga para siempre.

Por último, me gustaría dedicar este trabajo a mi familia. Quiero agradecerles la oportunidad que me han dado, su confianza en mí y su apoyo en todas mis decisiones.

ÍNDICE

1.	DATOS DEL CENTRO1
2.	RESUMEN Y PALABRAS CLAVE2
3.	INTRODUCCIÓN4
3	3.1. Fundamentos teóricos de la espectrometría de masas4
3	3.2. Espectrometría de masas de imagen5
	3.2.1. Espectrómetro de masas MALDI-TOF: componentes y mecanismos de ionización
	3.2.2. Espectrometría de masas de imagen mediante desorción/ionización láser sin matriz
3	3.3. Preparación de muestras para estudios microbiológicos mediante espectrometría de masas de imagen10
	3.3.1. Análisis de microorganismos sobre placas ITO10
	3.3.2. Análisis de microorganismos sobre un sustrato de silicio nanoestructurado11
	3.3.3. Análisis de microorganismos sobre un organismo/tejido12
3	3.4. Aplicaciones de la técnica IMS en microbiología13
	3.4.1. Estudio de interacciones entre dos microorganismos
	3.4.2. Estudio de cepas patógenas directamente sobre huésped16
3	8.5. Caso de estudio: virulencia de Pseudomonas tolaasii y su interacción con otros microorganismos aislados de champiñones
4.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO19
5.	MATERIALES Y MÉTODOS19
Ę	5.1. Preparación de la muestra MALDI-IMS20
5	5.2. Preparación de la muestra SALDI-IMS
5	5.3. Obtención de datos mediante MALDI-IMS y SALDI-IMS21
5 r	5.4. Programas informáticos para el análisis de los datos obtenidos nediante MALDI-IMS y SALDI-IMS21

6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6	1. Análisis de datos	22
	6.1.1. Identificación putativa de metabolitos secretados por P. tolaasii en cultiva axénico y en cocultivo con Mycetocola tolaasinivorans utilizando MALDI-IMS	vo 22
	6.1.2. Comparación de los datos obtenidos de un cultivo de P. tolaasii median MALDI-IMS y SALDI-IMS	ite 33
7.	CONCLUSIÓN	37
8.	BIBLIOGRAFIA	40
9.	AUTOEVALUACIÓN	43
AN	EXOS	44
A	NEXO 1. Glosario de términos	44

1. DATOS DEL CENTRO

El grupo de investigación MIL@b está dirigido por el profesor Xavier Correig y se centra en el diseño de programas de algoritmos aplicados a datos multivariantes para técnicas de imagen, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. MIL@b ahora también integra el grupo junior independiente Yanes Lab (Dr. Óscar Yanes) que se especializa en cromatografía de gases y líquidos acoplada a espectrometría de masas metabolómica.

El grupo de investigación MIL@b está formado actualmente por 9 investigadores senior, 4 investigadores postdoc, 8 Ph.D. estudiantes y 2 técnicos. La experiencia activa de investigación científica de la Plataforma Metabolómica es un cruce entre cuatro disciplinas: técnicas analíticas, bioinformática, ingeniería y aplicaciones biomédicas.

El grupo de investigación ha ganado una sólida reputación en el campo de la metabolómica, tanto en el desarrollo de análisis y métodos computacionales como en la aplicación de esta técnica a la investigación biomédica. Por ejemplo, el grupo publicó una revisión en 2012 en *Nature Reviews: Molecular cell biology* (1) que se ha convertido en una pieza fundamental de literatura en el campo de la metabolómica que acumula más de 1000 citas en *Google Scholar*. El grupo también desarrolla métodos analíticos para técnicas de imagen usando nanopartículas. Las aplicaciones exploran las funcionalidades de las nanopartículas metálicas para permitir la detección de metabolitos in situ en muestras biológicas por ionización por desorción láser: imágenes de espectrometría de masas e imágenes de espectroscopía RAMAN para realizar metabolómica espacial y proteómica.

Línea de investigación relacionadas con este trabajo: Espectroscopía de imagen para aplicaciones biológicas

- **Sublínea:** Nanomateriales como nuevos promotores de ionización y otros desarrollos experimentales. (Dra. María García-Altares)
- Sublínea: Procesamiento de datos para imágenes de espectrometría de masas para mejora espectral, comparación automática de imágenes y detección de características significativas. (Dr. Pere Ràfols)

2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

ES| La espectrometría de masas de imagen (IMS) es una técnica analítica basada en la ionización y detección de los compuestos presentes en una muestra. Permite determinar la masa molecular, la distribución espacial y la abundancia relativa de los compuestos generando un espectro de masas de cada punto medido y una imagen iónica de cada compuesto detectado.

En este trabajo, IMS se presenta como una potente herramienta para el estudio de interacciones entre microorganismos y de microorganismos patógenos en la fase de colonización de su organismo huésped. Para ello, se destacan varios ejemplos relevantes donde se demuestra la utilidad de la espectrometría de imágenes por desorción/ionización asistida por matriz (MALDI) en investigaciones microbiológicas.

Para corroborar la eficacia de esta técnica se analizan y discuten los datos obtenidos a partir de un cultivo de la bacteria *Pseudomonas tolaasii* y un cocultivo de ésta con *Mycetocola tolaasinivorans*, ambas aisladas originalmente del champiñón. Los resultados demuestran que MALDI-IMS es un rápido generador de hipótesis que permite identificar putativamente compuestos sintetizados por *P. tolaasii,* como la tolaasina y la pseudodesmina, entre otros. Además, gracias a este análisis se especula que *M. tolaasinivorans* es capaz de linealizar la tolaasina causante de enfermedades en los champiñones, abriendo camino a futuras investigaciones sobre su mecanismo de detoxificación.

Además, se compara MALDI-IMS con la ionización por desorción láser asistida por superficie (SALDI) utilizando un sustrato nanoestructurado de silicio cubierto con nanopartículas de oro. SALDI-IMS puede suplir algunas de las desventajas de MALDI, especialmente la sustitución de la matriz orgánica, por lo que ambas técnicas podrían complementarse.

Palabras clave: Espectrometría de masas, MALDI-IMS, matriz orgánica, SALDI-IMS, superficies nanoestructuradas, nanopartículas de oro, *Pseudomonas tolaasii, Mycetocola tolaasinivorans*

EN Imaging mass spectrometry (IMS) is an analytical technique based on the ionization and detection of compounds present in a sample. It allows to determine the molecular mass, the spatial distribution and the relative abundance of the compounds, generating a mass spectrum of each measurement point and an ion image of each detected compound.

In this work, IMS is presented as a powerful tool for the study of interactions between microorganisms, and pathogenic microorganisms during the colonization phase of their host. To this end, several relevant examples are highlighted where the utility of matrix-assisted desorption / ionization (MALDI) imaging spectrometry in microbiological investigations is demonstrated.

To corroborate the efficacy of this technique, the data obtained from a culture of the bacterium *Pseudomonas tolaasii* and a co-culture of it with *Mycetocola tolaasinivorans*, both originally isolated from mushrooms, are analyzed and discussed. The results demonstrate that MALDI-IMS is a rapid hypothesis generator that allows to putatively identify compounds synthesized by *P. tolaasii*, such as tolaasin and pseudodesmin, among others. Furthermore, thanks to this analysis, it is speculated that *M. tolaasinivorans* is capable of linearizing tolaasin, a virulence factor in a mushroom disease, opening the way for future research into its detoxification mechanism.

In addition, MALDI-IMS is compared to surface-assisted laser desorption ionization (SALDI) using a nanostructured silicon substrate coated with gold nanoparticles. SALDI-IMS can overcome some of the disadvantages of MALDI, especially the substitution of the organic matrix, therefore both techniques could complement each other.

Key words: Mass spectrometry, MALDI-IMS, organic matrix, SALDI-IMS, nanostructured surfaces, gold nanoparticles, Pseudomonas tolaasii, Mycetocola tolaasinivorans

3. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos llevan a cabo procesos bioquímicos complejos. Para poder comprender estos procesos es necesario conocer las entidades moleculares involucradas, así como su distribución espacial dentro y fuera de los organismos en cualquier punto de su ciclo de desarrollo.

Hoy en día, esto es posible gracias a tecnologías analíticas moleculares de alta sensibilidad. Hay métodos comunes para identificar moléculas específicas, como los radiomarcadores o las etiquetas inmunohistoquímicas. Sin embargo, existen límites en la especificidad de estos métodos y en el número de compuestos que se pueden monitorear simultáneamente.

La <u>espectrometría de masas de imagen</u> * (IMS: *Imaging Mass Spectrometry*) se ha convertido en una poderosa herramienta para investigar la identidad y la distribución espacial de moléculas en los sistemas biológicos.^[1]

3.1. Fundamentos teóricos de la espectrometría de masas

La <u>espectrometría de masas</u> (MS: *Mass Spectrometry*) es una técnica analítica que separa moléculas según su masa y su carga eléctrica. Esto permite estudiar la identidad y abundancia de moléculas presentes en una muestra.^[2]

El principio de esta técnica se basa en <u>ionizar</u> las moléculas de una muestra de interés y transformar esos <u>iones</u> en una fase gaseosa. Los iones pasan a través de un analizador que los separa en función de su ratio masa/carga. Finalmente, un detector emite una señal eléctrica proporcional al número de iones detectados y, mediante un sistema informático, se procesa la información para generar un <u>espectro de masas</u>. Éste representa las especies iónicas presentes en una muestra, expresadas en función de su <u>masa/carga (*m/z*)</u> y la abundancia relativa (intensidad) de cada una en la muestra.

Todo el proceso se realiza en un <u>espectrómetro de masas</u> (Figura 1), el cual presenta 3 componentes básicos independientemente del tipo de MS: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector.^[3]

^{*}Todas las palabras subrayadas están vinculadas con su correspondiente definición en el glosario de términos de la página 44.



Figura 1. Esquema general de un espectrómetro de masas. Fuente: Elaboración propia.

La espectrometría de masas ha alcanzado una gran relevancia a lo largo del siglo XX y gracias a ello, se han ido desarrollando nuevas técnicas de ionización y separación de iones.

3.2. Espectrometría de masas de imagen

IMS no solo diferencia moléculas en función de su masa/carga, sino que además permite mapear el contenido molecular de una muestra. Esto facilita la creación de <u>imágenes iónicas</u>, es decir, mapas de distribución espacial donde cada ion medido se registra en una ubicación específica sobre una muestra biológica sólida, tradicionalmente un corte histológico de un tejido animal o vegetal.^[1]

3.2.1. Espectrómetro de masas MALDI-TOF: componentes y mecanismos de ionización

Con la aparición de las técnicas de "ionización suave" en los años 80, se consiguió analizar biomoléculas de mayor tamaño utilizando un láser como fuente de ionización y una <u>matriz orgánica</u> que ayuda en el proceso. De ahí el nombre MALDI-TOF IMS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Imaging Mass Spectrometry*), es decir, espectrometría de masas de imagen mediante ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo. Utilizando esta técnica se genera un número mínimo de especies iónicas, quedando la molécula prácticamente intacta, por lo que el espectro es mucho más sencillo de interpretar.^[4]

El primer paso para obtener un espectro de masas y sus correspondientes imágenes iónicas mediante MALDI-IMS consiste en depositar la muestra problema (comúnmente un corte histológico) sobre un soporte conductor (pueden ser de acero, vidrio, cerámica o plástico desechables).^[3] Muchos grupos, entre ellos MIL@b, utilizan portaobjetos de vidrio conductores cubiertos con óxido de estaño e indio (ITO).

Una vez colocada la muestra, se aplica una matriz formada por pequeños ácidos orgánicos que contienen en su estructura un anillo bencénico conjugado. La matriz ayuda a convertir las biomoléculas grandes y no volátiles de la muestra en iones intactos en fase gaseosa; además de ser crucial para la adherencia de la muestra al soporte.

Se pueden utilizar distintas matrices en función del tipo de muestra o incluso mezclas de matrices. Las más utilizadas son el ácido α-ciano-3,4-hidroxicinámico (HCCA) para proteínas y péptidos pequeños y el 2,5 ácido di-hidroxibenzoico (DHB) para carbohidratos y glucopéptidos.^[5] Estas matrices, normalmente, se aplican sobre la muestra con un espray robotizado y vienen disueltas en un solvente orgánico compuesto por agua, etanol, acetonitrilo y ácido trifluoroacético, pero pueden optimizarse para aplicaciones específicas.^[4]

El soporte que contiene la muestra se introduce en una cámara de alto vacío del espectrómetro de masas. En este paso, los compuestos de la matriz se cristalizan con la muestra debido a la evaporación de los solventes de la matriz. A continuación, la parte de muestra que se quiere investigar es irradiada por un láser (generalmente de nitrógeno, de 340-360 nm) que escanea toda esta superficie mediante pulsos cortos. La trayectoria definida se ajusta para evitar un calentamiento excesivo y la degradación de la muestra.

El tamaño de los cristales de la matriz junto con el diámetro del rayo láser son los factores principales en la <u>resolución espacial</u> de MALDI-IMS.^[5]

Los compuestos de la matriz, ya cristalizados, absorben gran parte de la energía UV irradiada por el láser. Gracias a ello, las moléculas de la superficie de la muestra se ionizarán sufriendo mínimas fragmentaciones. Durante el proceso de ionización la matriz puede transferir un protón a la muestra, pero también otros iones (generalmente sodio o potasio) formando <u>aductos</u>, lo cual tendrá que ser tomado en cuenta en la relación de masas final de la muestra a analizar. Tras la ionización, los compuestos volatilizan fácilmente formando iones en una cámara de alto vacío.

En la tecnología MALDI-TOF, los iones pasan a la zona del analizador de "tubo de vuelo" (TOF), donde se retienen hasta que se aplique una aceleración por impulso eléctrico. El analizador es la zona del espectrómetro donde se genera un potente campo

electromagnético que atrae las partículas cargadas hacia el detector. La energía proporcionada por el láser es constante, de modo que los iones más ligeros vuelan más rápido, llegando antes al detector y los más pesados tardan más en llegar. Al final del TOF se localiza un multiplicador de electrones que amplifica la señal. El detector registra el tiempo que tardan los iones en atravesar el campo magnético y transforma la señal de la corriente de iones.

Los datos resultantes son procesados por un sistema informático que genera una serie de espectros de masas donde se representa la intensidad relativa de la señal (eje y) y la relación masa/carga (eje x) de los compuestos detectados. Cada espectro es un perfil molecular independiente del área irradiada por el láser. Cada área individual se considera un "<u>píxel</u>". Por lo tanto, un experimento de IMS está formado por miles de espectros individuales, cada uno proveniente de un píxel.^[5]

A partir de estos datos, se pueden generar imágenes iónicas (es decir, la distribución espacial de un ion concreto) sobre la superficie de la muestra, trazando la intensidad de una sola señal o un conjunto de señales en el sistema de coordenadas original. En función de la intensidad de la señal recibida en cada zona, se asigna un falso color a la molécula, lo que permite conocer no solo su ubicación sino también su abundancia relativa. Esto ayuda a asignar un rol biológico a las moléculas detectadas. En la Figura 2 se puede observar un esquema general del proceso MALDI-IMS descrito.^[1]



Figura 2. Esquema del proceso MALDI-TOF IMS. Fuente: Elaboración propia.

3.2.2. Espectrometría de masas de imagen mediante desorción/ionización láser sin matriz

MALDI es la técnica de ionización más utilizada en IMS. Sin embargo, el uso de la matriz orgánica presenta ciertos inconvenientes. A veces, los ácidos orgánicos que cristalizan con la muestra forman cristales demasiado grandes (algunos alcanzan varias micras). Esto afecta a la resolución lateral haciendo imposible la obtención de imágenes cualitativas de alta resolución espacial. Además, los ácidos orgánicos tienen pesos moleculares bajos (de 100 a 200 Da). Esto es un problema ya que se acumulan numerosos picos derivados de la matriz en los espectros que pueden confundirse con compuestos orgánicos pequeños que proceden de la muestra. También se ha observado que la alta volatilidad de algunas matrices orgánicas como la 2,6-dihidroxiacetofenona (DHA) y el ditranol hace que se evaporen en la fuente de iones de alto vacío del espectrómetro de masas durante su tiempo de vuelo.^[6]

La aplicación de la matriz mediante sublimación (en lugar de utilizar un espray) puede superar alguno de estos problemas, ya que es un método de deposición libre de solventes. En este caso, los cristales que forman la matriz son más pequeños y hay una difusión lateral de <u>analitos</u> menor, lo que evita la deslocalización de los compuestos.^[7] Sin embargo, los compuestos orgánicos de la matriz siguen interfiriendo severamente con los picos del espectro de los analitos de bajo peso molecular presentes en la muestra problema.^[6]

En consecuencia, se han desarrollado otros métodos de IMS que sustituyen la matriz orgánica. La espectrometría de masas de imagen mediante desorción / ionización láser (LDI-IMS: *Laser Desorption/Ionization – Imaging Mass Spectrometry*) sin matriz es una alternativa para el análisis de metabolitos de bajo peso molecular.^[8]

Entre las técnicas LDI-IMS destacan la ionización por desorción láser asistida por superficie (SALDI),^[9] donde la ionización está respaldada por materiales nanoestructurados; la ionización por desorción en silicio favorecida por silicio poroso (DIOS)^[10] y la espectrometría de masas iniciadora de nanoestructuras (NIMS),^[11] la cuál utiliza moléculas atrapadas en superficies nanoestructuradas para promover la ionización de las moléculas. Actualmente, estas técnicas están complementando o reemplazando con éxito a las matrices orgánicas.

En este trabajo se destacan dos alternativas al uso de matriz orgánica utilizando LDI-IMS.

- Ionización por desorción láser asistida por superficie cubierta con oro

Una alternativa muy interesante consiste en la deposición de nanocapas homogéneas de un metal u óxido metálico de alta pureza sobre la muestra mediante pulverización catódica. De esta forma se evita la deslocalización molecular ya que es una técnica de deposición libre de solventes.^[8]

Las nanocapas de oro (Au) son altamente estables y favorecen la absorción de la luz láser y la transferencia eficiente de la energía absorbida a los metabolitos de la muestra.^[12] El oro tiene un solo <u>isótopo</u> estable, lo que reduce el número de picos y facilita su detección en el espectro. Además, los picos característicos de oro se pueden utilizar para calibrar las diferentes regiones *m/z* del espectro obtenido.

Varios estudios han utilizado nanopartículas de oro para analizar biomoléculas mediante SALDI-IMS.^[8] Los resultados mostraron una ionización efectiva de metabolitos de bajo peso molecular sin apenas ruido de fondo.

Sustrato de estado sólido basado en nanoestructuras de silicio negro y oro

Los sustratos de estado sólido con superficies nanoestructuradas también parecen ser una buena alternativa al uso de la matriz orgánica. El grupo MIL@b de la universidad Rovira i Virgili (Tarragona) ha desarrollado un nuevo sustrato de estado sólido basado en nanoestructuras de silicio negro y nanopartículas de oro.^[12]

Las superficies nanoestructuradas de silicio negro (BSi) son comúnmente utilizadas para LDI sin matriz.^[13] La característica predominante de BSi es su superficie negra, formada por una serie de nanopilares de silicio que absorben hasta el 99% de la luz visible. Además, estas superficies son muy estables en el tiempo.

Además, las nanoestructuras de silicio pueden modificarse fácilmente con otros compuestos. Gao *et al.*^[14] demostraron que se puede lograr una mayor eficiencia de ionización complementando la nanoestructura BSi con un "asistente" para la ionización. Debido a sus características, el oro tiene un gran potencial para complementar sustratos SALDI, por lo que es un buen asistente para la ionización.

Las superficies nanoestructuradas a base de silicio cubiertas con nanopartículas de oro fueron evaluadas por MIL@b^[12] mediante la transferencia de metabolitos de tejidos animales y huellas dactilares humanas. Se demostró que el sustrato AuBSi puede usarse para realizar experimentos SALDI-IMS. Sin embargo, este método limita el análisis de algunas muestras (como tejidos animales) ya que no pueden colocarse en contacto directo con las nanopartículas de oro para poder desorberse e ionizarse. Esto

se ha solucionado transfiriendo las moléculas mediante la impresión directa de la muestra a la superficie SALDI, ya que es suficiente para obtener datos de IMS de alta calidad.^[15]

3.3. Preparación de muestras para estudios microbiológicos mediante espectrometría de masas de imagen

Aunque la técnica IMS se utiliza tradicionalmente sobre cortes histológicos de tejidos animales y vegetales, también puede utilizarse para cultivos microbiológicos sobre medios sólidos. Hay diversos enfoques para preparar muestras microbianas, ya que es un proceso crítico en todos los experimentos de IMS.^[5] A continuación, se resumen los métodos más utilizados en la literatura científica para conseguir una imagen quimiotípica de una muestra microbiana en función del sustrato utilizado y los factores que se recomienda tener en cuenta para conseguir imágenes iónicas de alta calidad.

3.3.1. Análisis de microorganismos sobre placas ITO

Para analizar una muestra microbiana sobre un portaobjetos ITO (o similares) se siguen 5 pasos clave descritos en la publicación de Yang *et al.*^[5]

 Cultivo del microorganismo: El primer paso es cultivar uno o más microbios en un medio de agar sobre una placa Petri o directamente sobre el soporte MALDI, tal y como se muestra en la Figura 3. En ambos casos es recomendable que el medio de cultivo sea lo más simple posible, optando por medios mínimos con un espesor de 1 a 1,5 mm cuando la aplicación lo permita.



Figura 3. Diferentes métodos para el cultivo de microorganismos en IMS. **A)** Se incrusta el portaobjetos ITO en agar antes de la inoculación e incubación. Una vez ha crecido el microorganismo, se corta la muestra por los bordes del portaobjetos para extraerlo de la placa Petri. **B)** Se cultiva el microorganismo en una placa de Petri y una vez incubado se extirpa la región de interés, transfiriéndolo al portaobjetos ITO. Fuente: Modificado de [5]

- 2. Aplicación de la matriz: Hay distintos métodos para depositar la matriz MALDI. Una de las técnicas más usadas es la deposición por electropulverización,^[16] aunque ésta puede provocar la deslocalización del analito, perdiendo su disposición espacial original. Una alternativa eficiente es el recubrimiento de la muestra por pulverización de la matriz con un aerógrafo de acero inoxidable.^[17] Éste permite cubrir la muestra de forma homogénea.
- 3. Deshidratación: El siguiente paso consiste en deshidratar la muestra microbiana a 37°C o mediante un desecador de vacío. Esto garantiza que los componentes del espectrómetro de masas MALDI-IMS alcancen la presión de vacío necesaria para el análisis. Además, deshidratando el agar se disminuye el grosor de la muestra, lo que ayuda a cumplir con la altura máxima permitida en experimentos MALDO-TOF IMS (1 mm).

Sin embargo, el proceso de secado es un paso crítico ya que puede producirse la descamación de la muestra (fisuras o desprendimiento parcial o completo). Esto suele deberse a la saturación insuficiente de la muestra con la matriz, al aire atrapado bajo el medio de crecimiento, a ciertos componentes del medio de cultivo o a moléculas microbianas, lo que causa la incapacidad del agar seco para permanecer adherido al soporte. Cuando la adherencia de la muestra sea cuestionable, la muestra no debe insertarse en el espectrómetro de masas.

- 4. Adquisición de datos mediante MALDI-TOF IMS: Con ayuda de un programa informático el usuario define la resolución espacial deseada, así como el área de medición de interés utilizando una fotografía de referencia de la muestra bacteriana.
- 5. Análisis e interpretación de los datos: A partir de los espectros obtenidos se puede generar una imagen molecular de cada compuesto superponiéndolo en una fotografía de la muestra microbiana.

3.3.2. Análisis de microorganismos sobre un sustrato de silicio nanoestructurado

En este caso se siguen los pasos de la investigación de Chen *et al.*^[18] para preparar la muestra, que dista en algunos puntos del caso anterior.

 Cultivo del microorganismo: Se hace crecer el microbio en el medio adecuado y a su temperatura óptima.

- 2. Preparación del sustrato: Antes de utilizar el sustrato de silicio para depositar la muestra, éste se enjuaga durante unos segundos con metanol y se seca con nitrógeno gas para evitar la interferencia de burbujas y facilitar la transfección de los analitos de la muestra microbiana.
- 3. Impresión de la muestra: Se imprime la parte posterior de la muestra microbiana en la superficie. Para ello, se recorta el área objetivo del cultivo que interesa y se coloca sobre el sustrato de tal forma que la parte posterior del cultivo quede en contacto con la superficie del sustrato. Las moléculas disueltas en el agar y las segregadas por el microorganismo migran del agar hacia el sustrato y se adhieren a la superficie. La principal desventaja de recolectar IMS desde el reverso de las muestras microbianas es que pueden perderse algunas señales asociadas a la colonia.

Se ha demostrado que la intensidad de la señal MS se satura cuando el período de impresión es superior a 15 minutos. Al retirar la muestra, el sustrato se lava con agua o un solvente orgánico para retirar el agar que se pueda adherir y se limpia nuevamente con nitrógeno gas antes de recopilar los datos de IMS.

 La adquisición de datos mediante MALDI-TOF IMS y el análisis e interpretación de resultados son los mismos independientemente del sustrato.

3.3.3. Análisis de microorganismos sobre un organismo/tejido

Una posibilidad muy atractiva que ofrece IMS es el poder analizar muestras microbiológicas preparadas a partir de la inoculación directa del microbio sobre un organismo/tejido con el que interacciona ^[19] (por ejemplo, sobre la superficie de una seta, la piel de una fruta, una hoja, etc.).

- Cultivo del microorganismo: Se cultiva el microbio que nos interesa analizar en el medio y temperatura óptimos.
- Inoculación en un organismo/tejido: El organismo huésped se corta en rodajas de 1 mm, se secciona o, en el caso de las hojas vegetales, se aplana y a continuación se inocula el microbio cultivado previamente.
- Incubación de la muestra: El organismo huésped inoculado con el microbio se incuba a temperatura ambiente el tiempo suficiente para que se haya establecido una interacción entre ambos.
- **4.** Los pasos de **aplicación de la matriz**, **secado de la muestra** y **adquisición e interpretación de resultados** son los mismos que en el apartado 3.3.1.

3.4. Aplicaciones de la técnica IMS en microbiología

MALDI-TOF IMS se ha aplicado durante años en el ámbito de la patología molecular,^[20] ya que esta técnica permite detectar proteínas, péptidos o lípidos implicados en diversas enfermedades a partir de un tejido biológico.

En el sector microbiológico, IMS está revolucionando el método de identificación de microorganismos.^[21] Una de las principales ventajas de usar MALDI-TOF en los laboratorios de microbiología clínica es el tiempo ahorrado, ya que la identificación bacteriana se puede realizar en menos de una hora. Es un sistema eficiente, de alto rendimiento y bajo costo.

Además, IMS permite identificar metabolitos en prácticamente cualquier microbio cultivable y relacionarlos con su rol biológico.^[5] Este trabajo describe dos de las aplicaciones más interesantes de MALDI-IMS en microbiología: el estudio de interacciones entre microorganismos y el estudio de microorganismos patógenos en la fase de colonización de su organismo huésped.

3.4.1. Estudio de interacciones entre dos microorganismos

La mayoría de las especies microbianas son capaces de secretar señales químicas bioactivas en su entorno para garantizar su supervivencia y crecimiento frente al resto de microbios presentes en el mismo nicho ecológico.^[22] Dada la importancia de estas interacciones se han realizado numerosos estudios basados en la competencia microbiana, aunque quedaban limitados debido a la falta de herramientas óptimas.

IMS permite observar *in situ* metabolitos específicos que se generan en un cocultivo en medio sólido lo que ayuda a comprender las consecuencias producidas al interaccionar distintas especies microbianas.^[23]

González *et al.* ^[22] utilizaron la tecnología IMS para estudiar las interacciones entre dos especies bacterianas, *Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus*. *B. subtilis* produce y secreta una gran cantidad de moléculas codificadas genéticamente que controlan el crecimiento de organismos vecinos. Por su parte, *S. aureus* es un patógeno humano que causa una serie de infecciones graves.

Con ayuda de MALDI-IMS los autores observaron algunos detalles moleculares de esta interacción. Demostraron que *B. subtilis* puede inhibir el crecimiento de *S. aureus* en cocultivo sólido al liberar dos factores de virulencia ya conocidos, la surfactina y la plipastatina. Ambos son antibióticos lipopeptídicos cíclicos naturales. Los localizaron

alrededor o dentro de la zona de inhibición (Figura 4). Esta estrategia podría usarse como una plataforma para identificar compuestos bioactivos contra *S. aureus* derivados de cualquier microbio que posea una ventaja competitiva.



Figura 4. A) Cultivo de B. subtilis (Bs) con S. aureus (Sa) en una configuración en forma de T.
B) IMS de la muestra. La escala de color de intensidad iónica indica que la surfactina liberada naturalmente se encuentra en la zona de interacción bacteriana. Fuente: Modificado de [22]

MALDI-IMS también ha demostrado que los antibióticos no sirven únicamente como armas químicas entre microbios, sino que algunos favorecen el desarrollo de sus microbios vecinos.

Bleich *et al.* ^[24] demostraron mediante un cocultivo con *B. subtilis* y *Bacillus cereus* que el antibiótico tiocilina producido por *B. cereus* actúa como señal intraespecie alterando la expresión del gen de matriz de biopelículas de *B. subtilis*. Este hallazgo respalda la contribución de la matriz extracelular de *Bacillus* para adaptarse en presencia de otras especies bacterianas.

Para identificar la molécula activadora de biopelículas producida por *B. cereus,* modificaron *B. subtilis* para que emitiese colonias fluorescentes al sintetizar el gen formador de la biopelícula. Esto permitió ver mediante MALDI-IMS como el metabolito de interés presentaba distribuciones espaciales que se superponían con la fluorescencia (Figura 5). Por lo tanto, MALDI-IMS identificó la tiocilina, además de establecer una conexión de fenotipo a quimiotipo de forma rápida y definitiva.



Figura 5. *A*) B. cereus cultivado sobre microcolonias de B. subtilis; *B*) B. subtilis modificado con un indicador transcripcional fluorescente para expresar el gen de la matriz de biopelículas (P_{tapA} _ yfp). Como se observa, hay fluorescencia donde las colonias de B. subtilis están cerca de B. cereus, lo que indica que la expresión del gen de la matriz está activada; *C*) Mediante IMS se observa que el ión con m/z=1142 Da se localiza con el área de fluorescencia observada en B; *D*) Estructura del ion observado en C. Fuente: Modificado de [24]

MALDI-IMS también se ha utilizado para explorar compuestos químicos que interactúan en un sistema simbiótico. Esto podría ser muy interesante en el ámbito farmacéutico, ya que los metabolitos involucrados en interacciones microbianas de sistemas simbióticos tienen un gran potencial en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Boya P. *et al.*^[25] estudiaron un complejo sistema simbiótico establecido en la hormiga *Acromyrmex echinatior* en el que las interacciones microbianas son fundamentales para mantener el equilibrio de la comunidad. Estos microbios usan su maquinaria biosintética para producir metabolitos dedicados a interactuar con el huésped, y también con otros simbiontes microbianos en el sistema. Usando MALDI-IMS se identificaron tres familias moleculares directamente involucradas en interacciones antagónicas entre actinobacterias asociadas a *A. echinatior* y *Escovopsis sp.* (un patógeno presente en el nicho); y se visualizó la distribución de estos antimicrobianos en la zona de inhibición. Además, IMS reveló que tanto las bacterias como el patógeno producían estos compuestos independientemente de la presencia o ausencia de sus microbios antagonistas. Esto es un gran avance, ya que hay pocos ejemplos que explican interacciones simbióticas que involucran a más de dos simbiontes.

Los estudios anteriores demuestran que MALDI-IMS es una poderosa herramienta para estudiar interacciones microbianas muy diversas. Se espera que esta tecnología contribuya al descubrimiento de nuevos metabolitos microbianos, en gran demanda ante la crisis global de resistencia a antibióticos.

3.4.2. Estudio de cepas patógenas directamente sobre huésped

La posibilidad de combinar IMS con otras técnicas podría facilitar el descubrimiento de productos naturales, como factores de virulencia que tan solo se producen en un contexto patobiológico particular.

Por ejemplo, MALDI-IMS se está utilizando en investigaciones del sector vinícola ya que es una técnica que permite adquirir datos a escala micrométrica de la interacción vid/patógeno. Se han probado otras técnicas para analizar metabolitos de extractos líquidos de hojas, pero se pierde la ubicación exacta de los compuestos sobre el tejido. Con IMS se forma un mapa molecular de todas las especies simultáneamente sobre una imagen de la hoja, ubicando los compuestos a escala micrométrica.

Hamm *et al.* ^[26] localizaron, identificaron y diferenciaron con ayuda de MALDI-IMS estilbenos producidos en la superficie de hojas de la vid para defenderse de agentes estresantes. Los estilbenos, también conocidos como fitoalexinas, son metabolitos secundarios que participan en mecanismos de defensa de las plantas. Los principales estilbenos identificados fueron el resveratrol y el pterostilbeno. Estos metabolitos protegen a la planta de infecciones causadas por *Plasmopara vitícola* o irradiaciones UV-C. Además, esta técnica permitió evaluar la concentración relativa de estilbenos en la hoja y establecer cierta correlación entre el sitio de la infección o irradiación y la síntesis de estilbenos.

Cuatro años más tarde, Becker *et al.* ^[27] mapearon varios estilbenos en hojas de parra utilizando MALDI-TOF IMS. Al igual que el grupo anterior, detectaron el resveratrol y el pterostilbeno, pero también un compuesto muy tóxico contra hongos, las viniferinas. Éste se observó utilizando una matriz específica. MALDI-IMS reveló que la vid reacciona a la infección por *P. vitícola* produciendo grandes cantidades de estilbenos en el sitio de infección y aportó nuevos detalles químicos sobre sus distribuciones espaciales.

En 2017 este mismo grupo profundizó en la investigación utilizando dos técnicas de imagen complementarias: imágenes de fluorescencia e imágenes de espectroscopía de masas.^[28] Descubrieron que las hojas de vid reaccionan de forma diferente dependiendo del estrés al que se ven sometidas (Figura 6). Tras la irradiación UV-C se induce una síntesis bastante uniforme de estilbenos. Sin embargo, una infección de *P. vitícola* induce una síntesis más localizada de estilbenos en los estomas y las paredes celulares.



Figura 6. Comparación de una hoja de vid irradiada con UV-C (**A**) y de otra hoja de vid inoculada con P. vitícola (**B**). En ambos casos se sigue el mismo protocolo: **a**) Imagen obtenida por macroscopia de transmisión; **b**) Macroscopia de fluorescencia; **c**) Mapa molecular de resveratrol (*m*/*z*=228 Da); **d**) Mapa molecular de pterostilbeno (*m*/*z*=254 Da). Fuente: Modificada de [28]

Este enfoque podría extenderse a otros patosistemas que involucran fitoalexinas fluorescentes, como las cumarinas en el girasol o los isoflavonoides en la soja.

MALDI-IMS también se ha utilizado para investigar ciertas enfermedades del sector agroalimentario. Graupner *et al.*^[29] descubrieron el factor de virulencia causante de la enfermedad de la podredumbre blanda que padecen algunos hongos como *Agaricus bisporus*, comúnmente conocido como champiñón. El champiñón es uno de los hongos más cultivados y consumidos, pero es propenso a sufrir infecciones bacterianas, fúngicas e incluso virales. En concreto, la pobredumbre blanda es una infección provocada por la bacteria *Janthinobacterium agaricidamnosum*. Causa la aparición de manchas pegajosas y una disolución completa del hongo en unos pocos días. Los mediadores químicos de esta enfermedad de pudrición habían permanecido esquivos hasta que estos investigadores estudiaron al patógeno en acción mientras infectaba un cuerpo fructífero de hongo. Combinando MALDI-IMS y *genome mining* (predicción de los metabolitos que puede producir un microorganismo en base a su genoma), descubrieron y caracterizaron la jagaricina, un lipopéptido cíclico, como un factor de virulencia altamente antifúngico que no se produce en condiciones de cultivo estándar (Figura 7).

Descubrir el agente causal de la podredumbre blanda ayuda a comprender la patobiología de esta enfermedad. Esto supone un punto de partida en las medidas de protección contra esta infección, además de la necesidad de descubrir nuevos antifúngicos. De hecho, observaron que esta estructura muestra una actividad

antifúngica fuerte y específica en el rango nanomolar contra los principales hongos patógenos humanos *Candida albicans* y *Aspergillus spp.*



Figura 7: Se muestra una rodaja de champiñón seca previamente inoculada con J. agaricidamnosum. El área discontinua de la región ampliada muestra en verde la acumulación de moléculas de jagaricina (ion [M + H] + m/z:1181 Da) medido con IMS. A la derecha se muestra la zona del espectro medio donde aparece el pico correspondiente a la jagaricina. Fuente: Modificada de [29]

3.5. Caso de estudio: virulencia de *Pseudomonas tolaasii* y su interacción con otros microorganismos aislados de champiñones

Tal y como demostraron Dr. Scherlach *et al.*, la producción de lipopéptidos tóxicos también es observable durante la infección de *P. tolaasii* a *A. bisporus*.^[19] *P. tolaasii* es una bacteria gram-negativa que provoca una infección bastante grave en los champiñones conocida como enfermedad de la mancha marrón que, además, supone pérdidas económicas severas en el sector alimentario. En esta infección participa un lipodepsipéptido tensioactivo que secreta la bacteria, conocido como tolaasina. La toxicidad de estos lipopéptidos depende de su capacidad para atravesar la membrana celular de los hongos. En su forma cíclica las tolaasinas son anfipáticas, ya que presentan una parte polar correspondiente al anillo de lactona que les permite penetrar en la célula. Una vez en el interior, forman unos agregados de tolaasina para formar poros de membrana.^[30] Esto desestabiliza el metabolismo del organismo al alterar las concentraciones de iones en el citoplasma y puede terminar muriendo.

Gracias a la técnica MALDI, en este estudio se monitorizó la formación de la toxina *in vivo* sobre un champiñón, se demostró que las tolaasinas están presentes *in situ* y se detectó su acumulación en las lesiones características causadas por la bacteria, lo que indica que está relacionada con esta enfermedad.

Curiosamente, algunos estudios como el de Tomita *et al.*^[31] han demostrado que hay ciertas bacterias, como *Microbacterium sp.* K3-5 (K3-5), capaces de linealizar la estructura cíclica de la tolaasina mediante un proceso de hidrólisis en el anillo de lactona. Además, hay bacterias, como *Mycetocola tolaasinivorans (*aislada de *A. bisporus),* que son capaces de desintoxicar tolaasinas y reducir la gravedad de la infección, pero su mecanismo de acción todavía no ha sido descubierto.^[32]

Los estudios descritos en este trabajo sobre jagaricina ^[29] y tolaasina ^[19] fueron realizados por el grupo del Profesor Christian Hertweck del centro alemán Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute (HKI). Este grupo mantiene una colaboración activa con la Dra. María García-Altares para investigar los metabolitos producidos por *P. tolaasii* en cocultivo con *M. tolaasinivorans* utilizando varias técnicas de IMS. Los resultados preliminares de esta investigación en ejecución servirán como caso de estudio en este trabajo final de grado para demostrar el potencial y las limitaciones de las técnicas IMS en el estudio de microorganismos.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La espectrometría de masas de imagen es una técnica útil en microbiología que ofrece información biológica sobre un compuesto al proporcionar su masa molecular y su distribución espacial.

El objetivo principal de este trabajo es corroborar esta hipótesis analizando los resultados obtenidos a partir de un cultivo axénico de *P. tolaasii* y un cocultivo de ésta con *M. tolaasinivorans* mediante MALDI-IMS. También se pretende comparar la técnica MALDI-IMS con SALDI-IMS para explorar las ventajas y limitaciones de ambas técnicas en el ámbito microbiológico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La preparación de las muestras microbiológicas y los datos de MALDI-IMS que se analizan en este trabajo han sido aportados por la doctora en química biomolecular Anna Komor y Ron Hermenau, doctorando en la misma especialidad. Ambos son miembros del Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute (HKI) - Jena - Alemania, Departamento de Biomolecular Chemistry. Los datos de SALDI-IMS fueron adquiridos en el Centro de Ciencias Ómicas (COS) Eurecat-URV.

5.1. Preparación de la muestra MALDI-IMS

En este estudio se utilizaron las cepas *Mycetocola tolaasinivorans* DSM15179 y *Pseudomonas tolaasii* DSM19342, de la colección *Jena Microbial Resource Collection* del instituto HKI. Los cultivos iniciales parten de stocks de glicerol de la colección. Una alícuota de los cultivos iniciales se utilizó para la inoculación de células en suspensión (DO 600 de 0,5) en las placas.

P. tolaasii se inoculó en dos placas independientes: una en condiciones axénicas y otra en cocultivo con *M. tolaasinivorans* directamente sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con óxido de indio y estaño (ITO) para IMS (Bruker Daltonics). Para ello, los portaobjetos (esterilizados mediante autoclave) con ITO se colocaron dentro de placas de Petri y se vertieron 2-3 mL de medio de cultivo Kings B (1,5% agar) para cubrir el portaobjetos con una capa delgada uniforme. Los cultivos se mantuvieron a 25 °C durante 25 h. A continuación, las muestras se secaron durante la noche a 37 °C. Una vez secas, se cubrieron con una solución saturada (20 mg / mL) de matriz MALDI universal (mezcla 1: 1 de ácido 2,5-dihidroxibenzoico y α -ciano-4- ácido hidroxicinámico; Bruker Daltonics) en acetonitrilo / metanol / agua (70: 25: 5, v / v / v), usando el espray automático ImagePrep 2.0 (Bruker Daltonics) según el método descrito por Hoffmann y Dorrestein. ^[33]

5.2. Preparación de la muestra SALDI-IMS

Se utilizó la misma cepa de *P. tolaasii* que en apartado anterior. *P. tolaasii* se cultivó individualmente en *Kings B* durante 25 h a 25 °C. La preparación de la muestra SALDI-IMS se basa en el trabajo realizado por Chen *et al.* ^[18] Para ello, se cortó el área objetivo de la placa de agar y la parte posterior del cultivo se colocó en la parte superior de un sustrato AuBSi, enjuagado con metanol, durante 15 minutos de impresión. Después de retirar la muestra objetivo, el sustrato AuBSi se lavó con agua miliQ antes del análisis IMS.

Los sustratos AuBSi impresos se enviaron del HKI a la URV (Tarragona) a temperatura ambiente para su análisis. El sustrato impreso se fijó en un portaobjetos de acero inoxidable con cinta conductora y se sometió a espectrometría de masas usando un adaptador de portaobjetos Bruker MTP II.

5.3. Obtención de datos mediante MALDI-IMS y SALDI-IMS

Las muestras de MALDI-IMS se analizaron en un UltrafleXtreme MALDI TOF / TOF (Bruker Daltonics) en el instituto HKI; las muestras de SALDI-IMS se analizaron en un equipo del mismo modelo situado en el COS. Ambos tipos de muestra se analizaron en modo reflector positivo. El análisis se realizó en el rango de 700-3000 Da para muestras de MALDI-IMS y el rango de 100-2100 Da para muestras de SALDI-IMS. Se utilizó una intensidad del láser media, acumulando 1000 disparos por píxel. El tamaño de píxel se ajustó a 200 µm (MALDI-IMS) y 300 µm (SALDI-IMS).

El método de adquisición de los datos MALDI-IMS está calibrado por calibración externa con patrones estándares de péptidos (Bruker Daltonics), pero los espectros no están re-calibrados internamente y se espera un error de masa de +/- 1 Da. El método de adquisición y los espectros de SALDI-IMS están calibrados con los picos de los *clusters* de oro (Au₁ hasta Au₅) y se espera un error de masa de +/- 0,2 Da.

5.4. Programas informáticos para el análisis de los datos obtenidos mediante MALDI-IMS y SALDI-IMS

Los datos generados se convirtieron al formato estándar. imzML en flexImaging 4.0. Los datos en formato. imzML se analizaron y visualizaron usando el paquete rMSI del programa R, desarrollado por el grupo MIL@b de la URV.^[34] Las imágenes moleculares se normalizaron mediante TIC (Total Ion Count). La representación de los espectros se realizó con el paquete de R ggplot2. Las figuras y tablas del trabajo han sido diseñadas y/o modificadas con Inskcape.

Para la identificación putativa de los compuestos presentes en el espectro se utilizó el Diccionario de Productos Naturales. Se trata de una base de datos de acceso privado (acceso mediante suscripción del HKI) que incorpora mediante actualizaciones bianuales todos los compuestos reportados en la literatura científica. Se utilizó como base para la identificación una lista de todos los compuestos del diccionario en cuyo campo "*Biological Source*" incluía "*Pseudomonas*".

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de datos

Se realizó un análisis de los datos adquiridos mediante MALDI-IMS para investigar los metabolitos sintetizados por *P. tolaasii* en cultivo axénico y en cocultivo junto con *M. tolaasinivorans*. También se compararon los resultados obtenidos del cultivo de *P. tolaasii* mediante MALDI-IMS con los mediaos mediante SALDI-IMS.

6.1.1. Identificación putativa de metabolitos secretados por *P. tolaasii* en cultivo axénico y en cocultivo con *Mycetocola tolaasinivorans utilizando MALDI-IMS*

En la Figura 8 se pueden observar las fotografías de las muestras preparadas para el proceso MALDI-IMS. Se diferencian dos colonias independientes de *P. tolaasii* (1); y dos colonias en contacto de *P. tolaasii* y *M. tolaasinivorans* (2).



Figura 8. Fotografía de los portaobjetos ITO con las muestras. (1) Corresponde con el cultivo axénico con P. tolaasii. (2) Corresponde con el cocultivo de P. tolaasii con M. tolaasinivorans. Los rectángulos azul y rojo representan el área medida mediante IMS en cada muestra.

A partir de estas muestras, los datos MALDI-IMS se resumen en el espectro medio mostrado en la Figura 9.



Figura 9. Espectro medio en el que se refleja la masa (eje x) e intensidad (eje y) de los diferentes iones detectados por MALDI-IMS en un cultivo axénico de P. tolaasii y un cocultivo de ésta con M. tolaasinivorans.

El espectro medio se midió en un rango de 700-3500 Da. Por tanto, en este trabajo solo se han podido detectar e identificar los compuestos que presentan una masa molecular comprendida entre este rango.

A simple vista, se observaron dos grupos de picos diferentes: uno que abarca el rango comprendido entre 1000-1500 Da y otro entre 2000-2075 Da. Además, se puede apreciar como el espectro correspondiente al cultivo axénico de *P. tolaasii* presentó diferencias significativas en la intensidad respecto al espectro del cocultivo con *M. tolaasinivorans*.

• Rango 2000-2075 Da

Tal y como se muestra en la Figura 10, en este rango se observaron picos de elevada intensidad correspondientes al cocultivo (rojo), aunque también aparecieron picos pertenecientes al cultivo axénico (azul). Esto parece indicar que *P. tolaasii* aumenta la producción de determinados compuestos en presencia de *M. tolaasinivorans*.

Los picos agrupados corresponden con patrones isotópicos de un mismo compuesto por lo que en este rango se diferencian a simple vista al menos 3 *clusters* de iones diferentes.



Figura 10. Rango 2000-2075 Da del espectro medio en el que se refleja la masa (eje x) e intensidad (eje y) de los diferentes iones detectados por MALDI-IMS en un cultivo axénico de P. tolaasii y un cocultivo de ésta con M. tolaasinivorans.

Tras consultar en el Diccionario de Productos Naturales los posibles compuestos producidos por *P. tolaasii* y/o *M. tolaasinivorans* que puedan coincidir con la masa molecular de estos picos, todo apunta a que se trata de tolaasina. Tal y como se ha comentado en en apartado de la introducción, *P. tolaasii* destaca por la biosíntesis de tolaasina, un compuesto patógeno para muchas especies de hongos. Por tanto, es muy posible que este metabolito haya sido detectado por MALDI-IMS.



Figura 11. Estructura de las tolaasinas I, II, A, B, C, D y E. Fuente: Modificado de [35]

La tolaasina es un lipodepsipéptido tensioactivo que consta de 18 aminoácidos y una cadena de ácido beta-hidroxi-octanoico en el extremo N-terminal.^[30] Se han descubierto 7 análogos de la tolaasina,^[35] representados en la Figura 11 y descritos en la Tabla 1.

El peso molecular de cada tolaasina se muestra en la Tabla 1. Como se ha descrito, IMS se basa en la ionización de los compuestos de una muestra, por lo que lo más probable será encontrar la tolaasina formando aductos con otras moléculas, frecuentemente sodio (Na) y potasio (K). Esto se debe, fundamentalmente, a la presencia de sales en el medio de cultivo.

	FORMA CÍCLICA			FORMA LINEAL		
	M (Da)	M+Na (Da)	M+K (Da)	M (Da)	M+Na (Da)	M+K (Da)
Tolaasin I	1986,2	2009,2	2025,3	2004,2	2027,2	2043,3
Tolaasin II	1942,2	1965,2	1981,3	1960,2	1983,2	1999,3
Tolaasin A	1958,1	1981,1	1997,2	1976,1	1999,1	2015,2
Tolaasin B	1972,2	1995,2	2011,3	1990,2	2013,2	2029,3
Tolaasin C				2004,2	2027,2	2043,3
Tolaasin D	1986,2	2009,2	2025,3	2004,2	2027,2	2043,3
Tolaasin E	1942,2	1965,2	1981,3	1960,2	1983,2	1999,3

Tabla 1. Masas moleculares de las tolaasinas medidades en Daltons en su forma neutra o formando aductos con iones de Na⁺ o K⁺.

El espectro presentó un pico que corresponde a un compuesto de masa molecular 2008,94 +/- 0,2786 Da (donde +/- 0,2786 Da corresponde al ancho del pico) (Figura 12). Teniendo en cuenta el margen de error de masa +/- 1 Da, este pico podría indicar la presencia de tolaasina I o de tolaasina D formando un aducto con el ión Na⁺. Puesto que ambas presentan el mismo peso molecular, no pueden diferenciarse por IMS.

Esto supone una limitación en IMS, ya que hay compuestos que son isómeros, es decir, presentan la misma masa molecular y, por tanto, para diferenciarlos hay que recurrir a otras técnicas de determinación estructural.

Se va a suponer que es tolaasina I ya que esta forma es el derivado principal de *P. tolaasii*.^[30]



Figura 12. Imagen MALDI-IMS del compuesto [M+Na]+ m/z: 2008.9400 +/- 0.2786 Da detectado en un cultivo axénico de P. tolaasii (1) y un cocultivo con M. tolaasinivorans (2). A la derecha se muestran los picos correspondientes al compuesto en el cultivo axénico (azul) y en el cocultivo (rojo).

Como se puede observar en la Figura 12, *P. tolaasii* secretó tolaasina I cíclica tanto en cultivo axénico como en cocultivo con *M. tolaasinivorans*. Sin embargo, los picos correspondientes a tolaasina I representados en la Figura 12 mostraron una intensidad mucho mayor de tolaasina I en el cocultivo (espectro rojo). Se cree que *P. tolaasii* incrementa la producción de tolaasina I como respuesta de defensa ante *M. tolaasinivorans*, demostrando su actividad antimicrobiana. La imagen MALDI-IMS corrobora esta teoría ya que la tolaasina I, aunque se distribuye por toda la colonia, está más concentrada (color naranja-rojo) en el borde de la colonia opuesto a la zona de interacción. Esto sugiere que *M. tolaasinivorans* podría estar inhibiendo de alguna forma este compuesto. En el cultivo axénico tan solo se localizó en los bordes de las colonias.

Analizando el espectro medio se detectó un compuesto que parece secretarse en la zona de contacto entre *P. tolaasii* y *M. tolaasinivorans* (Figura 13). El pico del espectro correspondiente a esta molécula presentó una mayor intensidad en cocultivo. El metabolito en cuestión presentó una masa molecular de 2027,3187 Da. Justamente, esta masa molecular se diferencia en 18 Da con el aducto formado por la tolaasina I cíclica junto con el ión Na⁺.



Figura 13. Imagen MALDI-IMS del compuesto [M+Na]+ m/z: 2027,3187+/- 0.100 Da detectado en un cultivo axénico de P. tolaasii (1) y un cocultivo con M. tolaasinivorans (2). A la derecha se muestran los picos correspondientes al compuesto en el cultivo axénico (azul) y en el cocultivo (rojo).

Todo apunta a que se trata de tolaasina I linealizada, o lo que es lo mismo, tolaasina C. *P. tolaasii* es capaz de sintetizar de forma natural la tolaasina C en cultivo axénico.^[36] Sin embargo, llama la antención que, a diferencia del caso anterior, el compuesto en cocultivo se concentró en la zona de interacción con *M. tolaasinivorans* cuando, en principio, la tolaasina C no es tóxica para las bacterias.

Tal y como se ha comentado en el apartado 3.5 de la introducción, la estructura cíclica de la tolaasina es crítica para interaccionar con la célula objetivo, por lo que la linealización supone la pérdida de la toxicidad de este lipodepsipéptido. Esto coincidiría con la ganancia de una molécula de H₂O por parte de la tolaasina. Además, se sabe que *M. tolaasinivorans* es capaz de desintoxicar tolaasinas.^[32] Por lo tanto, una posibilidad es que *M. tolaasinivorans* linealice la molécula mediante hidrólisis de la lactona presente en la tolaasina l.

De hecho, esta idea ya fue corroborada por Hoefler *et al.*^[37] al detectar mediante IMS una adición de 18 unidades de masa en la surfactina (un lipopéptido cíclico producido por *B. subtilis*) cuando se producía la hidrólisis de este compuesto por parte de *Streptomyces sp.* En su estudio también se detectó el compuesto linealizado en el agar proximal a *Streptomyces sp,* ya que esta bacteria estaba linealizando la lactona del compuesto como mecanismo de defensa contra la surfactina (la cuál inhibe la formación de las hifas aéreas en *Streptomyces*). Esto evidencia que hay bacterias capaces de linealizar algunos lipopéptidos cíclicos.

Si esto es así en el caso de *M. tolaasinivorans*, esta bacteria podría ser una solución para frenar la enfermedad de la mancha marrón causada por la tolaasina, lo que evitaría grandes pérdidas en el sector agroalimentario.

Una ventaja de *M. tolaasinivorans* es que se aisló e identificó directamente de los champiñones,^[32] lo que indica que éstos presentaban una microbiota protectora de forma natural. Esto potencia la aplicación de estas bacterias en la agricultura ya que la bacteria no parece causar problemas de seguridad. Lamentablemente, apenas hay información sobre este microorganismo, por lo que hacen falta más estudios que confirmen su potencial y que es inocua para la salud y el medio ambiente.

Además, si la presencia de *M. tolaasinivorans* linealizó este lipodepsipéptido, significa que muchas de las moléculas de tolaasina secretadas ya habrían sido hidrolizadas. Esto hace que el resultado obtenido en la Figura 12 no se corresponda con la cantidad real de tolaasina I que sintetizó *P. tolaasii* en cocultivo y explica que la tolaasina I cíclica esté más concentrada en el margen de *P. tolaasii* opuesto a *M. tolaasinivorans*.

No se detectaron picos que se correspondan con otros análogos de tolaasina (tolaasina II, A, B y E). Es de esperar, ya que la producción de distintos análogos normalmente depende de la cepa y el medio de cultivo donde se encuentren.^[36]

• Rango 1000-1500 Da

En este rango (Figura 14), a diferencia del caso anterior, *P. tolaasii* parece sintetizar algunos compuestos de manera abundante en ambos cultivos (axénico y cocultivo), ya que la intensidad de los picos es elevada. Sin embargo, se observó que algunos metabolitos no estaban presentes en ambos espectros, lo que indica que hay compuestos cuya síntesis se activa o se inhibe en presencia de *M. tolaasinivorans*.

Además, en el espectro medio, al igual que en el caso anterior, había una distancia de 16 Da entre los primeros picos de cada patrón isotópico. Esto seguramente se deba a la presencia de distintos aductos (Na⁺ con una masa molecular de 23,0 Da y K⁺ con una masa molecular de 39,1 Da) de un mismo compuesto.



Figura 14. Rango 1000-1500 Da del espectro medio en el que se refleja la masa (eje x) e intensidad (eje y) de los diferentes compuestos detectados por MALDI-IMS en un cultivo axénico de P. tolaasii y un cocultivo de ésta con M. tolaasinivorans.

Durante el análisis de esta región, se detectaron patrones isotópicos que coinciden en masa molecular (Tabla 2) con la pseudodesmina A, un compuesto producido por *P. tolaasii* cuando ésta última forma aductos con Na⁺ y K⁺.

 Tabla 2. Masa molecular de la pseudodesmina A en forma cíclica.

	FORMA CÍCLICA					
	M (Da)	M+Na (Da)	M+K (Da)			
Pseudodesmina A	1124,7	1147,7	1163,8			



Figura 15. Estructura química de la pseudodesmina A. Fuente: Modificado de [38]

La pseudodesmina, tal como se muestra en la Figura 15, es un lipodepsipéptido cíclico sintetizado como metabolito secundario por *Pseudomonas spp.*, entre otras bacterias, por lo que es muy probable que *P. tolaasii* esté sintetizando este compuesto.



Figura 16. Imagen MALDI-IMS del compuesto [M+K]+ m/z: 1164,4123+/- 0.2786 Da detectado en un cultivo axénico de P. tolaasii (1) y un cocultivo con M. tolaasinivorans (2). A la derecha se muestran los picos correspondientes al compuesto en el cultivo axénico (azul) y en el cocultivo (rojo).

En la imagen MALDI-IMS (Figura 16) se observa que el compuesto fue secretado en abundancia por *P. tolaassi* en cultivo axénico. Esto indica que la molécula es sintetizada independientemente de la presencia o ausencia de organismos competidores. No es sorprendente ya que, generalmente, los lipopéptidos cíclicos realizan múltiples funciones biológicas. Además de aportar una ventaja competitiva en las interacciones con otros microorganismos, mejoran la motilidad y participan en la formación y desarrollo de biopelículas, entre otras funciones.^[39]

En cocultivo con *M. tolaasinivorans*, el lipodepsipéptido se concentró en la zona de contacto entre ambas bacterias. Esto potencia la teoría de que el compuesto corresponde con la pseudodesmina, ya que ésta presenta actividad bactericida contra algunas bacterias gram-positivas.^[38] Por tanto, podría ser que *P. tolaasii* utilice la pseudodesmina A para protegerse contra *M. tolaasinivorans*, confirmando la actividad antimicrobiana de este compuesto contra bacterias gram-positivas.

El espectro no mostró la presencia de pseudodesmina linealizada ni en cultivo axénico ni en cocultivo, lo que indica que *M. tolaasinivorans* no es capaz de hidrolizar este lipodepsipéptido.

Volviendo al espectro medio, se detectó una pareja de picos bastante interesante a 16 Da de distancia entre ellos. Se infiere de los resultados que el compuesto en cuestión, que presenta una masa molecular de 1080 Da, está presente en el espectro formando aductos con Na⁺ y con K⁺ (con una masa molecular de 1102,97 y 1118,97) respectivamente).



Figura 17. Imagen MALDI-IMS de un compuesto [M+Na]+ m/z: 1102,97 +/- 0.2786 Da en un cultivo axénico de P. tolaasii (1) y un cocultivo con M. tolaasinivorans (2). A la derecha se muestran los picos correspondientes al compuesto en el cultivo axénico (azul) y en el cocultivo (rojo).

Como se puede observar en la Figura 17, el compuesto se localizó por toda la colonia de P.tolaasii en cocultivo de forma intensa salvo en la zona de contacto con *M. tolaasinivorans*. Además, en cultivo axénico tan solo apareció en los alrededores de las colonias y de forma poco significativa. Por tanto, parece tratarse de un compuesto que *P. tolaasii* produjo como respuesta a *M. tolaasinivorans* pero que se inhibe justo en la zona de interacción, o bien fue modificado por *M. tolaasinivorans* al igual que ocurrió con la tolaasina l.

Este compuesto no coincide con la masa molecular de ningún compuesto presente en la base de datos del diccionario de productos naturales reportados para *Pseudomonas spp.*, por lo que lo más probable es que no se haya investigado todavía. MALDI-IMS es muy útil para descubrir nuevos compuestos o nuevos análogos, ya que en el espectro aparecen todos los metabolitos que es capaz de detectar en la muestra. De momento, gracias a esta técnica solo se sabe que hay un compuesto de masa molecular 1080 Da (+/- un error de aproximadamente 1 Da) secretado por *P. tolaasii.*

Debido a su masa molecular y al tipo de metabolitos que suele producir *P. tolaasii*, se sospecha que el compuesto es de naturaleza peptídica. Analizando las posibles

identidades, se cree que este pico podría corresponder con un tipo de sideróforo, una pioverdina, ya que presenta una masa molecular muy similar a las pioverdinas producidas por *Pseudomonas spp*. Además, el medio de cultivo *Kings B* se utiliza para detectar de la presencia de pioverdinas en distintas especies de *Pseudomonas,* por lo que su composición favorece la síntesis de este compuesto . Las pioverdinas son sideróforos fluorescentes que favorecen el crecimiento de sus microorganismos productores en condiciones limitantes de hierro.^[40] Para confirmar que se trata de pioverdina se podría hacer una fluorimetría a la muestra ya que la presencia de este compuesto emite fluorescencia.

Otra hipótesis que no se descarta es que el compuesto corresponda con una modificación de la pseudodesmina. Analizando ambas imágenes (Figuras 15 y 16), se observó que la distribución del cocultivo es complementaria a la del compuesto desconocido. Para corroborar que los píxeles de ambos compuestos no coinciden, se representaron los aductos formados por pseudodesmina con K⁺ y el compuesto desconocido con K⁺ en una misma imagen (Figura 18).



Figura 18. Imagen MALDI-IMS donde se representa la localización e intensidad de dos compuestos diferentes superpuestos. Por un lado, el compuesto [M+K]+ m/z: 1164,4123+/-0.2786 Da (rojo) y por otro, un compuesto [M+K]+ m/z: 1118,97+/- 0.2786 Da (verde) en un cultivo axénico de P. tolaasii (1) y un cocultivo con M. tolaasinivorans (2).

La imagen MALDI-IMS confirmó que en cocultivo ambos compuestos no se solapan, sino que son complementarios. Esto suele indicar la conversión de un compuesto en otro.

Para poder afirmar que se trata de una pioverdina o en cambio, demostrar que el compuesto está relacionado con la pseudodesmina deberían realizarse experimentos complementarios (se describirán en el apartado 7).

6.1.2. Comparación de los datos obtenidos de un cultivo de *P. tolaasii* mediante MALDI-IMS y SALDI-IMS

En la Figura 19 se observan distintas fotografías de la muestra durante el proceso de impresión (izquierda) o ya preparada para el proceso SALDI-IMS (derecha).



Figura 19. Fotografías del sustrato AuBSi con la muestra del cultivo axénico de P. tolaasii impresa. En las fotografías de la izquierda se puede observar el trozo de agar con P. tolaasii sobre el sustrato durante el tiempo de impresión. En la derecha se observa la muestra ya impresa preparada para su introducción en UltrafleXtreme MALDI TOF / TOF. El rectángulo verde representa el área medida de la muestra.

Los espectros medios obtenidos a partir de los datos MALDI-IMS (en azul) y SALDI-IMS (en verde), ambos representados en la Figura 20, mostraron claras diferencias entre ellos.



Figura 20. Espectros medios en los que se refleja la masa (eje x) e intensidad (eje y) de los diferentes iones detectados en un cultivo axénico de P. tolaasii. El espectro de arriba se analiza

mediante la técnica SALDI-IMS con un sustrato AuBSi mientras que el de abajo ha sido obtenido a partir de MALDI-IMS aplicando una matriz conductora.

El espectro obtenido mediante SALDI-IMS concentró la mayor parte de los picos detectados en el rango 100-270 Da mientras que con MALDI-IMS esa zona ni siquiera fue medida ya que suele presentar un gran ruido de fondo debido a los componentes de la matriz. Sin embargo, SALDI-IMS permitió analizar los compuestos detectados de baja masa molecular con menor ruido de fondo, aunque este método no está libre de compuestos externos, ya que siguen apareciendo los picos pertenecientes a los compuestos que forman el medio de cultivo.

De todos modos, comparando el rango medido que coincide en ambos experimentos, MALDI-IMS detectó muchos más compuestos que SALDI-IMS. Sin embargo, esto no es significativo ya que, aunque se trata de la misma cepa, los espectros se obtienen de dos cultivos diferentes donde ha podido influir cualquier cambio en las condiciones de cultivo o el método de impresión. Tal y como se indica en el apartado 5.2 de materiales y métodos, en SALDI-IMS la muestra se imprimió por la parte de debajo de cultivo de agar, por lo que no se mide directamente la muestra, sino los metabolitos secretados por la bacteria al agar.

Además, al tratarse de experimentos medidos en dos equipos diferentes tampoco se puede tener en cuenta la intensidad de los picos, ya que esto varía en función del equipo.

Se sabe que distintas especies de *Pseudomonas spp.* producen y secretan una amplia gama de metabolitos de moléculas pequeñas, por lo que el método SALDI-IMS resultaría óptimo para su análisis de estas bacterias.

En el análisis del espectro SALDI-IMS se detectaron distintos compuestos. Aparecieron dos picos con una masa molecular de 182.9130 y 198.8875 Da que seguramente sean aductos de un mismo compuesto con Na⁺ y K⁺ respectivamente. Tras investigar los productos naturales producidos por *Pseudomonas*, el pico podría corresponder con un herbicida natural sintetizado por diversas bacterias de *Pseudomonas* presentes en la rizosfera, la 4-formylaminooxyvinylglycina.^[41]

También se detectó un compuesto de masa molecular 140.9015 Da, representado en la Figura 21. Además, apareció otro pico con 16 Da de diferencia por lo que seguramente se trate de un mismo compuesto formando aductos con Na⁺ y K⁺.



Figura 21. Imagen SALDI-IMS de un compuesto [M+Na]+ m/z: 140,9015 +/- 0.1978 Da detectado en un cultivo axénico de P. tolaasii. A la derecha se muestra el pico correspondiente al compuesto en el cultivo axénico (verde).

Este compuesto aparece en las proximidades de la colonia debido en parte al método utilizado para imprimir la muestra. Esto es una limitación, ya que se detectan los compuestos secretados, pero no su localización exacta que sí se vio mediante MALDI-IMS.

Tras consultar las posibles identidades de esta molécula se cree que pertenece al aducto formado por el ácido succínico con el Na⁺. El ácido succínico es un intermediario metabólico que casualmente participa en la biosíntesis de las pioverdinas.^[40] La presencia de este ácido reforzaría la hipótesis de que el compuesto desconocido con masa molecular 1119,07 Da corresponde con la pioverdina. Estos resultados demuestran que las técnicas MALDI-IMS y SALDI-IMS ofrecen resultados complementarios muy útiles para generar hipótesis más sólidas.

En el espectro (Figura 20) también se observaron a simple vista grupos de picos alrededor de los 1150 Da. Destacaron dos picos con masa molecular de 1147,62 Da y 1163,57 Da (Figura 22). De nuevo la diferencia es de unos 16 Da, por lo que seguramente se trate del mismo compuesto formando aductos con Na⁺ y K⁺.



Figura 22. Imagen SALDI-IMS de un compuesto [M+K]+ m/z: 1163,57 +/- 0.1978 Da detectado en un cultivo axénico de P. tolaasii. A la derecha se muestra el pico correspondiente al compuesto en el cultivo axénico (verde).

La masa molecular de este compuesto es muy similar a la de la pseudodesmina A, ya detectada previamente en el experimento con MALDI-IMS (Figura 16). SALDI-IMS potencia la idea de que se trata de la pseudodesmina A, ya que el pico detectado en el espectro se acerca todavía más al peso molecular real de esta molécula (Tabla 2). SALDI-IMS presenta un menor error de masas debido, seguramente, a la calibración del aparato a partir de los picos de oro derivados del sustrato AuBSi creado por MIL@b.

A simple vista, el espectro obtenido mediante SALDI-IMS no indicó la presencia de metabolitos en el rango 2000-2075 Da. Al ampliar el espectro, se observaron unos picos correspondientes a la masa molecular de la tolaasina que destacaban mínimamente del ruido de fondo (Figura 23). La imagen iónica no es muy informativa, al ser la intensidad de los picos demasiado cercana a la línea base.



Figura 23. Espectro medio en el que se refleja la masa (eje x) e intensidad (eje y) de los iones detectados en el rango 2006-2030 Da en un cultivo axénico de P. tolaasii. El espectro se analiza

mediante la técnica SALDI-IMS con un sustrato AuBSi.

Este resultado es bastante desconcertante, ya que si algo caracteriza a *P. tolaasii* es su capacidad de sintetizar tolaasinas. El método de impresión utilizado en el experimento puede tener algo que ver, ya que solo se pueden detectar los metabolitos depositados en el fondo de la placa de cultivo. También hay que tener en cuenta que la bacteria fue cultivada en axénico y en estas condiciones no produce tanta tolaasina como cuando necesita defenderse de un competidor. Además, todos los compuestos detectados en el espectro SALDI-IMS presentaron una intensidad muy baja. Si se compara con la pseudodesmina, en el espectro obtenido mediante MALDI-IMS (Figura 14) a partir del cultivo de *P. tolaasii* en axénico se ve una gran diferencia en la detección de pseudodesmina respecto a tolaassina.

Por lo tanto, se deduce que la tolaasina probablemente sí que fue sintetizada por *P. tolaasii*, pero en este caso el método de impresión no fue el más adecuado. Mejorar el proceso de *imprinting* puede ser interesante de cara a futuras aplicaciones.

7. CONCLUSIÓN

En este trabajo se demuestra que MALDI-IMS ofrece información biológica de gran valor sobre muestras microbiológicas. Esta técnica no solo indica la masa molecular de un compuesto, sino que también representa la dimensión espacial que éste ocupa en una muestra. Esto supone una gran ventaja ya que, tal y como se ha mostrado en los distintos ejemplos de las aplicaciones y en el cocultivo analizado, gracias a las imágenes MALDI-IMS se pueden generar hipótesis que ayuden a declinarse por la identidad final de un compuesto. Además, la imagen iónica permite observar a simple vista qué microorganismo está sintetizando el compuesto o cuál lo está modificando. Esto se ejemplifica claramente en los resultados de este trabajo, ya que se pueden observar los compuestos que sintetiza *P. tolaasii* dentro y alrededor de las colonias y cómo algunos de estos compuestos son inhibidos o regulados positivamente en la zona de contacto cuando la bacteria interacciona con un competidor. Por lo tanto, la distribución espacial de un metabolito microbiano en su contexto biológico puede ofrecer información relevante sobre la función de un compuesto y su regulación.

Otra de las ventajas de MALDI-IMS es que genera un espectro con todos los compuestos que ha sido capaz de detectar dentro de un rango de pesos moleculares determinados, sin necesidad de conocer previamente el tipo de metabolito que se quiere

analizar y sin realizar la extracción de los metabolitos. Esto se puede observar en el análisis realizado en este trabajo, ya que se detectó un compuesto sintetizado por *P. tolaasii* no identificado hasta la fecha (un compuesto desconocido o una modificación de un compuesto conocido). Esta ventaja tiene especial relevancia cuando se trabaja con muestras desconocidas ya que se trata de una técnica no dirigida que puede conducir al descubrimiento de nuevas moléculas.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los compuestos representados en el espectro corresponden a metabolitos secretados al exterior o a componentes externos de la pared celular en el caso de bacterias. MALDI-IMS, normalmente, no permite observar el interior celular ya que habría que aumentar la potencia del láser a un nivel en el que las células se verían muy dañadas e incluso podrían perder su conformación. Además, esta técnica todavía no puede utilizarse a nivel de célula ya que el tamaño del láser y el píxel mínimo que puede ser medido es más grande que las células. Otra desventaja es que la medición MALDI-IMS en la práctica está limitada en un rango de 50-4000 Da por lo que solo se podrán observar moléculas cuya masa molecular este comprendida entre estos valores. Esto impide detectar compuestos más pesados de gran interés, como la mayoría de las proteínas.

Durante el análisis de los resultados de este trabajo se observó que, aunque a simple vista parezca que el espectro contiene mucha información, solo se acaban identificando un porcentaje muy pequeño de compuestos. Esto se debe a que muchos de los picos corresponden a isótopos de un solo compuesto, además de los picos detectados de los aductos que forme este compuesto con otras moléculas. Asimismo, este único compuesto también puede haber sido fragmentado durante el proceso y lo que en realidad se observa son distintos picos derivados de él. Es decir, un solo compuesto puede estar representado por muchos picos en el espectro de masas.

La principal limitación de cualquier técnica de espectrometría de masas es que hay muchas moléculas que presentan pesos moleculares idénticos o muy similares que pueden corresponder con los compuestos detectados. Es el caso de la tolaasina I y la tolaasina D, que son isómeros estructurales. Para poder corroborar la identidad y estructura de un compuesto es necesario utilizar técnicas complementarias.

En el caso de IMS, las técnicas complementarias para corroborar la identidad de un compuesto normalmente incluyen la realización de extractos líquidos de una placa del cultivo (o cocultivo) y el análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Esto permite determinar la masa exacta del compuesto desconocido con el menor error posible para poder asignarle una fórmula

molecular. Además, se podría fragmentar el ion precursor del compuesto de interés mediante masas/masas para tener más información de su estructura. Finalmente, si fuese necesario, se realizaría un cultivo a gran escala para aislar el compuesto y analizarlo por resonancia magnética nuclear, lo que permite elucidar la estructura de un compuesto aislado. Esta aproximación es la que siguieron investigaciones similares para describir la estructura de compuestos nuevos descubiertos por IMS, como es el caso de la jagaricina ^[29] y es compatible con otras nuevas aproximaciones basadas en metabolómica y bioinformática.^[42]

Otro de los inconvenientes de MALDI-IMS es el uso de la matriz orgánica, aunque este problema puede ser solventado utilizando SALDI-IMS. Como muestran los resultados de este trabajo, SALDI-IMS permite analizar los compuestos de bajo peso molecular con menor ruido de fondo. SALDI-IMS podría ser otra de las técnicas complementarias a MALDI-IMS ya que aporta información que puede ser muy útil para corroborar la hipótesis generada por MALDI. En concreto, el sustrato AuBSi ha demostrado ser muy eficaz en técnicas SALDI-IMS, permitiendo calibrar el espectro con un margen de error mucho menor gracias a sus nanopartículas de oro.

Ambas técnicas, MALDI y SALDI-IMS presentan un futuro prometedor en el sector microbiológico, aunque se debe seguir investigando para solventar sus limitaciones.

Además, este trabajo abre camino a una futura investigación sobre el mecanismo de detoxificación de la tolaasina por parte de *M. tolaasinivorans*. Utilizando IMS y otras técnicas complementarias se podrían llegar a identificar enzimas que puedan estar implicadas en este proceso. De hecho, en el estudio ya citado de Hoefler *et al.*^[37] consiguieron identificar la enzima responsable de hidrolizar la surfactina y conferir resistencia a la inhibición del crecimiento de las hifas aéreas. Esto demuestra que IMS es capaz de detectar modificaciones del metabolito natural durante la competencia entre microorganismos, lo que puede guiar la búsqueda de nuevas enzimas. Replicando este estudio en un cocultivo de *P. tolaasii* con *M. tolaasinivorans* se podría llegar a descubrir alguna enzima implicada en el proceso de detoxificación que sirva para controlar la enfermedad causada en los cultivos de champiñón.

Actualmente, todavía quedan muchas preguntas críticas sobre la interacción de los microbios en sus entornos nativos. Cada vez es más importante investigar los microorganismos como parte de una comunidad y no cómo organismos aislados en un laboratorio. Las técnicas de *imaging* ayudan a comprender mejor la complejidad real de los sistemas microbianos y, por tanto, serán imprescindibles en un futuro cercano.

8. BIBLIOGRAFÍA

[1] Cornett DS, Reyzer ML, Chaurand P, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry: Molecular snapshots of biochemical systems. Nat Methods. 2007;4(10):828–33.

[2] Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, John Langley G, Li L, Naito Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). Pure Appl Chem. 2013.

[3] Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiology Reviews. 2012.

[4] Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology. 2015.

[5] Yang JY, Phelan V V., Simkovsky R, Watrous JD, Trial RM, Fleming TC, et al. Primer on Agar-Based Microbial Imaging Mass Spectrometry. Journal of Bacteriology. 2012.

[6] Chiang CK, Chen WT, Chang HT. Nanoparticle-based mass spectrometry for the analysis of biomolecules. Chemical Society Reviews. 2011.

[7] Hankin JA, Barkley RM, Murphy RC. Sublimation as a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging. J Am Soc Mass Spectrom. 2007.

[8] Ràfols P, Vilalta D, Torres S, Calavia R, Heijs B, McDonnell LA, et al. Assessing the potential of sputtered gold nanolayers in mass spectrometry imaging for metabolomics applications. PLoS One. 2018.

[9] Law KP, Larkin JR. Recent advances in SALDI-MS techniques and their chemical and bioanalytical applications. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011.

[10] Thomas JJ, Shen Z, Crowell JE, Finn MG, Siuzdak G. Desorption/ionization on silicon (DIOS): A diverse mass spectrometry platform for protein characterization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(9):4932–7.

[11] Northen TR, Yanes O, Northen MT, Marrinucci D, Uritboonthai W, Apon J, et al. Clathrate nanostructures for mass spectrometry. Nature. 2007.

[12] Iakab SA, Ràfols P, Tajes M, Correig-Blanchar X, García-Altares M. Gold Nanoparticle-Assisted Black Silicon Substrates for Mass Spectrometry Imaging Applications. ACS Nano. 2020.

[13] Iakab SA, Rafols P, García-Altares M, Yanes O, Correig X. Silicon-Based Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry for the Analysis of Biomolecules: A Progress Report. Adv Funct Mater. 2019;29(45):1–18.

[14] Gao J, De Raad M, Bowen BP, Zuckermann RN, Northen TR. Application of Black Silicon for Nanostructure-Initiator Mass Spectrometry. Anal Chem. 2016.

[15] Guinan T, Della Vedova C, Kobus H, Voelcker NH. Mass spectrometry imaging of fingerprint sweat on nanostructured silicon. Chem Commun. 2015.

[16] Jurchen JC, Rubakhin SS, Sweedler J V. MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam. J Am Soc Mass Spectrom. 2005.

[17] Garrett TJ, Prieto-Conaway MC, Kovtoun V, Bui H, Izgarian N, Stafford G, et al. Imaging of small molecules in tissue sections with a new intermediate-pressure MALDI linear ion trap mass spectrometer. Int J Mass Spectrom. 2007.

[18] Chen PY, Hsieh CY, Shih CJ, Lin YJ, Tsao CW, Yang YL. Exploration of Fungal Metabolic Interactions Using Imaging Mass Spectrometry on Nanostructured Silicon. J Nat Prod. 2018.

[19] Scherlach K, Lackner G, Graupner K, Pidot S, Bretschneider T, Hertweck C. Biosynthesis and mass spectrometric imaging of tolaasin, the virulence factor of brown blotch mushroom disease. ChemBioChem. 2013.

[20] Seeley EH, Caprioli RM. MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: Method challenges and clinical perspectives. Trends in Biotechnology. 2011.

[21] Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Journal of Food and Drug Analysis. 2019.

[22] Gonzalez DJ, Haste NM, Hollands A, Fleming TC, Hamby M, Pogliano K, et al. Microbial competition between Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus monitored by imaging mass spectrometry. Microbiology. 2011.

[23] Stasulli NM, Shank EA. Profiling the metabolic signals involved in chemical communication between microbes using imaging mass spectrometry. FEMS Microbiology Reviews. 2016.

[24] Bleich R, Watrous JD, Dorrestein PC, Bowers AA, Shank EA. Thiopeptide antibiotics stimulate biofilm formation in Bacillus subtilis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015.

[25] Boya CA, Fernández-Marín H, Mejiá LC, Spadafora C, Dorrestein PC, Gutiérrez M. Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. Sci Rep. 2017;7(1):1–13.

[26] Hamm G, Carré V, Poutaraud A, Maunit B, Frache G, Merdinoglu D, et al. Determination and imaging of metabolites from Vitis vinifera leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2010.

[27] Becker L, Carré V, Poutaraud A, Merdinoglu D, Chaimbault P. MALDI mass spectrometry imaging for the simultaneous location of resveratrol, pterostilbene and viniferins on grapevine leaves. Molecules. 2014.

[28] Becker L, Bellow S, Carré V, Latouche G, Poutaraud A, Merdinoglu D, et al. Correlative Analysis of Fluorescent Phytoalexins by Mass Spectrometry Imaging and Fluorescence Microscopy in Grapevine Leaves. Anal Chem. 2017.

[29] Graupner K, Scherlach K, Bretschneider T, Lackner G, Roth M, Gross H, et al. Imaging mass spectrometry and genome mining reveal highly antifungal virulence factor of mushroom soft rot pathogen. Angew Chemie - Int Ed. 2012.

[30] Cho KH, Kim ST, Kim YK. Purification of a pore-forming peptide toxin, tolaasin, produced by Pseudomonas tolaasii 6264. J Biochem Mol Biol. 2007.

[31] Tomita S, Sue M, Kajikawa A, Igimi S, Shinohara H, Yokota K. Detoxification process of tolaasins, lipodepsipeptides, by Microbacterium sp. K3-5. Biosci Biotechnol Biochem. 2018.

[32] Tsukamoto T, Murata H, Shirata A. Identification of Non-Pseudomonad Bacteria from Fruit Bodies of Wild Agaricales Fungi That Detoxify Tolaasin Produced by Pseudomona. Biosci Biotechnol Biochem. 2002.

[33] Hoffmann T, Dorrestein PC. Homogeneous Matrix Deposition on Dried Agar for MALDI Imaging Mass Spectrometry of Microbial Cultures. J Am Soc Mass Spectrom. 2015.

[34] Ràfols P, Torres S, Ramírez N, Del Castillo E, Yanes O, Brezmes J, et al. RMSI: An R package for MS imaging data handling and visualization. Bioinformatics. 2017.

[35] Bassarello C, Lazzaroni S, Bifulco G, Lo Cantore P, Iacobellis NS, Riccio R, et al. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by Pseudomonas tolaasii. J Nat Prod. 2004.

[36] VanderMolen KM, Raja HA, El-Elimat T, Oberlies NH. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. AMB Express. 2013.

[37] Hoefler BC, Gorzelnik K V., Yang JY, Hendricks N, Dorrestein PC, Straight PD. Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;

[38] Sinnaeve D, Michaux C, Van hemel J, Vandenkerckhove J, Peys E, Borremans FAM, et al. Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from Pseudomonas bacteria. Tetrahedron. 2009.

[39] Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: More than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiology Reviews. 2010.

[40] Ringel MT, Brüser T. The biosynthesis of pyoverdines. Microbial Cell. 2018.

[41] McPhail KL, Armstrong DJ, Azevedo MD, Banowetz GM, Mills DI. 4formylaminooxyvinylglycine, an herbicidal germination-arrest factor from Pseudomonas rhizosphere bacteria. J Nat Prod. 2010.

[42] Johnson SR, Lange BM. Open-access metabolomics databases for natural product research: Present capabilities and future potential. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2015.

9. AUTOEVALUACIÓN

El primer día que me reuní con el grupo de investigación MIL@b me explicaron en qué consistía la técnica con la que trabajan y me mostraron algunos de sus resultados. Me llamó mucho la atención como combinaban la microbiología con la química analítica y la bioinformática. Esto me pareció una gran oportunidad para poder conocer tres potentes ramas de investigación a partir de una sola técnica.

Meses después puedo confirmar que no me equivoqué. Este trabajo me ha permitido no solo poner en práctica los conocimientos adquiridos en diversas asignaturas a lo largo de la carrera, sino ampliarlos.

Durante mi estancia en prácticas, pude colaborar en algunos de los proyectos en los que estaba trabajando MIL@b. Esto me permitió aprender a preparar las muestras biológicas y a tener las primeras tomas de contacto con el equipo MALDI-IMS. Incluso pude ver como sintetizaban el sustrato AuBSi mediante pulverización catódica.

En un principio, mi trabajo final de grado estaba organizado para realizar por mí misma una serie de experimentos con levaduras y analizar los resultados obtenidos. De hecho, llegué a preparar los cultivos para medirlos en MALDI-IMS días antes de decretarse el estado de alarma. Esto me ayudó a adquirir más experiencia en el laboratorio de microbiología, dónde aprendí como preparar los medios de cultivo, a sembrar las levaduras y a trabajar en condiciones de esterilidad.

Finalmente, dadas las circunstancias de los últimos meses, opté por continuar el trabajo de forma online. La búsqueda de información para comprender la técnica me ha permitido asentar muchos de los conceptos químicos que he ido adquiriendo durante la carrera. También he podido utilizar lo aprendido en la asignatura de bioinformática para el análisis de los espectros iónicos mediante bases de datos y programas informáticos.

Creo que una de las principales ventajas de esta técnica es su capacidad para generar tantas posibles hipótesis sin obtener un resultado claro. Esto ha supuesto para mí uno de los aspectos más enriquecedores, ya que me ha permitido ser más resolutiva e investigar de forma crítica las múltiples opciones antes de decantarme por la identidad de un compuesto.

A nivel general, estoy muy satisfecha tanto con el trabajo realizado como con los conocimientos adquiridos durante su elaboración.

ANEXOS

ANEXO 1. Glosario de términos

- Aducto: Producto formado por la unión directa de dos moléculas, sin que se produzcan cambios estructurales. También son posibles otras estequiometrías diferentes a la 1:1, como 2:1, es decir, dos moléculas A y una B. En espectrometría de masas, se define como un ion formado por la interacción de un ion precursor con uno o más átomos o moléculas que contiene todos los átomos constituyentes del ion precursor, así como los átomos adicionales de los átomos o moléculas asociados. En IMS, los aductos más comunes son [M+H]+, [M+Na]+ y [M+K]+.
- Analito: Compuesto de una muestra que se analiza. Es una especie química cuya presencia o contenido se desear conocer, identificar y/o cuantificar, mediante un proceso de medición química.
- Espectro de masas: Gráfico que representa la abundancia de una molécula (eje y) respecto a su masa/carga (*m/z*) (eje x) en una muestra analizada mediante espectrometría de masas.
- Espectrómetro de masas: Dispositivo que permite analizar con precisión la composición de muestras complejas en función de su relación masa/carga (*m/z*). Puede utilizarse para identificar un compuesto en base a su peso molecular, para adquirir información de los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.
- Espectrometría de masas: Técnica analítica que estudia la materia mediante la formación de iones en fase gaseosa que se detectan y caracterizan en función de su masa/carga. Puede ser usada para el análisis de muchos tipos de muestras, desde unidades elementales hasta grandes proteínas y polímeros.
- Espectrometría de masas de imágenes: Técnica analítica que estudia la materia mediante la formación de iones en fase gaseosa directamente de una muestra sólida que se detectan y caracterizan en función de su masa/carga, obteniendo imágenes iónicas de la muestra. Para ello, se traza la intensidad de cada ion en un sistema de coordenadas. En función de la intensidad de la señal recibida en cada zona se

asigna un falso color a la molécula, lo que permite conocer no solo su ubicación sino también su abundancia relativa.

- Imagen iónica (o imagen molecular): Representación gráfica de la distribución y abundancia de una molécula detectada en una muestra mediante espectrometría de masas de imagen.
- **Ion:** Átomo o grupo de átomos que adquiere carga eléctrica al perder o ganar uno o más electrones y al formar un aducto con un catión o anión.
- Ionización: Fenómeno químico mediante el cual se producen iones. Éstos son átomos o moléculas cargadas eléctricamente debido al exceso o falta de electrones respecto a un átomo o molécula neutra. En MALDI, la muestra es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío, lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H⁺ a la muestra, dando lugar a especies cargadas que son analizadas mediante TOF.
- **Isótopos:** Átomos de un mismo elemento químico que presentan núcleos con diferente cantidad de neutrones y, por tanto, tienen diferente número másico.
- Matriz (en MALDI): Compuesto formado por pequeños ácidos orgánicos que contienen en su estructura un anillo bencénico conjugado, favoreciendo la absorción de la energía del láser y promoviendo la ionización. La composición varía en función de las moléculas de interés a identificar dentro de una muestra.
- Píxel (en MALDI): Es la menor unidad homogénea que forma parte de la imagen obtenida en el mapeo de los analitos en un experimento de IMS.
- Relación masa/carga (m/z): En espectrometría de masas se refiere a la cantidad adimensional obtenida dividiendo el número de masa molecular de un ion por su número de carga. Esta relación permite distinguir y caracterizar las moléculas que componen una muestra, ya que cada molécula tiene una masa/carga específica.
- Resolución espacial o lateral: Capacidad para distinguir estructuras de pequeño tamaño. Cuanto menor es el área representada por cada píxel en una imagen, más son los detalles que pueden ser captados. En IMS, se suele emplear para definir a que tamaño de píxel se han adquirido las imágenes. También se usa para comparar equipos de IMS en función de la resolución lateral máxima que pueden alcanzar (i.e., cuál es el tamaño mínimo de píxel que pueden medir).