



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera de Ciencias Biológicas  
Tesis de Licenciatura

**Análisis de estrategias involucradas con la  
adaptabilidad al frío y microaerobiosis en  
*Pseudomonas extremaustralis***

**Lucía Giambartolomei**

**Directoras: Dra. Nancy I. López y Dra. Paula M. Tribelli**

**Laboratorio de Interacciones Bacterianas, Departamento de Química  
Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA**

**Abril 2023**

# AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a mis directoras Nancy López y Paula Tribelli. Les agradezco profundamente haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en su laboratorio, en especial porque me incorporé en contexto de pandemia donde entrar a un laboratorio no era fácil. Fue para mí una experiencia hermosa donde aprendí y crecí muchísimo. A Paula, por su enorme paciencia y dedicación para enseñarme a tener criterio y como trabajar en un laboratorio, pero también su buena onda y aliento cuando los experimentos no salen. A Nancy, por haberme acompañado en este viaje desde el día uno cuando hacíamos videollamadas por Zoom para analizar los datos de proteómica, por sus consejos y su calidez de todos los días que siempre te hace sentir mejor. Realmente creo que son excelentes profesionales y cualquier persona que trabaje con ustedes se sentiría tan afortunada como yo.

A mi familia, mi mamá, Alida, y mi papá, Guille, por haberme acompañado y bancado toda la carrera y la vida. Por sus consejos en épocas de crisis, que vamos a ser honestos fueron varias, por siempre empujarme para adelante y apoyarme. Por haberme llevado a la parada del colectivo cuando tenía que ir al CBC a las 7 de la mañana para que no tuviera frío y esperarme con la cena lista cuando volvía a las 11 de la noche de cursar Ecología y podría dar tantos ejemplos más. A mi hermano, Franco, que siempre está ahí para mí y presta su oído atento para escucharme. Fueron mi sostén a lo largo de estos 7 años, los amo.

A toda la gente que está y estuvo en QB 30, 31, 34 y 47 que hizo que mi paso por el laboratorio sea tan hermoso. A mis compañeros de QB 31 y 34, Stefa, Mate, Flor, Belu, Caro y Ailu, son personas hermosas que siempre están ahí para darme una mano lo que sea y charlar de nuestros experimentos fallidos, pero también celebrar cuando alguno finalmente nos sale. Tengo la suerte poder llamarlo amigos.

A todos mis amigos, mi familia elegida. Mis amigas de la facultad KND, Sofi, Cande y Maca, como voy a extrañar nuestras juntadas de estudio que fueron claves para sobrellevar exámenes y nuestros días enteros en Ciudad Universitaria. Mis amigas del secundario Ana, Vicky, Chia y Sofi que conozco hace 12 años, pasamos tantas cosas juntas que ya somos casi hermanas. A Fefy, las Maris Sofi, Daf, Hile por siempre hacerme reír, escucharnos y estar las unas para las otras. A Joa, por nuestras charlas que tan bien nos hacen. No me entran todos en un párrafo, pero ya saben lo que significan para mí.

Y finalmente quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por la educación de altísima calidad que me brindó. Por formarme con excelentes docentes, enseñarme todo lo que aprendí en esta hermosa carrera y haberme dado las herramientas necesarias para desempeñarme en un ámbito profesional.

# ÍNDICE

Resumen .....	4
Abstract.....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
Metabolismo aeróbico y microaeróbico bacteriano .....	7
Fuentes de estrés en bacterias .....	8
Estrés oxidativo y nitrosativo.....	8
Adaptaciones y estrés derivados de la exposición a bajas temperaturas .....	9
Rol del inositol en el metabolismo bacteriano .....	10
Estudio de la fisiología bacteriana a bajas temperaturas: aproximaciones globales .....	12
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> .....	13
Objetivos e Hipótesis .....	15
Materiales y métodos .....	17
1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	18
1.1 Cepas utilizadas.....	18
1.2 Condiciones de Cultivo .....	18
1.2 Ensayos de crecimiento .....	18
1.5 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno en medio sólido .....	19
1.6 Sensibilidad al estrés nitrosativo en microaerobiosis.....	19
1.7 Determinación de nitritos en el sobrenadante .....	20
1.8 Sensibilidad al estrés nitro-oxidativo en microaerobiosis.....	20
2. Análisis de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal ..	20
2.1 Solubilización de fosfatos en medio sólido .....	20
2.2 Determinación de pioverdinas en el sobrenadante.....	20
2.3 Determinación de ácido indolacético en el sobrenadante.....	21
3. Estudio de la formación de biofilms y movilidad bacteriana .....	21
3.1. Ensayos de biofilms en placas multipocillo.....	21
3.2 Estudios de movilidad bacteriana.....	22
4. Técnicas globales.....	22
4.1 Análisis de datos de estudio proteómico por espectrometría de masa .....	22
5. Experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real.....	23
5.1 Extracción de RNA.....	23
5.2 Transformación de RNA a cDNA.....	24
5.3 PCR cuantitativa en tiempo real.....	25

6. Análisis estadísticos .....	27
ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
Resultados.....	30
Estudio del crecimiento utilizando mioinositol como única fuente de carbono.....	31
Análisis de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal en microaerobiosis .....	33
Estudio de la formación de biofilms .....	36
Análisis del efecto del mioinositol en la movilidad bacteriana .....	37
Resistencia estrés oxidativo en distintas condiciones de aireación.....	38
Efectos fisiológicos de la exposición a estrés nitro-oxidativo en microaerobiosis.....	39
Análisis comparativo de los perfiles proteicos de <i>P. extremaustralis</i> entre 10°C y 28°C ..	42
Discusión .....	48
CONCLUSIONES GENERALES.....	56
referencias bibliográficas .....	57
Anexo Resultados.....	68

## Resumen

Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen una gran versatilidad metabólica la cual les permite desarrollarse en distintos ambientes. Particularmente *Pseudomonas extremaustralis* 14-3b posee características de interés biotecnológico como la producción de bioplásticos, la capacidad de biorremediación y de promoción del crecimiento vegetal. El mioinositol (MI) es un compuesto ampliamente encontrado en la naturaleza, incluyendo las superficies de las plantas, sin embargo, su utilización como fuente de carbono y su papel en el metabolismo bacteriano no ha sido estudiado en profundidad aún. Resultados anteriores obtenidos por nuestro laboratorio mostraron que *P. extremaustralis* sobre-expresa genes involucrados en el catabolismo del MI cuando es expuesta a estrés nitrosativo con S-Nitrosoglutatión (GSNO) en medio LB y condiciones microaeróbicas. En este trabajo se analizó la capacidad de *P. extremaustralis* de usar MI como única fuente de carbono, así como su efecto protector contra estrés nitrosativo y oxidativo en diferentes condiciones de aireación. También se estudió el crecimiento a diferentes temperaturas (8°C y 28°C) y condiciones de aireación con MI o glucosa. El crecimiento en aerobiosis en medio mínimo utilizando glucosa o MI fue similar. Lo mismo ocurrió en microaerobiosis en cultivos suplementados con KNO<sub>3</sub>, si bien el crecimiento fue menor que en aerobiosis. La formación de *biofilms* fue mayor con MI como fuente de carbono tanto en botellas como en placas de poliestireno. La resistencia al estrés oxidativo de cultivos aeróbicos y microaeróbicos se determinó por el método de difusión en discos. Cultivos aeróbicos suplementados con MI o glucosa mostraron halos de inhibición similares. La misma tendencia se observó bajo condiciones microaeróbicas, pero se observó mayor sensibilidad al estrés que en aerobiosis. La resistencia al estrés oxidativo en cultivos microaeróbicos suplementados con concentraciones crecientes de KNO<sub>3</sub> resultó mayor en MI y 1,5 g/L o 2,5 g/L de KNO<sub>3</sub> en comparación con glucosa. También se estudiaron algunas características asociadas a la promoción del crecimiento vegetal. En MI *P. extremaustralis* no fue capaz de solubilizar fósforo, pero aumentó la producción de pioverdinas. Nuestros resultados muestran que *P. extremaustralis* utiliza MI como única fuente de carbono a diferentes temperaturas y condiciones de aireación y sugieren que este compuesto protege contra el estrés nitro-oxidativo. Por otra parte, se realizó un estudio proteómico en frío en fase estacionaria de crecimiento obteniéndose 131 proteínas sobreexpresadas y 93 reprimidas. La comparación con estudios transcriptómicos previos mostró que la proteína de *cold shock* (CspA) se encontraba sobre/expresada a nivel de mRNA y proteína. Además, se observó coincidencia en 27 de las proteínas reprimidas.

## **Abstract**

### Analysis of strategies involved in cold adaptation and microaerobiosis in *Pseudomonas extremaustralis*

Bacteria from the *Pseudomonas* genus have a great metabolic versatility which allows them to flourish in different environments. Particularly, *Pseudomonas extremaustralis* 14-3b has characteristics of biotechnological interest like bioplastic production, bioremediation and plant growth promotion traits. Myo-inositol (MI) is a commonly found compound in nature, including plant surfaces, nevertheless its use as carbon source and its role in bacterial metabolism has not yet been deeply studied. Previous results obtained by our laboratory showed that *P. extremaustralis* overexpressed genes involved in MI catabolism when it's exposed to nitrosative stress with S-Nitrosoglutathione (GSNO) in LB medium and microaerobic conditions. Throughout this work we studied the ability of *P. extremaustralis* to use MI as sole carbon source as well as its protective effect against nitrosative and oxidative stress in different aeration conditions. We also studied growth under different temperatures (8°C and 28°C) and aeration conditions with MI or glucose. Growth in aerobiosis using MI or glucose was similar. This also occurred in microaerobiosis in KNO<sub>3</sub> supplemented cultures, although growth was lower than in aerobiosis. Biofilm formation was higher in MI as carbon source both in 5 ml bottles and polystyrene plates. Oxidative stress resistance from aerobic and microaerobic cultures was determined with the agar disk diffusion method. Aerobic cultures supplemented with MI or glucose showed similar inhibition halos. The same trend was observed under microaerobic conditions, but cultures were much more sensitive to stress than in aerobiosis. Resistance to oxidative stress in microaerobic cultures supplemented with growing concentrations of KNO<sub>3</sub> resulted higher in MI cultures and 1.5 or 2.5 g/L of KNO<sub>3</sub> compared to glucose. Some characteristics associated with plant growth promotion were studied. In MI *P. extremaustralis* was not able to solubilize phosphate but was able to produce pyoverdines. Our results show that *P. extremaustralis* uses MI as sole carbon source and suggest that MI protects it against nitro-oxidative stress. Besides this, a proteomic study in cold temperature and stationary phase was made showing 131 overexpressed proteins and 93 repressed. The comparison with previous transcriptome studies showed that the cold shock protein (CspA) was overexpressed both at mRNA and protein level. A coincidence of 27 repressed proteins was also observed.

# ***INTRODUCCIÓN***

En la naturaleza, las bacterias están expuestas a variaciones en distintos factores ambientales tales como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y el contenido de agua y nutrientes. La supervivencia frente a cambios en estos factores requiere una serie de respuestas adaptativas finamente controladas. El género *Pseudomonas* comprende un grupo diverso perteneciente a las  $\gamma$ -Proteobacterias que ocupan diferentes ambientes y poseen una amplia versatilidad metabólica que les permite adaptarse a estas condiciones cambiantes.

Este grupo de bacterias incluye representantes con impacto tanto negativo como positivo para diversas actividades humanas y para la salud humana, animal y vegetal. Por un lado, existen especies patógenas animales, vegetales e incluso patógenas humanas como *P. aeruginosa*. Por otro lado, existen especies con interés biotecnológico capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos simples y complejos como fuente de carbono y dadores de electrones para la obtención de energía. Entre estos se encuentran compuestos xenobióticos por lo que muchas de estas especies son consideradas buenas candidatas en procesos de biorremediación ambiental. Además, son capaces de producir diversos compuestos de interés como pigmentos, alginatos y polihidroxialcanoatos. Por otro lado, dentro del género también se encuentran especies de importancia agrícola que se asocian a la rizosfera y son consideradas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

### **Metabolismo aeróbico y microaeróbico bacteriano**

La respiración es un proceso catabólico en el cual un compuesto dador de electrones es oxidado en presencia de  $O_2$  (respiración aeróbica) o de un sustituto de  $O_2$  como aceptor alternativo terminal de electrones (respiración anaeróbica) para la generación de energía. Cuando hay  $O_2$  disponible, la respiración aerobia tendrá lugar debido al mayor rendimiento energético en aquellos organismos capaces de llevarla adelante. Por este motivo el  $O_2$  constituye un compuesto fundamental para el desarrollo de la vida. Muchas bacterias poseen la capacidad de realizar respiración aerobia o anaerobia dependiendo de la disponibilidad de oxígeno u otros aceptores de electrones. En *Pseudomonas* la respiración aeróbica es el mecanismo preferido de generación de energía, pero varias especies pueden desarrollarse en ambientes que poseen un gradiente de condiciones de oxígeno, desde aerobiosis hasta anaerobiosis pasando por la microaerobiosis, utilizando diferentes mecanismos para obtención de energía, que comprenden la respiración aerobia y anaerobia y también la fermentación del aminoácido arginina (Palleroni, 2005). Además, las *Pseudomonas* poseen una amplia gama de adaptaciones celulares en respuesta a cambios en los niveles de oxígeno, como la presencia de citocromos con distinta afinidad por el oxígeno y la utilización de nitrato como aceptor alternativo de electrones en la respiración anaerobia (Ugidos *et al.*, 2008). El metabolismo anaerobio presenta distinto grado de desarrollo en este género. *P.*



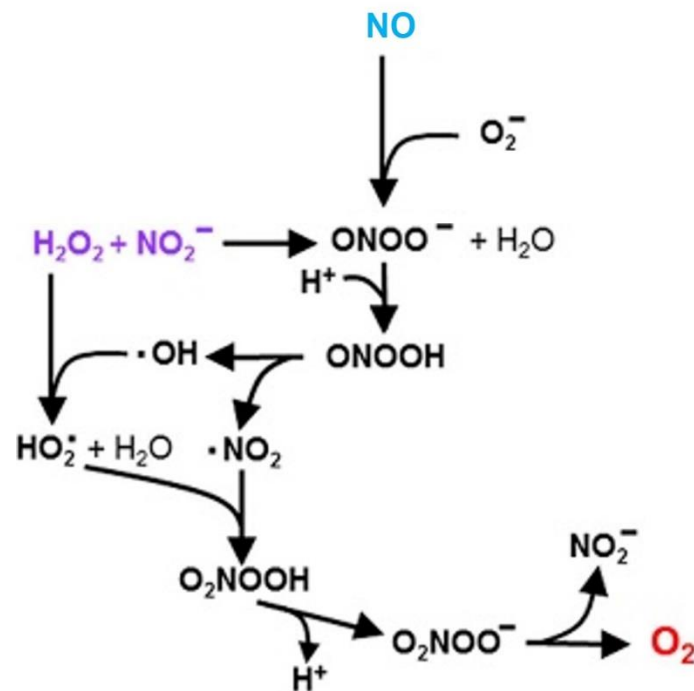
*aeruginosa* puede llevar a cabo un proceso completo de desnitrificación, *P. extremaustralis* solo es capaz de reducir el nitrato a nitrito, mientras que otras especies como *P. putida* no pueden utilizar nitrato (Raiger lustman *et al.*, 2015).

## **Fuentes de estrés en bacterias**

### Estrés oxidativo y nitrosativo

En ambientes con presencia de oxígeno se generan especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que causan daño celular afectando lípidos, proteínas y DNA. Esto se conoce como estrés oxidativo. Las ROS son un producto de la respiración aeróbica al utilizar oxígeno como aceptor final de electrones el cual puede reducirse de manera incompleta en la cadena respiratoria. Como resultado se generan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) (Schieber y Chandel, 2014). También existen otras fuentes de estrés oxidativo en la naturaleza como subproductos de la incidencia de luz ultravioleta, antibióticos, compuestos xenobióticos o compuestos secretados al medio extracelular por otras bacterias. Por ejemplo, las bacterias ácido lácticas generan y secretan al medio extracelular  $H_2O_2$  para inhibir a sus competidores (Reis *et al.*, 2012). Incluso pueden ser generados por células del sistema inmune y también por plantas ante la presencia de patógenos (Fu *et al.*, 2015; Imlay, 2019). Las ROS producen daño a nivel celular debido a que reaccionan con macromoléculas como lípidos (dándose peroxidación lipídica), proteínas (dándose la carbonilación) y sobre el DNA (Imlay, 2013). Las bacterias poseen varios mecanismos de defensa contra las ROS, pero si estas no son suficientes para detoxificarlas se produce la muerte celular. Los microorganismos también pueden enfrentarse a estrés derivado de especies reactivas del nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) las cuales producen estrés nitrosativo y existen varias moléculas vinculadas a este fenómeno. Una de ellas es el óxido nítrico (NO), una molécula que cumple varias funciones en el metabolismo bacteriano: es un intermediario en la desnitrificación, está involucrado en la dispersión de *biofilms* y recientemente se ha descrito su rol en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Caranto, 2019; Poh y Rice, 2022). Sin embargo, a concentraciones elevadas es un agente estresante para la célula. Esto se debe a que puede reaccionar con otras especies como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) generando RNS. Otra molécula causante de estrés nitrosativo es el ion nitrito ( $NO_2^-$ ). El nitrito se produce durante la reducción del nitrato ( $NO_3^-$ ) para obtener energía en condiciones de baja o nula tensión de oxígeno o durante el proceso de desnitrificación bacteriana. Si este interactúa con otras especies reactivas genera también RNS (Bauer, 2019). En algunas especies bacterianas la desnitrificación es incompleta debido a la ausencia de ciertos genes de esta vía en el genoma. Este es el caso de *P. extremaustralis*

14-3b que es capaz de reducir  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  pero carece de la mayoría de los genes correspondientes al operón *nir* necesarios para reducir  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}$  durante la desnitrificación (Tribelli *et al.*, 2010; Raiger lustman *et al.*, 2015). El nitrito entonces se acumulará en el proceso de reducción del nitrato en baja tensión de oxígeno, que, combinado con otras moléculas como se mencionó, puede generar estrés nitrosativo. Las interacciones entre ROS y RNS se ilustran en la **Figura 1**.



**Figura 1:** Red de reacciones entre ROS y RNS en sistemas biológicos. Figura adaptada de Bauer, 2019.

## Adaptaciones y estrés derivados de la exposición a bajas temperaturas

La temperatura es uno de los factores más importantes para el crecimiento bacteriano. Los ambientes fríos son predominantes en nuestro planeta ya que aproximadamente el 80% de la superficie terrestre presenta temperaturas menores a  $15^\circ\text{C}$  (Rodrigues y Tiedje, 2008). El estudio de los microorganismos adaptados al frío resulta de interés por su impacto tanto positivo como negativo para la actividad humana y el conocimiento de los mecanismos fisiológicos que intervienen en este proceso es aún escaso (Trevors *et al.*, 2012). Las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes han desarrollado estrategias para adaptarse al frío. Entre ellas la presencia de enzimas adaptadas a bajas temperaturas, la expresión de proteínas *cold shock*, la síntesis de moléculas osmoprotectoras y la alteración en la composición de los lípidos de la membrana plasmática (Kawamoto *et al.*, 2007; Tribelli y López, 2018).

La exposición a bajas temperaturas también genera estrés oxidativo debido a la producción de ROS. A medida que la temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno aumenta y sumado a la alteración en la fluidez de las membranas, provoca un aumento en las ROS (Chattopadhyay *et al.*, 2011), frente a las cuales bacterias como *P. extremaustralis* desarrolla mecanismos de adaptación como la acumulación de polímeros como los polihidroxicanoatos (Ayub *et al.*, 2009; Tribelli *et al.*, 2011).

### **Rol del inositol en el metabolismo bacteriano**

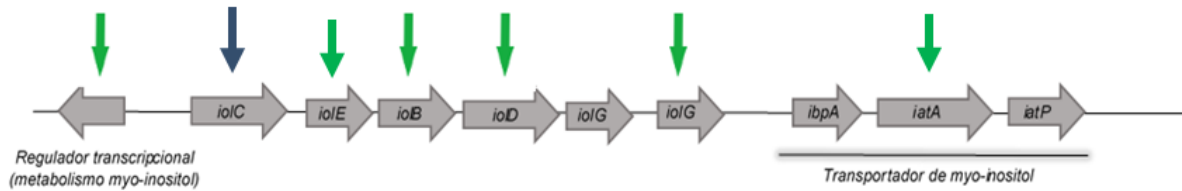
El inositol, o ciclohexanohecol, es un compuesto orgánico perteneciente a la familia de los polialcoholes. Presenta varios estereoisómeros, como el *d-chiro*- y *scyllo*-inositol, siendo el mioinositol el más abundante en la naturaleza. En organismos vegetales posee varias funciones tales como biogénesis de estructuras de la membrana y pared celular, almacenamiento de fosfato, señalización celular y resistencia a factores externos estresantes (Loewus y Murthy, 2000). También se ha descrito su rol en relación a la interacción planta-bacteria debido a su presencia en la rizosfera (Kohler *et al.*, 2011) y distintos estudios han reportado que la vía catabólica del inositol juega un papel clave en el éxito de la nodulación en las raíces de las plantas (Kohler, *et al.*, 2010). Incluso cumple funciones en la supervivencia del patógeno *Brucella* dentro de su huésped y en la virulencia de *Salmonella typhimurium* en animales (Kohler *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2015).

La vía catabólica del mioinositol (**Figura 2B**) y su regulación se ha descrito en varias especies bacterianas, principalmente en la bacteria gram-positiva *Bacillus subtilis* (Yoshida *et al.*, 2008). Los genes involucrados en esta vía se denominan *iol* y están organizados en un operón que incluye *iolABCDEFGHIJ*. Este operón es regulado por el represor *iolR* el cual se une a la región promotora del mismo. Varias especies del género *Pseudomonas* como *P. aeruginosa* y *P. putida* carecen de estos genes, pero se encuentran presentes en *P. protegens*, *P. fluorescens* y *P. extremaustralis*. Esta última posee los genes *iolB*, *iolC*, *iolD*, *iolE* y dos copias de *iolG* (**Figura 2A**). Río arriba de este cluster se encuentra un gen que codifica un regulador transcripcional (PE143B\_0113035), mientras que río abajo se ubican tres genes que codifican proteínas pertenecientes a un sistema de transporte de este compuesto. Cabe destacar que el gen *iolJ*, que codifica una aldolasa central en esta vía, está ausente en su genoma (**Figura 2A**) (Solar Venero, 2020).

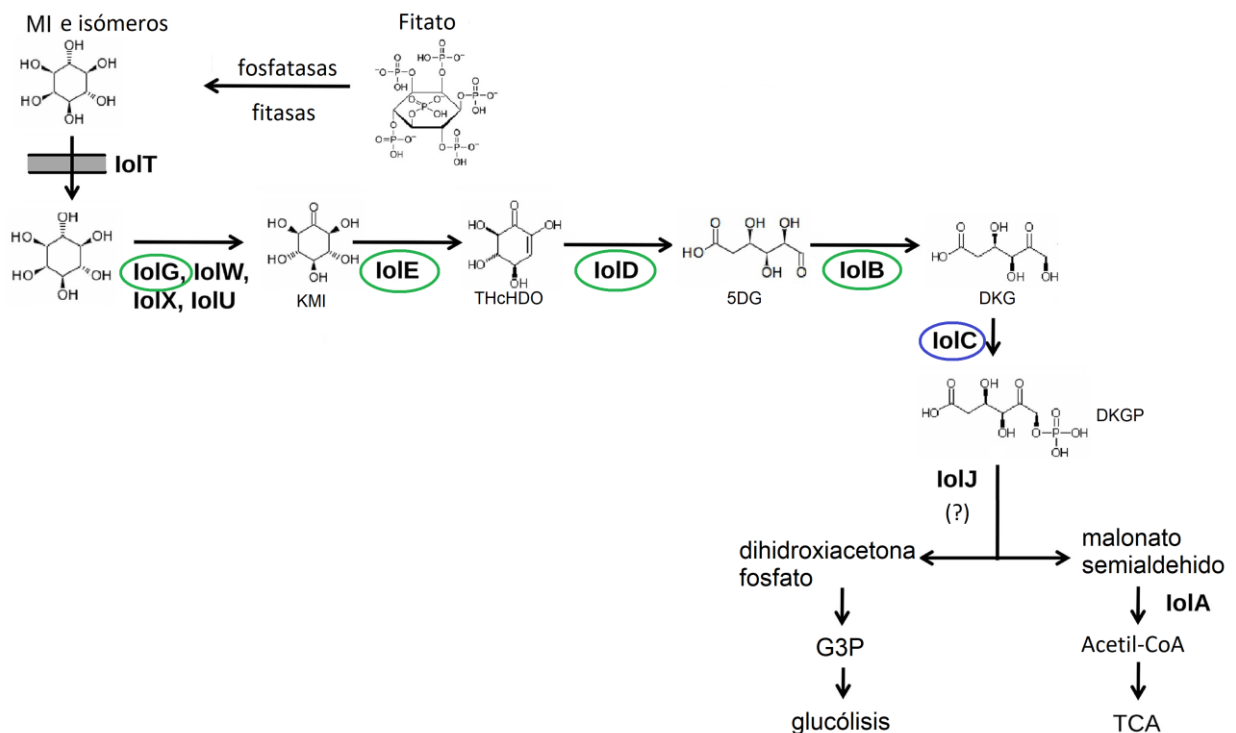
Trabajos anteriores de este laboratorio mostraron que ante estrés nitrosativo en condiciones microaeróbicas *P. extremasutralis* aumentaba la expresión de algunos genes de la vía del catabolismo del inositol. En cultivos microaeróbicos de esta especie realizados en medio LB y expuestos a S-Nitrosoglutación (GSNO), un dador de NO, se sobreexpresaban los genes *iolE*, *iolB*, *iolD* e *iolG*, el regulador transcripcional y el gen *iatA*, que codifica uno de los componentes del sistema de transporte del inositol (Figura 2 A y B). Sin embargo, a la

fecha no existen reportes que indiquen si *P. extremaustralis* puede utilizar mioinositol como única fuente de carbono o si este genera protección contra estrés nitrosativo.

## A.



## B.



**Figura 2: A.** Organización genómica de los genes involucrados en el metabolismo del mioinositol en *P. extremaustralis*. Las flechas indican dirección y tamaño relativo de los genes. Las flechas verdes indican genes que se encontraron sobre-expresados en condiciones microaeróbicas con estrés nitrosativo y la azul indica que el gen se encuentra expresado pero su expresión no presentó diferencias significativas con respecto a microaerobiosis. Imagen tomada de Solar Venero, 2020. **B.** Catabolismo del inositol en bacterias Gram-positivas y negativas. Las enzimas marcadas con verde y azul siguen el mismo criterio de coloración que en (A). Imagen modificada de Weber y Fuchs, 2022.

MI: mioinositol, KMI: 2-ceto-mioinositol, THcHDO: 3D-(3,4/5) trihidroxiclohexano-1,2-diona, 5DG: ácido 5-deoxi-gluconico, DKG: ácido 2-deoxi-5-ceto-d-gluconico, DKGP: ácido 6 -fosfato 2-deoxi-5-ceto-d-gluconico, TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos, G3P: gliceraldehído-3-fosfato.

## **Estudio de la fisiología bacteriana a bajas temperaturas: aproximaciones globales**

Los enfoques clásicos para el estudio de la fisiología y bioquímica microbiana se han centrado en análisis bioquímicos individuales o de vía metabólicas sencillas, sumado al uso de herramientas de biología molecular que significaron un avance importante en muchas disciplinas de las ciencias biológicas, incluyendo la microbiología. Este enfoque fisiológico apunta a una función o gen específico o subconjunto de genes o productos génicos (RNA y proteínas) y al análisis de respuestas moleculares en condiciones específicas. Por el contrario, las aproximaciones globales "ómicas" integran diferentes metodologías para caracterizar y cuantificar diferentes moléculas, permitiendo obtener una imagen detallada de la respuesta de un organismo a su entorno. El desarrollo de estas tecnologías ha sido posible gracias al equipamiento que permite obtener los datos masivos, así como a la incorporación de la bioinformática, utilizada para procesar grandes conjuntos de datos biológicos (datos ómicos), y la estadística. Estas técnicas básicamente comprenden: la genómica que proporciona una descripción general del conjunto del DNA, la transcriptómica que analiza los patrones de expresión génica y la proteómica que estudia el conjunto de proteínas. A medida que se progresa en el conocimiento también adquieren relevancia nuevas técnicas ómicas como la metabolómica que estudia el conjunto de metabolitos y algunas más enfocadas en componentes particulares como la lipidómica o glicómica.

Las técnicas ómicas permiten comprender de manera más profunda los sistemas complejos, generando nuevas hipótesis de trabajo. La genómica permite conocer todos los genes de un organismo, pero en muchos casos es necesario investigar que codifican y cuando y porque se transcriben y traducen. Los estudios de transcriptómica y proteómica proveen entonces información acerca de la funcionalidad.

La transcriptómica comprende el análisis del conjunto de moléculas de RNA, incluyendo mRNAs, rRNAs, tRNAs y otros RNAs no codificantes, que se encuentran presentes en una célula o un conjunto de células en un momento determinado y en condiciones específicas y que permite la detección de nuevos transcritos, así como la cuantificación del conjunto de los RNA en un momento dado. Los RNA cumplen diversas funciones biológicas, actuando como intermediarios en la síntesis de proteínas o cumpliendo roles catalíticos y regulatorios. Las funciones celulares, dependen en gran parte, de la abundancia relativa y la actividad de las moléculas de RNA en el tiempo y en respuesta a los diferentes estímulos.

La proteómica permite la identificación de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones en una célula o conjunto de células (Wilkins, 2009). Debido a la gran diversidad de las proteínas en cuanto a número, tamaño, propiedades

y modificaciones post-traduccionales la complejidad de los proteomas es mayor comparada con genomas y transcriptomas. Por otra parte, las bacterias poseen una gran capacidad de adaptarse a los cambios del ambiente por lo que el proteoma es altamente dinámico. El número y tipo de proteínas en una célula cambian en respuesta al entorno u otros factores, como la etapa de crecimiento o ciclo de desarrollo. A través de esta técnica se pretende determinar la abundancia de las proteínas, los cambios en respuesta a la degradación bajo determinadas condiciones, como así también, detectar modificaciones post-traduccionales en las secuencias proteicas, tales como fosforilaciones o glicosilaciones, por ejemplo.

En resumen, el objetivo de la proteómica es el conocimiento de qué proteínas se sintetizan bajo un conjunto dado de condiciones, complementa los datos transcriptómicos y si se detecta una cierta proteína es la técnica que permite confirmar si realmente se produce la traducción de un transcripto detectado por transcriptómica.

### ***Pseudomonas extremaustralis***

En este trabajo se utilizó la bacteria extremófila *Pseudomonas extremaustralis*. *P. extremaustralis* es una bacteria Gram-negativa aislada del continente Antártico (Ayub *et al.*, 2004, López *et al.*, 2009). El aislamiento se realizó a partir de una muestra de una charca temporal, un ambiente expuesto a alta incidencia de luz ultravioleta, variaciones extremas de luminosidad, escasez de nutrientes y cambios de temperatura, caracterizados por procesos de congelamiento y descongelamiento. Puede crecer eficientemente a baja temperatura, pero también es mesófila (Raiger lustman *et al.*, 2015). Posee la capacidad de almacenar polihidroxialcanoatos (PHA), bioplásticos de interés biotecnológico, siendo el polihidroxibutirato (PHB) el compuesto mayoritario (Catone *et al.*, 2014). La síntesis de estos polímeros se produce a partir ácidos grasos como el octanoato de sodio y de glucosa en menor proporción (Catone *et al.*, 2014). Es una especie con alta resistencia a estrés oxidativo y térmico (Ayub *et al.*, 2004; Ayub *et al.*, 2009) y un compuesto asociado a esto es PHB, que funciona como reserva energética y fuente de poder reductor. Posee la capacidad de producir y acumular grandes cantidades de este compuesto el cual es esencial para la supervivencia en frío, ya que su ausencia genera un desbalance en el estado redox celular y mayor sensibilidad al estrés oxidativo (Ayub *et al.*, 2009, Tribelli y López, 2011).

*P. extremaustralis* es capaz de crecer en ambientes con distinta disponibilidad de oxígeno: aeróbicos, microaeróbicos o anaeróbicos mediante la reducción de nitrato o la fermentación de arginina y piruvato (Tribelli *et al.*, 2010; Raiger lustman *et al.*, 2015). El proceso de desnitrificación que realiza es incompleto ya que, como se dijo anteriormente, carece la mayoría de los genes del operón *nir* (Tribelli *et al.*, 2010; Raiger lustman *et al.*,

2015). Por otro lado, posee algunas características de promoción de crecimiento vegetal como la producción de ácido indolacético (AIA), la mineralización de fosfatos orgánicos, la solubilización de fosfatos inorgánicos y la producción de pioverdinas (sideróforos) que están asociadas al biocontrol de especies fitopatógenas (Ibarra, 2017).

# ***OBJETIVOS E HIPÓTESIS***



El objetivo general del laboratorio es el estudio de los mecanismos de adaptabilidad al ambiente en distintas especies bacterianas. Una de ellas es *P. extremaustralis*, un organismo aislado de un ambiente extremo que presenta gran resistencia al estrés. Se sabe que muchas respuestas fisiológicas en microorganismos dependen de la fuente de carbono utilizada. Observaciones previas del laboratorio mostraron que en presencia de estrés nitrosativo los genes relacionados con el catabolismo del inositol se encuentran sobre-expresados. En base a esto se propone como **primera hipótesis del trabajo** que el inositol confiere mayor protección contra el estrés nitrosativo en comparación con otras fuentes de carbono.

Por otra parte, el laboratorio está interesado en el estudio de la fisiología en condiciones de baja temperatura de *P. extremaustralis* utilizando herramientas de análisis global, combinadas con estudios fenotípicos y genéticos. Se han identificado varios mecanismos relacionados con la adaptación temprana al frío por lo que se investigarán estrategias involucradas en la exposición prolongada a baja temperatura. Como **segunda hipótesis de trabajo** se plantea que *P. extremaustralis* despliega una serie de respuestas durante las etapas tempranas de exposición al frío que son reajustadas a medida que aumenta el tiempo de exposición y finaliza la adaptación, manteniendo algunas de ellas y desplegando otras nuevas.

En base a esto se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el crecimiento en presencia de mioinositol en cultivos realizados a diferente temperatura y condiciones de aireación y analizar la resistencia al estrés oxidativo y nitrosativo.
2. Analizar el perfil global proteómico de adaptación al frío durante la fase estacionaria. Seleccionar genes relevantes para el análisis individual de su expresión.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## 1. Microorganismos y condiciones de cultivo

### 1.1 Cepas utilizadas

Los experimentos presentados en esta tesis se realizaron con *Pseudomonas extremaustralis* 14-3b (DSM 25547) una especie aislada a partir de muestras procedentes del continente Antártico (López *et al.*, 2009).

### 1.2 Condiciones de Cultivo

Los cultivos utilizados en este trabajo se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que se describe a continuación. A partir de colonias aisladas de *P. extremaustralis* procedentes de placas de cultivos frescos (24-48h) se realizaron precultivos en medio LB que fueron incubados toda la noche a 28°C. Estos precultivos se utilizaron para inocular cultivos, a una  $DO_{600nm}$  inicial de 0,05, en diferentes condiciones.

Para los ensayos se utilizó medio mínimo E2 (Lageveen *et al.*, 1988, Anexo Materiales y Métodos) suplementado con glucosa o mioinositol al 1% o medio LB suplementado con octanoato de sodio 0,25%. Los cultivos aeróbicos se realizaron en frascos de tipo Erlenmeyer manteniendo una relación 1:10 (volumen medio de cultivo: volumen frasco) y agitación alta (200 r.p.m). Para las condiciones de baja aireación o microaerobiosis se emplearon frascos de 10 ml con tapa a rosca herméticamente cerrados, una relación 1:2 (volumen medio de cultivo: volumen frasco) y agitación suave (50 r.p.m). Los cultivos microaeróbicos fueron suplementados con  $KNO_3$  0,08% cómo se empleó en trabajos anteriores con *P. extremaustralis* (Tribelli *et al.*, 2010; Solar Venero *et al.*, 2019) e incubados a 28°C por 48 h.

En todos los casos se trabajó con cultivos independientes y como mínimo se realizaron 3 réplicas.

### 1.2 Ensayos de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento en condiciones aeróbicas en medio mínimo E2 suplementado con glucosa o mioinositol. La incubación se llevó a cabo a 8°C y a 28°C. Durante el desarrollo del experimento se tomaron alícuotas a distintos tiempos para las cuales se midió la  $DO_{600nm}$  utilizando un espectrofotómetro.

Para estudiar el crecimiento en microaerobiosis con mioinositol o glucosa como fuente de carbono los cultivos microaeróbicos se incubaron a 28°C durante 48 h. Luego de esto, se midió la  $DO_{600nm}$ , y en este caso, además, se centrifugaron los cultivos a 11500 g por 2 min y se liofilizó el pellet bacteriano para medir el peso seco celular.

## 1.5 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno en medio sólido

Para determinar la resistencia al estrés oxidativo se empleó un ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por difusión en disco (Ayub *et al.*, 2004). Se utilizaron cultivos suplementados con mioinositol o glucosa de 24 h de crecimiento en condiciones aeróbicas y de 48 h de crecimiento en condiciones microaeróbicas. Luego de la incubación se ajustó la  $DO_{600nm}$  de los cultivos a 2. Se sembraron 200  $\mu$ l de esta suspensión bacteriana en placas de medio LB. Para mantener uniformidad en las condiciones experimentales las placas se prepararon con 20 ml de medio de manera que siempre presentaran el mismo grosor. Posteriormente se dejaron secar durante 10 minutos y se colocaron 3 discos de papel de filtro estériles (6 mm de diámetro) por placa dejándolos secar nuevamente durante 10 minutos. Luego se agregaron 5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  30% estabilizada (Merck). Las placas se incubaron durante toda la noche a 30°C y se determinó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento.

## 1.6 Sensibilidad al estrés nitrosativo en microaerobiosis

Se utilizaron 2 compuestos que generan estrés nitrosativo. Por un lado, el S-Nitrosoglutatión (GSNO) que es un dador de NO. Por otro lado, se utilizó el nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) en distintas concentraciones el cual, además de ser aceptor alternativo de electrones en bajas tensiones de oxígeno, al reducirse se produce nitrito, que como se describió en la sección introducción en *P. extremaustralis* se acumula y puede producir estrés nitrosativo.

En el caso de los ensayos con GSNO, cultivos microaeróbicos con mioinositol o glucosa se incubaron con GSNO 100  $\mu$ M durante 1 h. Se utilizó  $H_2O$  bidestilada (bd) como control. Posteriormente se realizó la determinación de las unidades formadoras de colonias en presencia de GSNO o su control por recuento en gota. Previo a la realización de las diluciones seriadas y debido a la observación de la formación de *biofilms* robustos en la interfaz aire-medio se tomó 1 ml de cultivo y se lo sometió a un ciclo de 30 segundos de sonicación empleando un sonicador de baño (TESTLAB lavador ultrasónico). Se realizaron diluciones seriadas al décimo y se sembró una gota de 5  $\mu$ l de cada dilución en placas de LB agar y se incubó a 30°C durante toda la noche.

Para analizar el efecto del  $KNO_3$  y los compuestos derivados de su utilización sobre el crecimiento bacteriano, se midió  $DO_{600nm}$  de cultivos microaeróbicos suplementados con mioinositol o glucosa y concentraciones crecientes de  $KNO_3$  (0; 0,8; 1,5; 2,5 g/L). Luego se centrifugó el volumen total del cultivo o 1,5 ml del mismo a 11500 g por 2 min y se guardó el sobrenadante para la determinación de nitritos (ver inciso 1.7) y el *pellet* bacteriano. Este último se liofilizó para calcular el peso seco celular.

## 1.7 Determinación de nitritos en el sobrenadante

Sobre los cultivos microaeróbicos realizados con concentraciones crecientes de  $\text{KNO}_3$  mencionados anteriormente en el inciso 1.6 se determinó la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en el sobrenadante. Se empleó el método descrito por Gerhardt *et al.* (1981). Brevemente, se construyó una curva de calibración utilizando diluciones de una solución stock de  $\text{NaNO}_2$  400  $\mu\text{M}$  abarcando un rango de concentraciones de 3,125-400  $\mu\text{M}$ . Para la determinación colorimétrica de  $\text{NO}_2^-$  se mezclaron 1,4 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  bd, 0,1 ml de distintas diluciones de la solución stock, 1 ml de sulfanilamida 1% m/v en HCl 10% v/v y 1 ml de  $\alpha$ -(naftil)etilendiamida 0,02% m/v. Al cabo de 15 min se midió la  $\text{DO}_{540\text{nm}}$ . Asimismo, se midió la absorbancia de un blanco colocando 0,1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  bd. Este mismo procedimiento se empleó para la determinación de nitritos en el sobrenadante de los cultivos mencionados previamente.

## 1.8 Sensibilidad al estrés nitro-oxidativo en microaerobiosis

Para estudiar la sensibilidad combinada al estrés nitrosativo y oxidativo se utilizaron los cultivos microaeróbicos tratados con concentraciones crecientes de  $\text{KNO}_3$ . Con estos cultivos, se realizó el ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno en medio sólido explicado en el inciso 1.5.

## **2. Análisis de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal**

### 2.1 Solubilización de fosfatos en medio sólido

La capacidad *P. extremaustralis* para solubilizar fosfato se determinó mediante un ensayo de solubilización en placa utilizando el medio NBRIP sólido (Nautiyal, 1999) suplementado con fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y glucosa o mioinositol al 1%. Las placas se inocularon con gotas de 5  $\mu\text{l}$  de cultivos microaeróbicos. La solubilización de fosfato se visualizó como la formación de halos claros alrededor de la siembra (*spots* bacterianos) luego de la incubación a 30°C durante 7 días. Se determinó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento.

### 2.2 Determinación de pioverdinas en el sobrenadante

Para la determinación de pioverdinas se emplearon cultivos microaeróbicos realizados en medio King B (King *et al.*, 1954) suplementados con glucosa o mioinositol al 1%. La

incubación se llevó a cabo a 28°C durante 48 h luego de lo cual se centrifugaron 1,5 ml de cultivo para cuantificar la producción de pioverdinas por espectrofotometría basándonos el método descrito por Ruiz *et al.* (2015). Se realizó el espectro de emisión de fluorescencia de los sobrenadantes y de un blanco de medio King B a una longitud de onda de excitación de 420 nm y se integró el área bajo la curva entre las longitudes de onda donde se observó el pico de emisión (475 nm y 495 nm). Los valores de esta fluorescencia integrada se expresaron relativos al peso seco por mililitro de los cultivos correspondientes.

### 2.3 Determinación de ácido indolacético en el sobrenadante

Para la determinación de ácido indolacético (AIA) se emplearon cultivos microaeróbicos en medio mínimo E2 suplementados con triptófano 0,01% m/v y glucosa o mioinositol al 1%. La incubación se llevó a cabo a 28°C durante 48 h luego de lo cual se centrifugaron 1,5 ml de cultivo y se reservó el sobrenadante. Se construyó una curva de calibración utilizando diluciones de una solución de AIA 50 µg/ml abarcando un rango de 1-25 µg/ml. Para la determinación colorimétrica de AIA se mezclaron 1 ml de la muestra correspondiente y 1 ml de reactivo de Salkowski, luego de 15 minutos se midió absorbancia a 530 nm en espectrofotómetro. Este mismo procedimiento se empleó para la determinación de AIA en las muestras provenientes de los cultivos mencionados previamente.

## 3. Estudio de la formación de *biofilms* y movilidad bacteriana

### 3.1. Ensayos de *biofilms* en placas multipocillo

Para los estudios de formación de *biofilms* se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos, con fondo en “U” sin pretratamiento de manera de no favorecer artificialmente la adhesión. Estas se inocularon con cultivos de medio mínimo E2 suplementado con glucosa o mioinositol al 1% y con 0,08% de KNO<sub>3</sub> a una OD<sub>600nm</sub> inicial de 0,025. La placa se incubó estáticamente a 30°C. Luego de 48 h, se transfirieron las células planctónicas a otra placa donde se determinó la DO<sub>595nm</sub> de células planctónicas (APC). Por otro lado, en la placa original se cuantificó la biomasa adherida utilizando el método del cristal violeta (O’Toole y Kolter, 1998). Brevemente, las células adheridas se tiñeron con 200 µl de una solución de cristal violeta (0,1%) durante 20 min. Luego se retiró la solución y las placas se enjuagaron suavemente con agua para eliminar el colorante remanente. El colorante adherido se solubilizó mediante el agregado de 200 µl de etanol absoluto durante 20 min y se transfirió a placas de fondo plano para medir la absorbancia a 570 nm (ACV) utilizando un lector de

microplacas BMG OPTIMA FLUOstar. El índice de formación de *biofilms* se definió como ACV / APC.

### 3.2 Estudios de movilidad bacteriana

La motilidad bacteriana en medios semisólidos se evaluó mediante ensayos de *swimming* y *swarming* en placa utilizando medios adecuados para este ensayo con diferentes concentraciones de agar (ver Anexo Materiales y Métodos) (Morales-Soto *et al.*, 2015). Debido a que la motilidad varía de acuerdo a la composición del medio y a la humedad de la superficie se prestó particular atención en mantener la uniformidad de las condiciones experimentales. Las placas se prepararon utilizando 7 ml de medio en placas de Petri de 50 mm de diámetro y se dejaron secar abiertas en campana de flujo laminar durante 1 h. Esto permitió uniformizar la pérdida de agua. La  $DO_{600nm}$  de cultivos microaeróbicos en medio E2 suplementado con mioinositol o glucosa al 1% se ajustó a 0,5 y se utilizaron 5  $\mu$ l para inocular las placas. La distancia de *swimming* y *swarming* se midió luego de 48 h de incubación a 30°C.

## 4. Técnicas globales

### 4.1 Análisis de datos de estudio proteómico por espectrometría de masa

A partir de datos de proteómica obtenidos previamente en el laboratorio a través del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina) se realizó un análisis de las proteínas diferencialmente expresadas de cultivos de *P. extremaustralis* realizados a distinta temperatura. Los cultivos correspondientes a dichos datos se realizaron en medio LB suplementado con octanoato de sodio 0,25% en condiciones aeróbicas. La incubación se llevó a cabo a 10°C durante 72 h y a 28°C durante 24 h.

Los análisis estadísticos y la visualización de datos se efectuaron utilizando el *software* Perseus (Tyanova *et al.*, 2016). Con este análisis se identificaron las proteínas diferencialmente expresadas que fueron representadas mediante un *volcano plot*. El criterio para la identificación fue el siguiente: proteínas con veces de cambio  $\geq 2$  (en escala logarítmica  $-1 \geq \log_2(\text{veces de cambio}) \geq 1$ ) en el eje de abscisas y  $p \leq 0,05$  (mayores a 1,3 en escala logarítmica) en el eje de ordenadas fueron consideradas estadísticamente diferentes en la comparación entre la expresión a 10°C y 28°C. Asimismo, se tomó en consideración aquellas proteínas que se detectaron sólo en una condición (presente en todas las réplicas biológicas)

y no en la otra. Para estas proteínas se tomó como criterio de corte que en la condición donde está presente la proteína, el número de péptidos identificados sea al menos de 6-7 (Valor de PSM-peptide-spectrum match) en las tres réplicas, y en la otra condición 0 PSM. Estas se denominaron proteínas ON / OFF (Nilsson *et al.*, 2019).

Mediante el uso del programa de análisis de datos String (Szklarczyk *et al.*, 2019), se buscó a qué grupo de genes ortólogos (COGs, por sus siglas en inglés *cluster of orthologous genes*) pertenecía cada gen que codificaba las proteínas. Luego, con la base de datos de COGs del NCBI (National Center of biotechnology Information) (Galperin *et al.*, 2020) se los clasificó en categorías de COGs. Esta clasificación fue curada manualmente basándonos en la información obtenida en otros programas de análisis como KEGG (Ogata *et al.*, 1999) y la base de datos de genomas de *Pseudomonas* (Winsor *et al.*, 2016). Los genes correspondientes a las proteínas identificadas se compararon con aquellos identificados por análisis transcriptómico en Tribelli *et al.*, 2015.

Para determinar la correspondencia entre transcripción y traducción se utilizó la técnica RT-PCR *real time* (RT-qPCR) sobre algunos genes seleccionados que codifican proteínas observadas en el análisis proteómico, cuyo protocolo se detalla a continuación.

## 5. Experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real

### 5.1 Extracción de RNA

En primer lugar, se cosecharon las células de cultivos en fase estacionaria incubados a 8°C y 28°C en fase exponencial a 8°C por medio de centrifugación a 11500 rpm durante 2 minutos a 8°C. Se obtuvo un *pellet* celular al que se le agregó 1 ml de Trizol (MRC) bajo campana y se resuspendió hasta que se disgregó. Se agregaron 400 µl de cloroformo, también bajo campana, se incubó durante 3 minutos y luego se centrifugó durante 15 minutos a máxima velocidad. Posterior a la centrifugación, se transfirieron 500 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo, se les agregó 450 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos luego de lo cual se centrifugó 30 minutos a máxima velocidad. Se eliminó el sobrenadante, se lavó el *pellet* con 350 µl de etanol 70% y se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, el *pellet* se dejó secar completamente a temperatura ambiente y se resuspendió con 20-30 µl de agua libre de nucleasas. Este procedimiento se realizó para todos los cultivos líquidos y sus correspondientes réplicas.

Luego de la extracción, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% m/v para verificar la integridad del RNA extraído (60 mA y 100 V), determinando además la concentración del RNA extraído utilizando un equipo de Nanodrop. Una vez verificada la integridad se realizó el tratamiento con DNAsa I (Promega) siguiendo las instrucciones del



fabricante. Posteriormente, para detectar posible contaminación con DNA se realizó una PCR utilizando como templado el RNA tratado y *primers* del rRNA 16S (**Tabla 4 MyM**), utilizando como control positivo DNA genómico de *P. extremaustralis*. La mezcla de reacción se realizó como se muestra en la **Tabla 1 MyM** y el programa de PCR en la **Tabla 2 MyM**.

Dado que el RNA es muy inestable y que debe ser protegido de la acción de RNAsas, durante su manipulación se trabajó en todo momento con guantes, en superficies limpias aplicando una solución de RNasa-zap (Anexo Materiales y Métodos) que permite eliminar las RNAsas presentes. Asimismo, se utilizaron pipetas y *tips* especiales para manejo de RNA, así como agua libre de RNAsas.

**Tabla 1 MyM:** Mezcla de reactivos utilizados para la reacción de PCR para detección de DNA contaminante.

Reactivos	Volumen por tubo (µl)	Concentración Final
Buffer 10X	2	1X
dNTPs	2	0,2 mM
Mix de <i>primers</i> rRNA16S	2	0,5 µM
Templado	2 de una dilución 1/50	-
TAQ polimerasa	0,25	-
H <sub>2</sub> O miliQ	11,15	-
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,6	1,5 mM
<b>Volumen Final</b>	<b>20</b>	-

**Tabla 2 MyM:** Programa de PCR para verificación de correcta digestión con DNasa.

	Desnaturalización Inicial	Desnaturalizació	<i>Annealing</i>	Extensión	Extensión Final
Temperatura (°C)	94	94	58	72	72
Tiempo	8	30 seg	30 seg	30 seg	5 min
Cantidad de ciclos	1	35			1

## 5.2 Transformación de RNA a cDNA

Una vez aislado el RNA se transformó a cDNA con la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) de Promega y hexámeros *random* de Biodynamics. Brevemente, se tomaron entre 0,5 y 2 µg de RNA y se mezclaron con 0,5 µl de hexámeros *random* de modo de no superar un volumen de 15 µl. Se incubó a 70 °C por 5 minutos, para

desnaturalizar posibles estructuras secundarias del templado, luego de lo cual se colocó inmediatamente en hielo para evitar que se vuelvan a generar estas estructuras. A continuación, se agregaron los reactivos de la **Tabla 3 MyM** y se incubó a 37 °C por 1 hora.

**Tabla 3 MyM:** Mezcla de reactivos utilizados para transformar RNA a cDNA.

Reactivos	Volumen (µl)
Buffer 5X	5
Mix dNTPs (10 mM)	5
RNAsin	0,25 (25 unidades)
M-MLV RT	1 (2000 unidades)
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	A volumen
<b>Volumen Final</b>	<b>25</b>

### 5.3 PCR cuantitativa en tiempo real

Luego del análisis proteómico realizado en el inciso 4, se seleccionaron los genes *hmgA* y *cspA* para analizar la expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Como en el laboratorio se contaba con *primers* de *hmgA* se diseñaron los *primers* para *cspA*. El diseño se realizó utilizando la plataforma Primer Blast del NCBI, considerando la secuencia codificante del gen. Además, los *primers* se diseñaron de forma tal que amplifiquen productos de menos de 200 pares de bases. Los *primers* utilizados en la RT-qPCR se detallan en la **Tabla 4 MyM**. Se utilizó además el gen que codifica el 16S rRNA como referencia.

**Tabla 4 MyM:** Características de los oligonucleótidos diseñados para realizar la RT-qPCR. Se indica la temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>), el porcentaje de GC (guanina + citosina) y el tamaño del producto en pares de bases (pb).

Gen	<i>Primers</i> (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	% GC	Tamaño del producto (pb)
<i>hmgA</i>	<i>Forward</i> : CCTTTCGGGTTTTGGCAATGA	59,66	47,62	169
	<i>Reverse</i> : GATGCGATACAGCCAGGTCC	60,60	60,00	
<i>cspA</i>	<i>Forward</i> : TGTCTAATCGCCAAACTGGTA	57,03	42,86	192
	<i>Reverse</i> : CTCAGCTTGCATGCCTTTC	58,01	50,00	
16S RNA	<i>Forward</i> : CTGTGTAGCGGTGAAATGCG	59,90	55,00	208
	<i>Reverse</i> : CCCAGGCGGTCAACTTAAT	60,03	55,00	

A continuación, se determinó la temperatura óptima de *annealing* de los *primers* de *cspA* mediante un programa con gradiente de temperatura de entre 48,5 °C y 54 °C y una dilución

1/30 de ADN genómico extraído previamente en el laboratorio. El programa se detalla en la **Tabla 5 MyM** e incluye al final de este una curva de *melting* de 75 °C a 95°C. Se seleccionó una temperatura en la cual se observaba un pico único en la curva de *melting* y un Ct menor a 30 (50°C).

**Tabla 5 MyM:** Programa de RT-qPCR del gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de *annealing*.

	Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	<i>Annealing</i>	Extensión
Temperatura (°C)	94	95	48,5 - 54	72
Tiempo	15 min	30 seg	20 seg	20 seg
Cantidad de ciclos	1	35		

Se purificó el cDNA mediante una columna conteniendo Sephadex G-100 ultrafino (DNA-grade) equilibrado en buffer Tris-HCl pH=8 para eliminar los reactivos remanentes de la reacción de pasaje a cDNA. La cuantificación relativa de los genes se realizó con el método de la curva estándar relativa (Larionov *et al.*, 2005). Brevemente, se realizaron curvas de calibración para cada gen utilizando diluciones seriadas al medio de una muestra de cDNA entre 1/2,5 y 1/20 para *cspA* y *hmgA* y entre 1/20 y 1/160 para el rRNA 16S. Se graficó el Ct vs.  $\log_2$  de cada dilución y a partir de cada una de las ecuaciones obtenidas se calcularon las concentraciones relativas de ambos genes para todas las muestras. Se relativizó la concentración de los genes a la del rRNA 16S. Los reactivos utilizados y el programa de RT-qPCR se detallan en la **Tabla 6 y 7 MyM**. El programa incluye al final de este una curva de *melting* de 75 °C a 95°C. Se realizaron 2 réplicas biológicas de las 3 condiciones indicadas en el inciso 5.1 y 3 réplicas técnicas de cada cDNA obtenido. Las RT-qPCRs se realizaron utilizando un MyiQ2 Two Color Real-Time PCR Detection System (BIO RAD).

**Tabla 6 MyM:** Reactivos utilizados para la RT-qPCR

Reactivos	Volumen por tubo (µl)
H <sub>2</sub> O miliQ	7
Mix de <i>primers</i> 5 µM	1
Mix Real Time (Syber Green, Inbio) 2X	10
cDNA	2
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

**Tabla 7 MyM:** Programa de RT-qPCR para cuantificación relativa de la expresión de genes

	Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	<i>Annealing</i>	Extensión
Temperatura (°C)	95	95	50	72
Tiempo	15 min	30 seg	20 seg	20 seg
Cantidad de ciclos	1	38		
Temperatura (°C)	95	95	58	72
Tiempo	15 min	30 seg	20 seg	15 seg
Cantidad de ciclos	1	38		

## 6. Análisis estadísticos

Para la realización de determinaciones estadísticas se utilizó el *software* GraphPad Prism 8. La significancia de cada tratamiento se evaluó mediante la prueba t de Student con  $P < 0,05$  considerada como significativa o mediante la prueba ANOVA de dos factores (comparación múltiple de Tukey) con  $P < 0,05$ .

## ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS

### Composición de medios de cultivo

#### Luria Bertani (LB) (por litro):

Triptona .....	10 g
NaCl .....	10 g
Extracto de levadura .....	5 g
H <sub>2</sub> O bd .....	a volumen
Agar (para medios sólidos) .....	20 g

#### Medio E2 (por litro)

NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O .....	3,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O .....	7,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3,7 g
Suplementar luego de autoclavar con	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (1M) .....	10ml
Microelementos .....	10ml

#### Medio NBRIP (por litro)

MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O .....	5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (1M) .....	0,25 g
KCl .....	0,20 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,10 g
Suplementar luego de autoclavar con	
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	5 g

#### Medio King B (por litro)

Triptona .....	10 g
Peptona de carne .....	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5 g
Suplementar luego de autoclavar con:	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (1M) .....	1 ml

**Medio de swarming** (por litro)

Empleado para estudios de motilidad

Medio E2 (2X).....	500 ml
Glucosa o mioinositol .....	10 g (1%)
Agar .....	6 g (0,6%)
H <sub>2</sub> O bd.....	A volumen

**Medio de swimming** (por litro)

Empleado para estudios de motilidad

Medio E2 (2X).....	500 ml
Glucosa o mioinositol .....	10 g (1%)
Agar .....	3 g (0,3%)
H <sub>2</sub> O bd.....	A volumen

**Soluciones****RNasa ZAP** (cada 100 ml)

Lavandina .....	5 ml (5%)
SDS 10% .....	1 ml (0,1%)
H <sub>2</sub> O bd .....	a volumen
NaOH 10 M .....	500 µl (0,05 M)

# ***RESULTADOS***

## Estudio del crecimiento utilizando mioinositol como única fuente de carbono

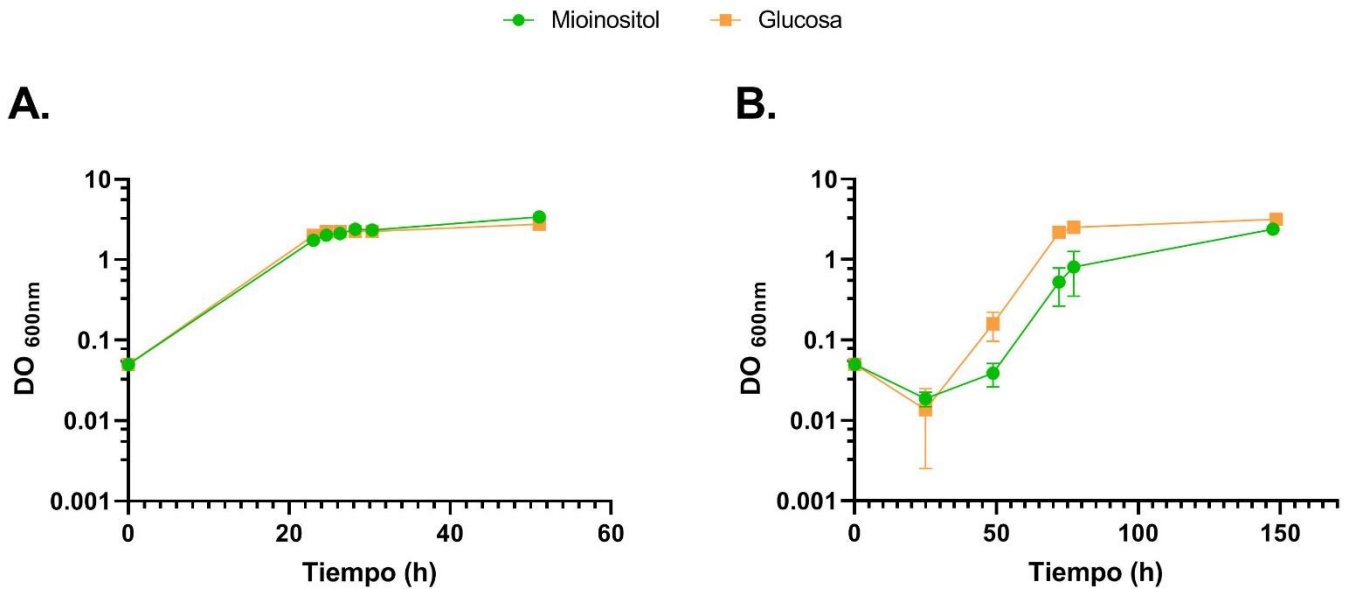
El inositol es un compuesto orgánico que se encuentra presente en tejidos animales y vegetales (Loewus y Murty, 2000; Wood y Stanway, 2001). Existen distintos estereoisómeros y el más común es el mioinositol. En especial, se sugiere su rol en relación a la interacción planta-bacteria debido a su presencia en la rizosfera (Kohler *et al.*, 2011) y se ha reportado que la vía catabólica del inositol juega un papel clave en el éxito de la nodulación en la bacteria *Sinorhizobium meliloti* en las raíces de las plantas (Kohler, *et al.*, 2010).

Trabajos anteriores de este laboratorio mostraron que en cultivos microaeróbicos de *P. extremaustralis* en medio LB expuestos a GSNO aumentaba la expresión de los genes que codifican enzimas centrales del catabolismo del inositol (Solar Venero, 2020). Sin embargo, a la fecha no existen reportes que indiquen si *P. extremaustralis* puede utilizar mioinositol como única fuente de carbono.

Con este objetivo se estudió el crecimiento de *P. extremaustralis* 14-3b utilizando mioinositol como única fuente de carbono en distintas condiciones de aireación (aerobiosis y microaerobiosis) y a diferentes temperaturas dado que con otras fuentes de carbono puede crecer en estas condiciones. Inicialmente se analizó el crecimiento en placa utilizando medio E2 sólido suplementado con mioinositol 1% o con octanoato de sodio 0,25% tanto a 8°C como a 28°C. *P. extremaustralis* fue capaz de crecer con mioinositol a ambas temperaturas en forma similar a lo observado en octanoato de sodio, una fuente de carbono (ácido graso) utilizada por esta bacteria.

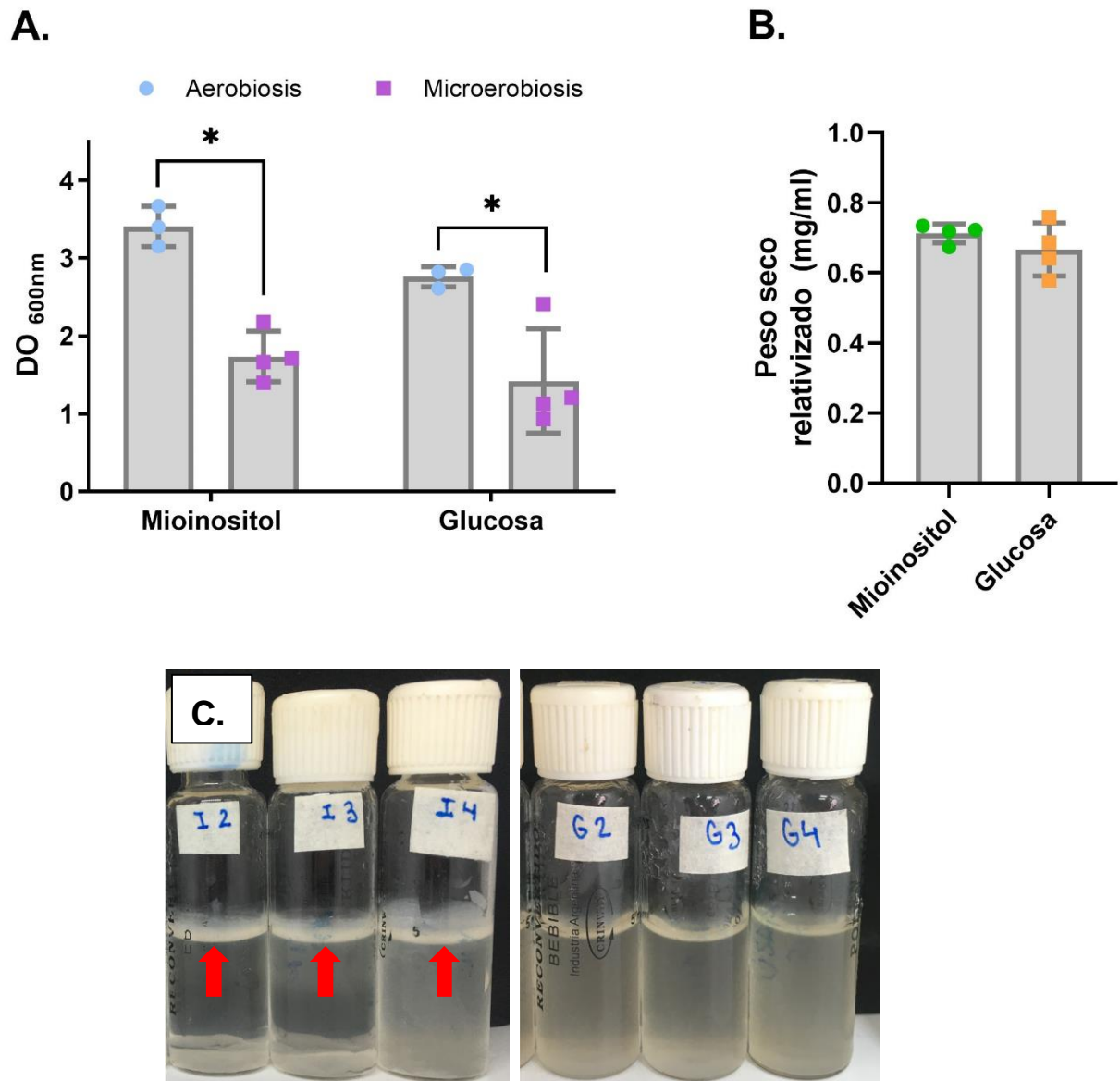
Teniendo en cuenta estos resultados se realizaron curvas de crecimiento en medio E2 suplementado con glucosa, una fuente de carbono más similar al inositol en comparación con octanoato y que *P. extremaustralis* es capaz de utilizar, o mioinositol incubando a 8°C o 28°C. En la **Figura 1R A** se observa que el crecimiento de *P. extremaustralis* con mioinositol a 28°C no presenta diferencias respecto al crecimiento con glucosa a lo largo del experimento. La  $DO_{600nm}$  alcanzada al final del experimento fue de aproximadamente 3 en ambos casos. Asimismo, a 8°C, la curva de crecimiento mostró un patrón similar entre los cultivos realizados con ambas fuentes de carbono, si bien se observa a partir de las 50 horas un crecimiento algo mayor con glucosa (**Figura 1R B**). Los cultivos suplementados con glucosa alcanzaron una  $DO_{600nm}$  de  $3,18 \pm 0,06$  tras 148 h de incubación, mientras que con mioinositol alcanzaron una  $DO_{600nm}$  de  $2,40 \pm 0,12$ .





**Figura 1R:** Curvas de crecimiento en medio E2 suplementado con mioinositol o glucosa. **A.** temperatura de incubación 28°C. **B.** temperatura de incubación 8°C. Los valores representan media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes.

Como se mencionó anteriormente, estudios previos mostraron que la vía del catabolismo del inositol se activaba en condiciones microaeróbicas. Por ello, se realizaron además cultivos en bajas tensiones de oxígeno incubados durante 48 horas. No se hallaron diferencias significativas entre la DO<sub>600nm</sub> de los cultivos con mioinositol y los cultivos con glucosa (**Figura 2R A**). Se alcanzó una DO<sub>600nm</sub> de alrededor de 1,5 en ambos casos. Dado que en microaerobiosis los cultivos presentaban *biofilm* en la interfase aire-medio, en especial aquellos suplementados con mioinositol (**Figura 2R C**), y que esto probablemente afectaba la medición de densidad óptica se decidió comparar el peso seco de los cultivos. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre ambas fuentes de carbono (**Figura 2R B**), lo cual concuerda con los resultados obtenidos de la DO<sub>600nm</sub>. En cultivos aeróbicos con el mismo tiempo de incubación la DO<sub>600nm</sub> fue significativamente mayor comparado con cultivos microaeróbicos (**Figura 2R A**).



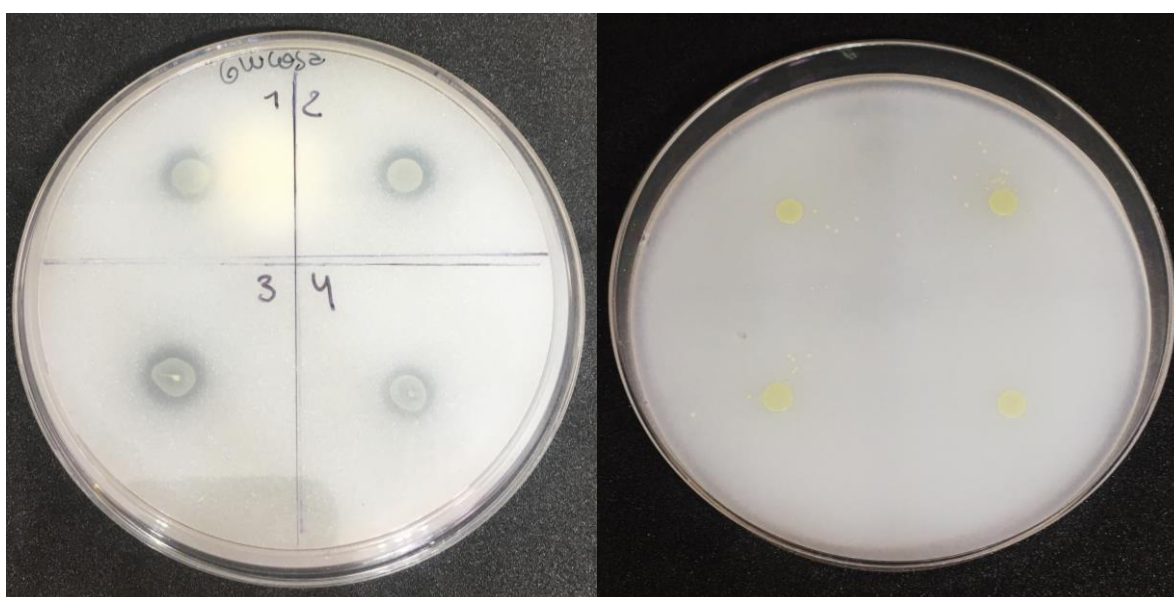
**Figura 2R:** Caracterización del crecimiento en medio E2 suplementado con mioinositol o glucosa 1% incubado por 48 h en distintas condiciones de aireación. **A.** Determinación de la DO<sub>600nm</sub>. Los asteriscos (\*) denotan diferencias significativas utilizando la prueba de ANOVA ( $P < 0,05$ ). **B.** Determinación del peso seco celular relativizado. **C.** Cultivos microaeróbicos representativos suplementados con mioinositol 1% (izquierda, la flecha roja señala el *biofilm*) o con glucosa 1% (izquierda).

### Análisis de características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal en microaerobiosis

*P. extremaustralis* es una bacteria con algunas características de promoción de crecimiento vegetal (Ibarra, 2017), y dado que el mioinositol es un compuesto que posee un

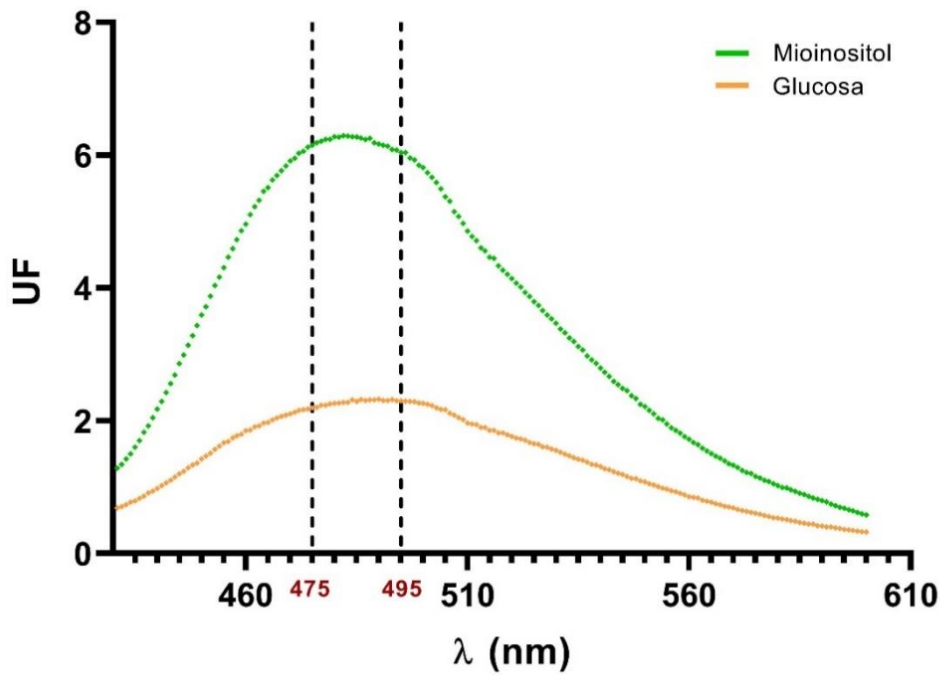
rol en la interacción planta-bacteria en la rizosfera (Kohler *et al.*, 2011) se estudió si el crecimiento con esta fuente de carbono mejora estas características en la bacteria.

En primer lugar, se analizó la capacidad de solubilizar fosfatos en medio sólido. Los cultivos microaeróbicos suplementados con glucosa como única fuente de carbono formaron en promedio un halo de solubilización de  $0,76 \pm 0,05$  cm, mientras que los suplementados con mioinositol no presentaron halos de solubilización. Sin embargo, los *spots* bacterianos de estos últimos presentaron un color verdoso/amarillento que no se observaba en las placas suplementadas con glucosa (**Figura 3R**).

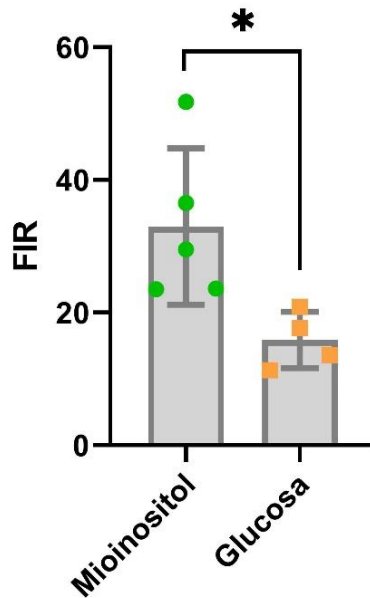


**Figura 3R:** Placas de solubilización de fosfatos en medio NBRIP suplementados con glucosa (izquierda) o mioinositol (derecha).

Este último resultado nos llevó a preguntarnos si en *P. extremaustralis* la presencia de mioinositol en el medio de cultivo incrementaba la producción de pioverdinas en microaerobiosis. Para ello, se realizaron cultivos microaeróbicos en King B suplementados con mioinositol o glucosa y se cuantificaron las pioverdinas presentes en el sobrenadante utilizando un fluorímetro. En la **Figura 4R** se muestran curvas representativas de los espectros de emisión de fluorescencia de los sobrenadantes de los cultivos. Dado que el máximo de fluorescencia se observó entre 475 nm y 495 nm, y que este intervalo incluía a la longitud de onda de 485 nm utilizada por Ruiz *et al.* (2015), para cuantificar pioverdinas por fluorescencia se integró el área bajo las curvas entre estas longitudes de onda. La producción de pioverdinas fue significativamente mayor en mioinositol respecto a glucosa (**Figura 5R**,  $P < 0,05$ ).



**Figura 4R:** Espectros de emisión de fluorescencia representativos de sobrenadantes de cultivos microaeróbicos de 48h realizados en medio King B suplementado con mioinositol o glucosa 1%. Longitud de onda de excitación: 420 nm. Las líneas punteadas indican el área integrada bajo la curva. UF: unidades de fluorescencia.

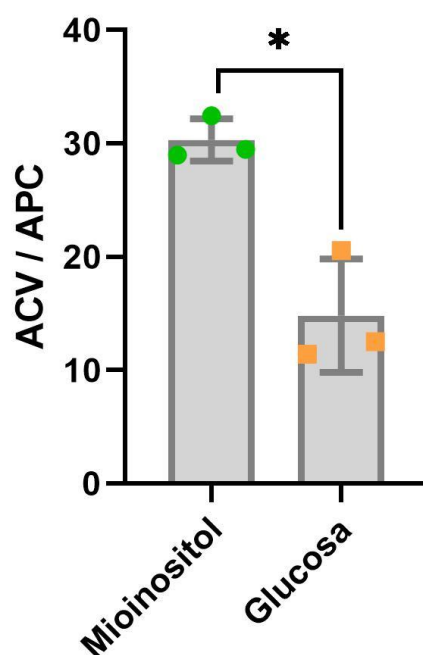


**Figura 5R:** Cuantificación de ploverdinas en el sobrenadante de cultivos microaeróbicos realizados en medio King B suplementados con mioinositol o glucosa 1% incubados por 48 h. La fluorescencia integrada entre 475 nm y 495 nm se relativizó al peso seco por mililitro y se expresa como fluorescencia integrada relativizada (FIR). El asterisco (\*) denota diferencias significativas utilizando una prueba de t no paramétrica ( $P < 0,05$ ).

Adicionalmente se estudió la producción de ácido indolacético (AIA) en cultivos microaeróbicos de 48 h suplementados con glucosa o con mioinositol más el agregado de triptófano necesario para la producción de este compuesto, pero no se detectó la presencia de AIA en ninguno de los cultivos.

### Estudio de la formación de *biofilms*

En los cultivos microaeróbicos suplementados con mioinositol observamos una gran cantidad de *biofilm* en la interfase aire-medio lo cual no se observó en cultivos suplementados con glucosa (**Figura 2R C**). Debido a esto, se evaluó la capacidad de formación de *biofilms* que es una función que puede impactar en la resistencia al estrés y la capacidad de colonizar raíces. Se utilizó la técnica del cristal violeta en placas multipocillo de poliestireno. En este ensayo, se observó un mayor índice de formación de *biofilms* cuando las células provenían de cultivos suplementados con mioinositol respecto a suplementados con glucosa (**Figura 6R**,  $P < 0,05$ ).

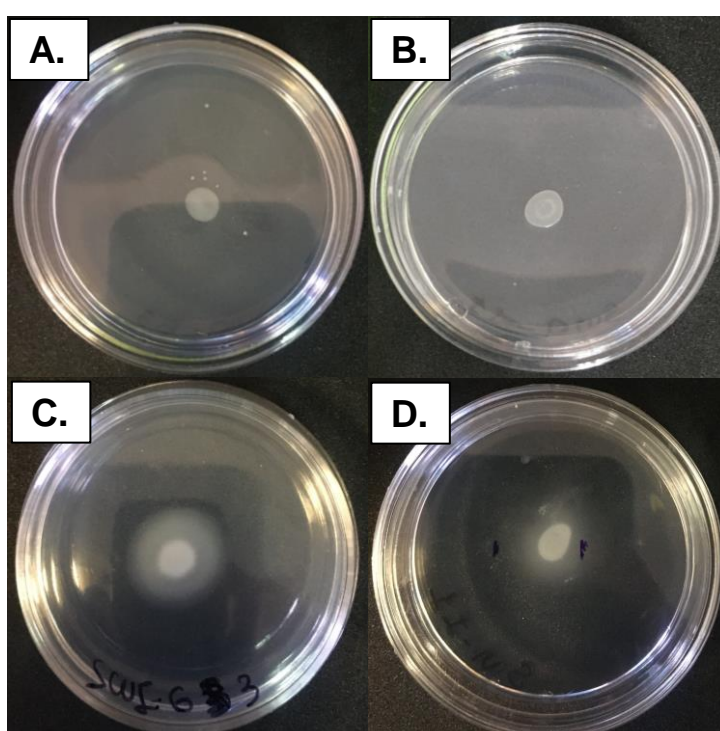


**Figura 6R:** Análisis de la formación de *biofilms* en cultivos microaeróbicos de 48 h. Las barras representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes con 5 repeticiones (pocillos) por condición. Los asteriscos (\*) denotan diferencias significativas usando una prueba de t ( $P < 0,05$ ).

## Análisis del efecto del mioinositol en la movilidad bacteriana

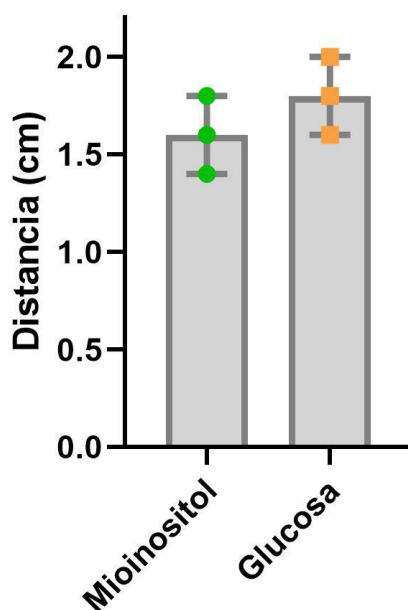
La motilidad bacteriana es una función con relevancia en la adaptación al ambiente y la interacción con otros organismos. Con el objetivo de estudiar la influencia del mioinositol en la motilidad de *P. extremaustralis* proveniente de cultivos con baja disponibilidad de oxígeno se realizaron ensayos de *swimming* y *swarming*.

En la **Figura 7R A y B** puede observarse que *P. extremaustralis* no mostró capacidad de *swarming* tanto en cultivos suplementados con glucosa o con mioinositol. Por otro lado, se observó motilidad de tipo *swimming* en cultivos suplementados con alguna de estas fuentes de carbono (**Figura 7R C y D**).



**Figura 7R:** Ensayos de motilidad en medio E2 suplementado con glucosa o mioinositol 1%. **A.** *Swarming* en glucosa. **B.** *Swarming* en mioinositol. **C.** *Swimming* en glucosa. **D.** *Swimming* en mioinositol. Las placas fueron inoculadas con cultivos microaeróbicos suplementados con las mismas fuentes de carbono.

Se cuantificó la motilidad de tipo *swimming* en células provenientes de cultivos suplementados con mioinositol o glucosa, no se hallaron diferencias significativas (**Figura 8R**).



**Figura 8R:** Cuantificación de la motilidad de tipo *swimming*. Las barras representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes.

Si bien los resultados mostraron mayor desarrollo de *biofilm* con inositol respecto a glucosa, los resultados muestran que la movilidad de *P. extremaustralis* no fue afectada por la fuente de carbono utilizada, dado que se comportó de igual manera frente a ambos tipos de movilidad analizada.

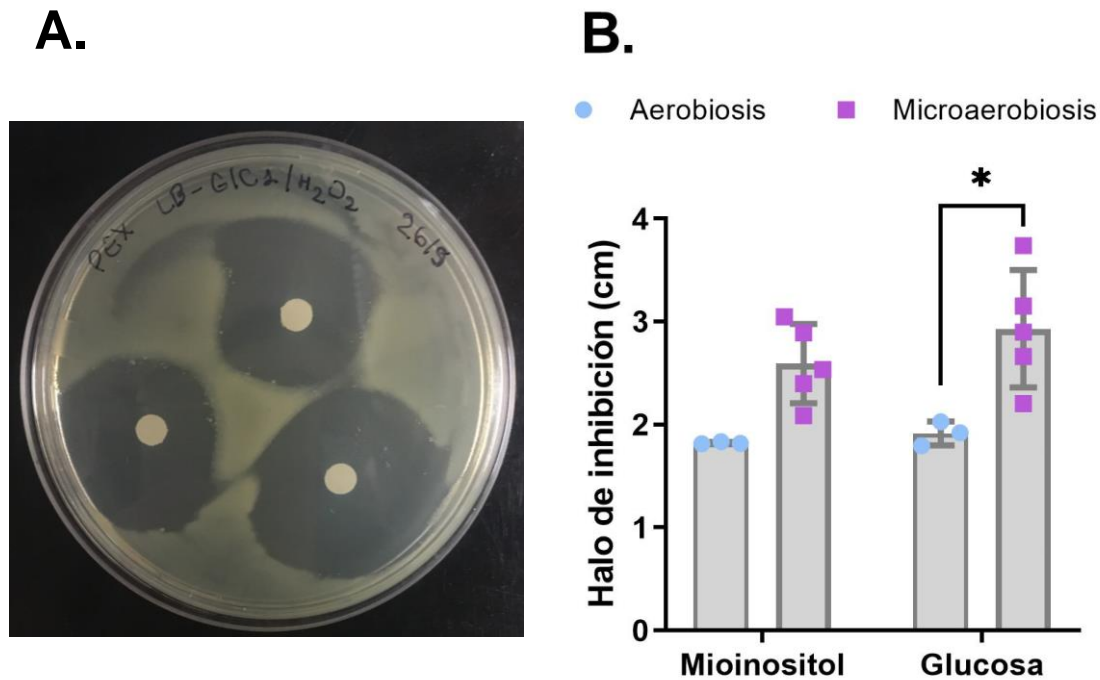
### Resistencia estrés oxidativo en distintas condiciones de aireación

Los microorganismos se encuentran frecuentemente en ambientes heterogéneos, con gradientes de oxígeno, nutrientes y temperatura. Por ejemplo, en el suelo, en los *biofilms* y en distintas partes de las plantas existen gradientes de oxígeno, por lo que los microorganismos que se adaptan a ellos poseen una batería bien desarrollada de metabolismos para la obtención de energía. Por otro lado, la respiración aeróbica es fuente de ROS. *P. extremaustralis*, es capaz de utilizar tanto oxígeno como nitrato como aceptores de electrones, sobreviviendo en distintas condiciones de aireación y utilizando distintas fuentes de carbono, por lo que resulta un modelo interesante para analizar el efecto del mioinositol en la resistencia a estrés oxidativo.

La resistencia al estrés oxidativo de cultivos aeróbicos o microaeróbicos se determinó mediante el método de sensibilidad al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en discos en medio sólido (**Figura 9R A**). Los cultivos aeróbicos suplementados con mioinositol o glucosa como única fuente de carbono mostraron halos de inhibición similares ( $1,91 \pm 0,12$  cm glucosa;  $1,82 \pm$



0,01 cm mioinositol). La misma tendencia se observó en condiciones microaeróbicas ( $2,93 \pm 0,57$  cm glucosa,  $2,59 \pm 0,39$  cm mioinositol). Sin embargo, se hallaron diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición de cultivos suplementados con glucosa en aerobiosis vs microaerobiosis ( $P < 0,05$ ), mostrando mayor sensibilidad en microaerobiosis. Estos resultados se resumen en la **Figura 9R B**.



**Figura 9R:** Ensayo de sensibilidad al  $H_2O_2$ . **A.** Experimento representativo de cultivos microaeróbicos. **B.** Cuantificación del ensayo de sensibilidad al  $H_2O_2$  en discos, aerobiosis (A) vs microaerobiosis (MA). Los valores representan media  $\pm$  SD de 5 (MA) y 3 (A) experimentos independientes. Los asteriscos (\*) denotan diferencias significativas utilizando la prueba de ANOVA ( $P < 0,05$ ).

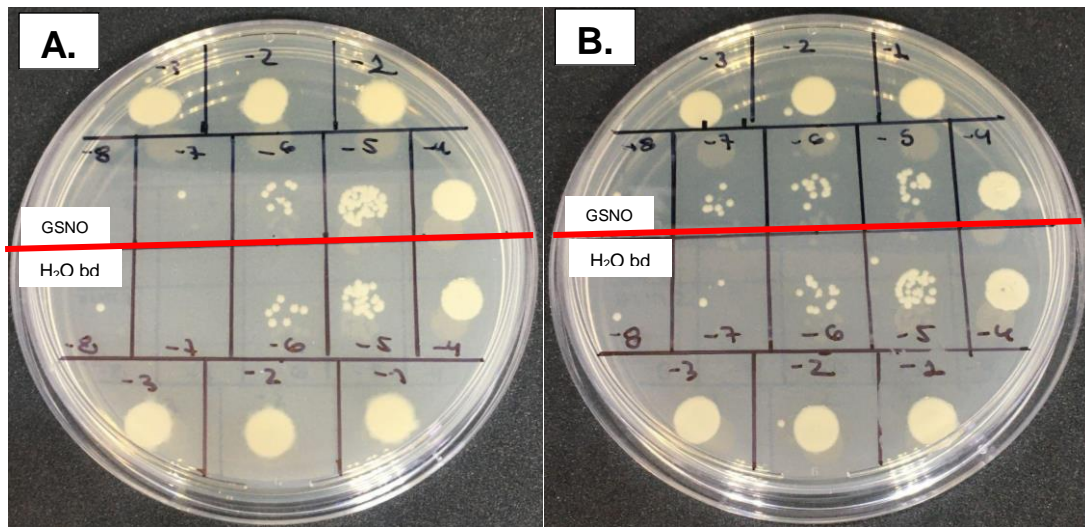
### Efectos fisiológicos de la exposición a estrés nitro-oxidativo en microaerobiosis

Como se mencionó previamente, estudios anteriores de este laboratorio mostraron que ante la presencia de estrés nitrosativo (GSNO) en microaerobiosis *P. extremaustralis* sobreexpresa genes del catabolismo del inositol (Solar Venero, 2020). A partir de estos resultados, nos propusimos estudiar si el mioinositol protege contra el daño generado por estas fuentes de estrés nitrosativo en microaerobiosis.

En primer lugar, se estudió si el mioinositol protegía a *P. extremaustralis* contra el estrés generado por el GSNO. Para esto, se analizó el efecto de la exposición al GSNO en cultivos suplementados con glucosa o mioinositol por ensayo de recuento en gota (**Figura 10R**). En las condiciones ensayadas el GSNO no tuvo un efecto muy marcado sobre la supervivencia,



si bien los cultivos con mioinositol mostraron un número de colonias levemente inferior a aquellos realizados con glucosa (**Figura 10R**).



**Figura 10R:** Estimación de las unidades formadoras de colonias de cultivos microaeróbicos en medio mínimo suplementado con mioinositol (**A**) y glucosa (**B**). expuestos durante 1 hora a GSNO 100  $\mu$ M. Se muestran distintas diluciones provenientes de los distintos cultivos sembradas en placas de LB. En cada placa: por encima de la línea roja tratamiento con GSNO, por debajo tratamiento control con H<sub>2</sub>Obd.

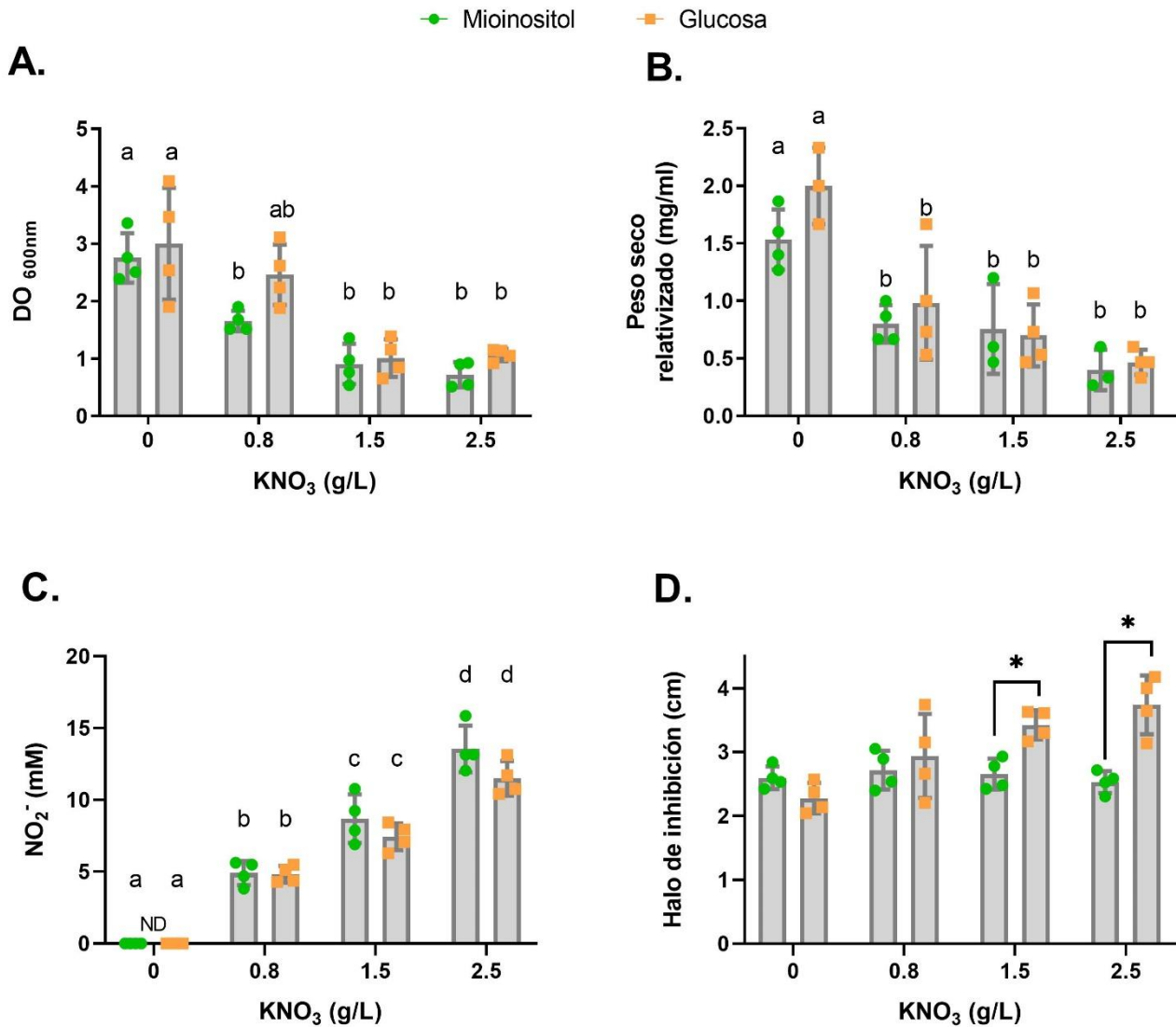
Adicionalmente, se analizó el efecto del nitrito. Se estudió si el crecimiento bacteriano utilizando mioinositol o glucosa como única fuente de carbono se veía afectado diferencialmente por el tratamiento con concentraciones crecientes de KNO<sub>3</sub>. *P. extremaustralis*, como se describió anteriormente, es capaz de reducir el nitrato a nitrito y en esta bacteria las concentraciones de nitrato de potasio que fueron determinadas como adecuadas en medio LB o NE2 son de 0,8-1 g/L. Los resultados mostraron que en cultivos suplementados con glucosa o mioinositol el crecimiento disminuyó para las 3 concentraciones de nitrato analizadas respecto al control sin nitrato, excepto la DO<sub>600nm</sub> para cultivos suplementados con 0,8 g/L KNO<sub>3</sub> y glucosa (**Figura 11R A y B**). Si bien no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre las 3 concentraciones de KNO<sub>3</sub> en las **Figuras 11R A y B** se observa una tendencia a que el crecimiento disminuya a medida que aumenta la concentración de nitrato. Esta tendencia concuerda con un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en la concentración de nitritos en el sobrenadante de estos cultivos que se incrementa a medida que aumenta la concentración nitrato en ambas fuentes de carbono utilizadas (**Figura 11R C**). Adicionalmente, se calculó el porcentaje de nitrato transformado a nitrito (**Tabla 1R**) para analizar si esta se veía afectada diferencialmente en alguna condición. No se observaron diferencias entre los cultivos con las distintas fuentes de carbono y,

asimismo, la eficiencia fue similar, disminuyendo levemente en las concentraciones más altas de nitrato en concordancia con los resultados de crecimiento.

**Tabla 1R:** Porcentaje de  $\text{NO}_3^-$  transformado a  $\text{NO}_2^-$  en cada concentración. Se indica media  $\pm$  SD.

<b><math>\text{KNO}_3</math> (g/L)</b>	<b>Mioinositol</b>	<b>Glucosa</b>
0,8	62,0 $\pm$ 10,5	60,2 $\pm$ 7,40
1,5	58,6 $\pm$ 11,4	50,0 $\pm$ 6,3
2,5	54,8 $\pm$ 6,6	46,5 $\pm$ 4,9

Se estudió también la resistencia a estrés nitro-oxidativo exponiendo cultivos realizados con distintas concentraciones de nitrato al  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En cultivos con mioinositol no se hallaron diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición a ninguna de las concentraciones de nitrato analizadas. Respecto a los cultivos con glucosa, aquellos realizados con baja concentración (0,8 g/L) o sin nitrato mostraron menor sensibilidad al peróxido de hidrógeno que los realizados a altas concentraciones (**Figura 11R D**). A altas concentraciones de  $\text{KNO}_3$  (1,5 g/L o 2,5 g/L) se observó una mayor resistencia al estrés oxidativo en cultivos que contenían mioinositol en comparación con los que contenían glucosa mostrando un efecto protector de este compuesto (**Figura 11R D**).



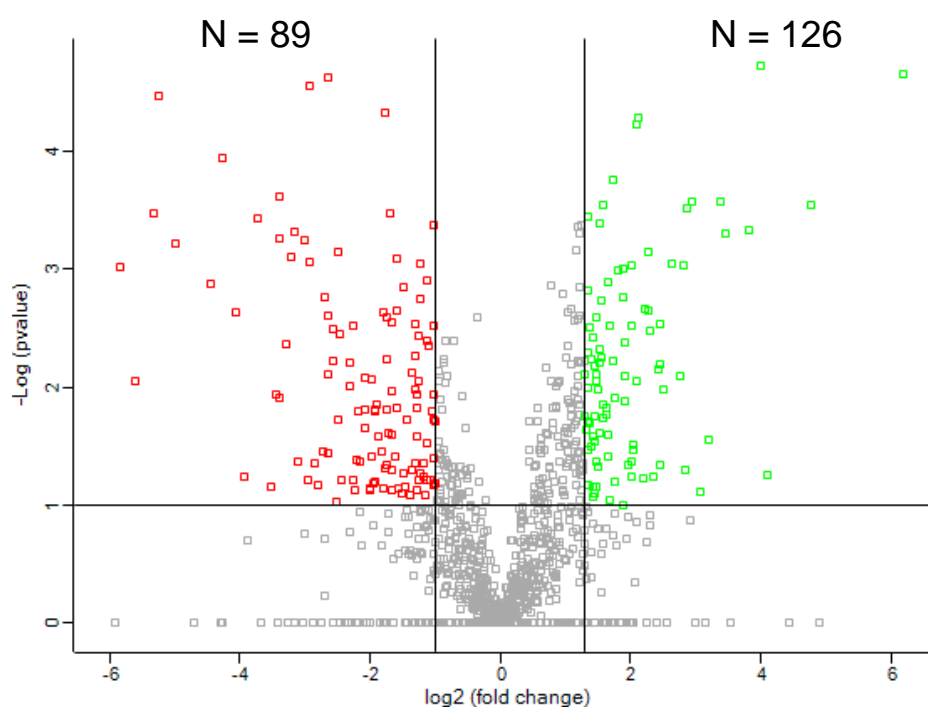
**Figura 11R:** Ensayos en cultivos en condiciones microaeróbicas de E2 suplementados con mioinositol o glucosa 1% y concentraciones crecientes de KNO<sub>3</sub> incubados por 48 h. **A.** Crecimiento medido como DO<sub>600nm</sub>. **B.** Crecimiento estimado como peso seco celular relativizado al volumen del cultivo. **C.** Determinación de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en el sobrenadante de los cultivos. ND: no detectable. **D.** Ensayo de sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio sólido. Los asteriscos (\*) o letras distintas denotan diferencias significativas utilizando la prueba de ANOVA (P <0,05).

### Análisis comparativo de los perfiles proteicos de *P. extremaustralis* entre 10°C y 28°C

Con el objetivo de ampliar el estudio de la adaptación de *P. extremaustralis* a condiciones estresantes, tales como exposición a bajas temperaturas por tiempo prolongado, se realizó un análisis proteómico (durante las restricciones al trabajo presencial debido a la pandemia mundial provocada por el virus Sarscov2) a partir de datos disponibles en el laboratorio. Los

datos analizados provenían de cultivos realizados en LB suplementado con octanoato de sodio 0,25% m/v en condiciones aeróbicas incubados a 10°C por 72 h y 28°C por 24 h. En ambos casos se trata de cultivos en fase estacionaria de crecimiento.

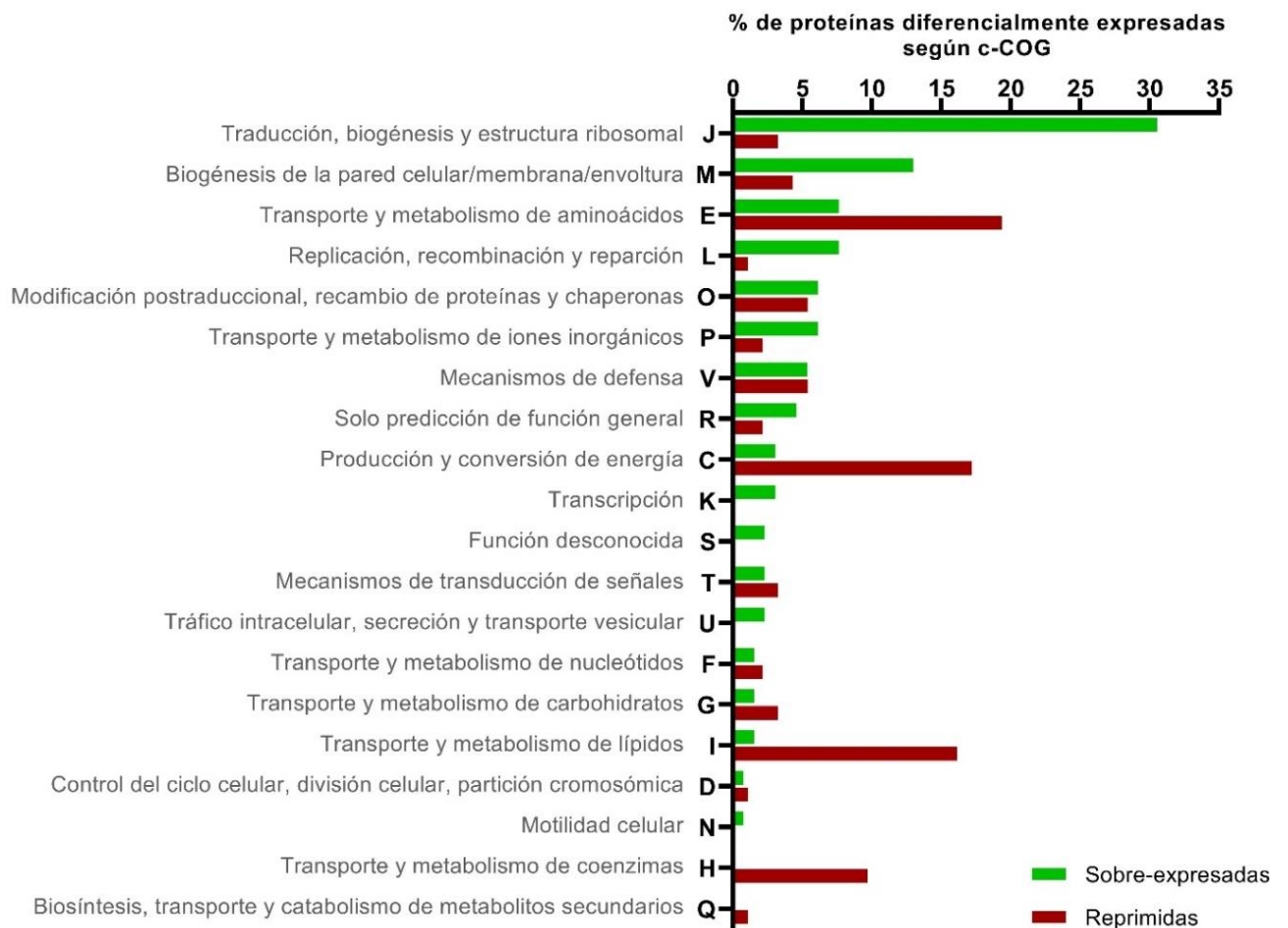
El análisis del proteoma de *P. extremaustralis* en las condiciones evaluadas permitió detectar 215 proteínas con perfiles de expresión diferencial entre 10°C y 28°C, 89 de ellas reprimidas y 126 de ellas sobre-expresadas a 10°C con respecto a 28°C (**Figura 12R, Anexo Resultados Tabla 1 y 2**). Dentro de las proteínas con perfiles de expresión del tipo ON / OFF se hallaron 5 presentes a 10 °C, pero no a 28°C (ON) y 4 solo detectadas a 28 °C (OFF), lo que resulta en un total de 93 proteínas reprimidas y 131 sobre-expresadas a 10°C.



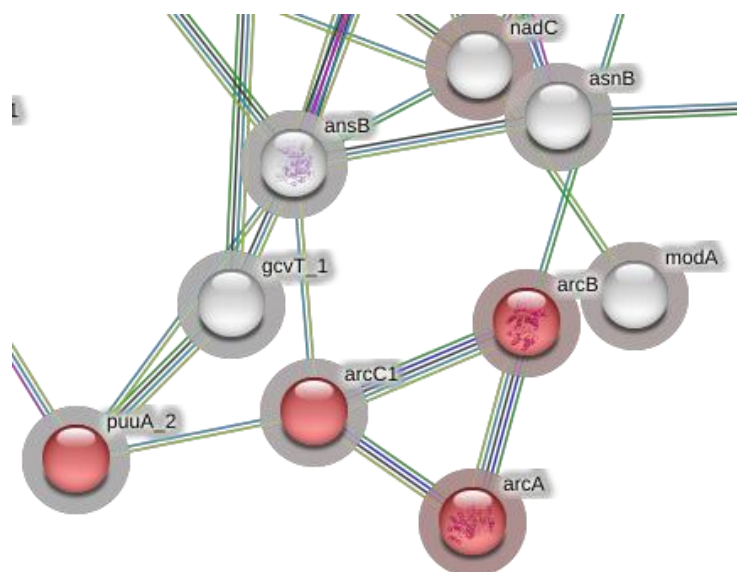
**Figura 12R:** Niveles de expresión de proteínas en crecimiento a 10°C en comparación con 28°C. *Volcano plot* que representa  $-\log$  (P-valor) vs  $\log_2$  (veces de cambio). Los círculos verdes (panel superior derecho) y rojos (panel superior izquierdo) representan proteínas sobre-expresadas y reprimidas ( $P < 0,05$ , veces de cambio  $> 2$ ) respectivamente. No se muestran las proteínas ON/OFF. 10°C vs 28°C.

Las proteínas que presentaban una expresión diferencial (incluyendo aquellas clasificadas como ON y OFF en las categorías sobre-expresadas y reprimidas, respectivamente) se clasificaron según su función utilizando la base de datos de COGs en categorías de COGs (c-COG) (**Figura 13R y Anexo Resultados Tabla 1 y 2**). Solo 3 proteínas hipotéticas reprimidas (PE143B\_0103055, PE143B\_0123210, PE143B\_0103165) no pudieron ser clasificadas según este criterio ya que sus genes no pertenecían a ningún grupo de genes ortólogos. Al analizar la clasificación se observó que la mayoría de las

proteínas sobre-expresadas a baja temperatura (31,25%) eran proteínas involucradas en la traducción y la estructura y biogénesis ribosomal (c-COG J). También se encontró una elevada proporción de proteínas relacionadas a la biogénesis de la pared, membrana o envoltura celular (c-COG M, 12,50%). Si bien se observó una baja proporción de proteínas relacionadas con la replicación, recombinación y reparación (c-COG L, 7,63%) 4 de las 10 estaban involucradas en la degradación del RNA. Asimismo, se hallaron 2 de este tipo de proteínas en el c-COG J, encontrándose en total 6 proteínas relacionadas con este proceso. En el análisis también se hallaron sobre-expresadas proteínas involucradas en mecanismos de defensa (c-COG V) entre ellas una chaperona de *cold shock* (*cspA*) y una catalasa (*cat*). En cuanto a las proteínas reprimidas, la mayoría fueron proteínas relacionadas con el transporte y metabolismo de aminoácidos (c-COG E, 19,35%) y lípidos (c-COG I, 16,13%), y la producción y conversión de energía (c-COG C, 17,20%). Respecto al metabolismo de aminoácidos, un análisis de enriquecimiento funcional realizado con la herramienta String mostró que a 28 °C hay un enriquecimiento (es decir un empobrecimiento a 8°C) de proteínas de la vía del catabolismo de la valina, leucina e isoleucina, del metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato y tirosina, así como la síntesis de arginina (**Figura 14R**). Dentro de la categoría de metabolismo de lípidos, se encontró un enriquecimiento de enzimas del metabolismo de PHAs (phasina, Poli(3-hidroxialcanoato) sintetasa, fosfato acetiltransferasa, 3-ketoacil-ACP reductasa). Por último, entre las enzimas asociadas a la producción y conversión de energía se hallaron una gran cantidad de citocromos y proteínas asociadas.



**Figura 13R:** Clasificación de proteínas diferencialmente expresadas según categoría de grupo de genes ortólogos (c-COG). Proteínas diferencialmente expresadas ( $P < 0,05$ ; veces de cambio  $> 2$  / Proteínas ON-OFF) a  $10^{\circ}\text{C}$  respecto a  $28^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 14R:** Parte del mapa de interacciones de proteínas reprimidas a  $10^{\circ}\text{C}$  respecto a  $28^{\circ}\text{C}$  generado en String. En rojo se muestran aquellas pertenecientes a la vía de la biosíntesis de la arginina que también mostraron enriquecimiento funcional.

Con el objetivo de estudiar si este perfil de expresión se correspondía con aquel de crecimiento temprano (fase exponencial) se analizó si las proteínas diferencialmente expresadas en fase estacionaria coincidían con los genes diferencialmente expresados en fase exponencial identificados por análisis transcriptómico en un trabajo previo del laboratorio (Tribelli *et al.*, 2015). De las 131 proteínas sobre-expresadas a 10 °C en fase estacionaria identificadas en el análisis proteómico solo 1 (*cold shock protein*, codificada por el gen *cspA*) sobre-expresa su gen en fase exponencial a la misma temperatura. Sin embargo, se encontró que los genes que codifican 14 de las proteínas que se encontraron sobre-expresadas se encontraron reprimidos en fase exponencial (**Tabla 2R**). Esto indicaría que hay un ajuste distinto de ciertos procesos en exposición temprana o tardía al frío.

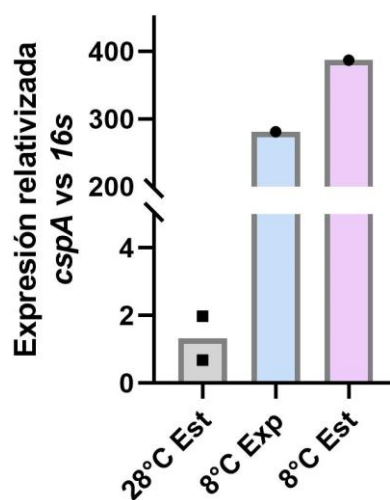
**Tabla 2R:** proteínas sobre-expresadas en fase estacionaria cuyos genes se encontraron reprimidos en fase exponencial.

Gen	Locus Tag	Función	C-COG
<i>aceA</i>	PE143B_0123985	Isocitrato liasa	C: Producción y conversión de energía
<i>mreB</i>	PE143B_0128290	Proteína determinante de la forma del bastón MreB	DZ: Control del ciclo celular, división celular, partición de cromosomas
<i>carB</i>	PE143B_0101750	Carbamoil-fosfato sintasa de cadena larga	EF Transporte y metabolismo de aminoácidos
	PE143B_0122450	Arginina N-succiniltransferasa	E: Transporte y metabolismo de aminoácidos
<i>purB</i>	PE143B_0123965	Adenilosuccinato liasa	F: Transporte y metabolismo de nucleótidos
<i>me</i>	PE143B_0122220	Ribonucleasa E	J: Traducción, biogénesis y estructura ribosomal
<i>bamA</i>	PE143B_0106280	Factor de ensamblado de proteína de membrana externa BamA	M: Biogénesis de la pared celular/membrana/envoltura
	PE143B_0124470	Transductor de energía TonB	
<i>yidC</i>	PE143B_0118535	Insertasa de proteína de membrana YidC	
<i>hflB</i>	PE143B_0101775	Metaloproteasa de cinc ATP-dependiente FtsH	O: Modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas
<i>bfrD</i>	PE143B_0116925	Canal controlado por ligando	P: Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
	PE143B_0101660	GTPasa	R: Solo predicción de función general
<i>YajC</i>	PE143B_0115215	Subunidad de preproteína translocasa YajC	U: Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
	PE143B_0101495	Proteína R enzima de restricción tipo I	V: Mecanismos de defensa

En cuanto a las proteínas reprimidas, en 28 de las 93 encontradas, los genes estuvieron también reprimidos en fase exponencial (**Anexo Resultados Tabla 2**). La mayoría de estas son proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (9) y citocromos y proteínas

asociadas con la conversión de energía (4). También se encontraron dos proteínas del metabolismo de lípidos y una superóxido dismutasa (*sod*). Esto muestra que ciertas funciones presentan una expresión disminuida en frío a comparación con 28°C, relacionada con el ajuste del metabolismo para el crecimiento a baja temperatura.

Adicionalmente, se analizó la expresión de genes individuales mediante RT-qPCR. Se eligieron para el análisis los genes *hmgA* (que codifica una proteína involucrada en la degradación de aminoácidos aromáticos) y *cspA* dado que se había detectado expresión de los mismos tanto en el proteoma como en el transcriptoma, siendo *hmgA* reprimido y *cspA* sobre-expresado en frío. Los experimentos se diseñaron teniendo en cuenta todas las comparaciones en cuanto a condiciones de crecimiento y temperatura. Sin embargo, surgieron algunas complicaciones en la extracción de RNA y en la realización de la RT-qPCR. En el caso de *hmgA* en las RT-qPCRs no se observó producto único en las curvas de *melting* por lo que no se pudo analizar su expresión. Para *cspA* se realizaron varios ensayos de puesta a punto para obtener valores de Ct adecuados. En la figura 14R se puede observar la expresión relativa del gen *cspA* respecto al gen que codifica el rRNA 16S. La expresión a 8°C en fase estacionaria de crecimiento fue mayor que a 28°C, lo cual concuerda con el resultado obtenido en el análisis proteómico para este gen. Al comparar la expresión a 8°C entre fases de crecimiento se observó que la expresión relativizada de ambos genes se encontraba en el mismo orden de magnitud (**Figura 15R**). Si bien es necesario contar con un mayor número de replicas para poder realizar la comparación estadística, los resultados muestran que *cspA* se sobre-expresa en frío a lo largo de las distintas fases de crecimiento.



**Figura 15R:** Expresión relativa de *cspA* vs 16S rRNA en distintas fases de crecimiento y temperaturas. Exp: fase de crecimiento exponencial. Est: fase de crecimiento estacionaria.



# ***DISCUSIÓN***

La capacidad de las especies bacterianas de hacer frente a distintas condiciones estresantes como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y el estrés oxidativo depende de una serie de respuestas finamente controladas. El tipo de respuesta que desplieguen dependerá de su estado fisiológico que está relacionado directamente con el estado nutricional y las fuentes de carbono disponibles (Nagar, 2016; Muchaamba *et al.*, 2019; Crespo Tapia *et al.*, 2020). Los compuestos carbonados se incorporan a las vías metabólicas a distinto nivel y esto confiere mayor o menor poder reductor, modulando el estado redox celular. La degradación de fuentes de carbono o polímeros de reserva para la obtención de energía y poder reductor son claves para la resistencia frente al estrés oxidativo. Por ejemplo, la degradación del compuesto de reserva polihidroxitirato es clave para la supervivencia a baja temperatura en *P. extremaustralis* porque genera mayor poder reductor (Ayub *et al.*, 2009).

Una fuente de carbono cuyo metabolismo en bacterias no ha sido muy estudiado es el inositol. Este compuesto puede provenir de la desfosforilación del fitato que es una de las mayores moléculas de reserva de fósforo en plantas. El inositol presenta varios isómeros estructurales entre ellos el mioinositol, que ha sido propuesto como la fuente de carbono detectable más abundante en el suelo (Fry *et al.*, 1998). Sin embargo, es escasa la información acerca de su uso como fuente de carbono y energía o sobre su rol en la fisiología de bacterias del género *Pseudomonas*. Actualmente la capacidad de catabolizar mioinositol ha sido experimentalmente demostrada en algunas especies bacterianas, incluyendo *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Lactobacillus casei*, *Klebsiella aerogenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia mollaretii*, y *Citrobacter koseri* (Berman y Magasanik, 1966; Wauters *et al.*, 1988; Galbraith *et al.*, 1998; Fry *et al.*, 2001; Krings *et al.*, 2006; Yebra *et al.*, 2007; Manske *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2019). Además, recientemente se ha detectado *in silico* la presencia de los genes que codifican las enzimas involucradas en la degradación del mioinositol en cientos de especies bacterianas, tanto comensales, como patógenas y bacterias del suelo (Weber y Fuchs; 2022). Dado que en estudios previos de este laboratorio realizados con *P. extremaustralis* se observó que los genes *iolE*, *iolB*, *iolD* e *iolG*, el regulador transcripcional y el gen *iatA*, de la vía del catabolismo del inositol se sobre-expresaban en cultivos microaeróbicos realizados en LB y expuestos a GSNO (Solar Venero, 2020), nos propusimos estudiar si esta bacteria era efectivamente capaz de utilizarlo como única fuente de carbono. Cabe destacar que en aquel estudio se encontró que *P. extremaustralis* carece del gen *iolJ* que codifica una aldolasa cuya reacción enzimática relaciona esta vía con el metabolismo central del carbono y la obtención de energía y poder reductor. Los resultados de este trabajo mostraron que *P. extremaustralis* es capaz de catabolizar mioinositol y que puede hacerlo bajo distintas condiciones de aireación (aerobiosis y microaerobiosis) y temperatura (8°C y 28°C). El crecimiento no mostró

diferencias con el uso de glucosa, si bien a 8°C fue levemente menor. Estos resultados sugieren que la aldolasa necesaria o bien es codificada por un gen todavía no correctamente anotado o la función es ejercida por otra aldolasa compartida con otra vía metabólica en *P. extremaustralis*. Esto ha sido propuesto por otros autores quienes observaron que algunas especies bacterianas como *Legionella pneumophila*, *Aeromonas hydrophila* y *Gaiella occulta*, que carecen el gen *iolJ*, podrían sustituir la función con otra aldolasa, siendo así capaces de utilizar mioinositol como fuente de carbono y energía (Pang *et al.*, 2015; Manske *et al.*, 2016; Severino *et al.*, 2019). Asimismo, se verificó que el mioinositol puede ser utilizado en la respiración anaeróbica con nitrato como aceptor de electrones (nitrato reducción), dado que se detectó nitrito en el sobrenadante de los cultivos.

El inositol es un compuesto ubicuo presente en las superficies de las plantas y el suelo y dado que se ha reportado que *P. extremaustralis* tiene algunas características de promoción de crecimiento vegetal (Ibarra, 2017) se evaluó si este compuesto favorecía alguna de estas características en las condiciones ensayadas. Si bien en presencia de mioinositol *P. extremaustralis* no mostró capacidad de producir AIA o de solubilizar fosfato en medio sólido aumentó la producción de pioverdinas. Las pioverdinas son un grupo de sideróforos estructuralmente relacionados producidos principalmente por especies del género *Pseudomonas* cuya función es movilizar y acumular hierro (Dell'Anno *et al.*, 2022). En especies como *P. protegens* Pf-5 se ha mostrado su rol en la protección de plantas contra patógenos (Ruiz *et al.*, 2015). Esto sucede porque al ser un quelante del hierro compite por este con el patógeno vegetal limitando su crecimiento y favoreciendo así el crecimiento de la planta (Mercado-Blanco y Bakker, 2007).

El suelo es un ambiente complejo y heterogéneo, con variabilidad en la disponibilidad de oxígeno, agua y nutrientes. En particular, la rizosfera es rica en exudados radiculares, los cuales forman gradientes, y comunidades microbianas activas por lo que es usual que, en las bacterias asociadas a plantas, ya sean patógenas o simbioses, la motilidad juegue un papel clave en la vida en este ambiente (Colin *et al.*, 2021). Existen varios tipos de motilidad bacteriana entre los que se encuentran el *swimming* y el *swarming*. El *swimming* es un movimiento de célula única que se da en ambientes líquidos por la rotación de los flagelos. En cambio, el *swarming* es un movimiento coordinado de células propulsado también por flagelos sobre superficies con una delgada película de agua (Kearns, 2010; Palma *et al.*, 2022; Wadhwa y Berg, 2022). Nuestros resultados mostraron que *P. extremaustralis* proveniente de cultivos microaeróbicos no presentó movilidad de tipo *swarming* con glucosa o mioinositol, si bien esta bacteria tiene la capacidad de realizarla en otros medios de cultivo tanto en aerobiosis como microaerobiosis (Tribelli y López, 2011; Solar Venero *et al.*, 2019). La capacidad de *swimming* fue similar a la reportada por otros estudios realizados en aerobiosis y microaerobiosis a la misma temperatura (Tribelli y López, 2011; Tribelli, 2013).

Las diferencias con otros estudios podrían deberse a que en este trabajo se utilizó medio mínimo mientras que en otros estudios se utilizó medio complejo o a la tendencia a la vida sésil en presencia de mioinositol en concordancia con el aumento observado de la formación de biofilms cuando se utiliza esta fuente de carbono. Sería interesante realizar más experimentos como el análisis de la producción de exopolisacáridos con distintas fuentes de carbono ya que son uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular del biofilm (Kim *et al.*, 2009, Flemming y Wingender, 2010) y se ha propuesto que juegan un papel importante en la adhesión y colonización de superficies de las raíces vegetales (Matthysse *et al.*, 2005; Santaella *et al.*, 2008). Además, la formación de *biofilms* en raíces favorece la colonización de las mismas en géneros como *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, y *Azospirillum* (Yaryura *et al.*, 2008; Rinaudi y Giordano, 2010; Siuti *et al.*, 2011). Dada la abundancia del mioinositol en las superficies de las plantas o el suelo, el uso de esta fuente de carbono por parte de *P. extremaustralis* y el aumento en la formación de *biofilms* y en la producción de pioverdinas observada, la utilización de mioinositol como fuente de carbono podría ser beneficiosa para la relación planta-bacteria.

Teniendo en cuenta que los genes del catabolismo del mioinositol se sobre-expresan en *P. extremaustralis* en presencia de estrés nitrosativo (Solar Venero, 2020) nos propusimos ampliar los estudios relacionados con la respuesta de esta bacteria cuando se cultiva en presencia de esta fuente de carbono, frente a distintos factores de estrés como el nitrosativo, oxidativo y estos combinados. Tanto en ensayos con GSNO como con nitrato de potasio en medio mínimo no se hallaron diferencias en la sensibilidad respecto al uso de glucosa. El GSNO en este medio de cultivo no afectó el crecimiento bacteriano, aunque en nuestro laboratorio observamos que *P. extremaustralis* fue sensible a este compuesto en cultivos microaeróbicos en medio LB (Solar Venero, 2020). Una posible explicación es que el *biofilm* formado, que observamos en glucosa pero aún en mayor medida cuando se utilizó mioinositol como fuente de carbono, confiere un efecto protector contra el estrés. Los *biofilms* consisten en agregados multicelulares, inmersos en una matriz compleja de exopolisacáridos, DNA extracelular, proteínas y lípidos. Son estructuras altamente resistentes a múltiples factores como antibióticos, daño UV, toxicidad por metales, condiciones anaeróbicas, exposición a ácidos, salinidad, gradientes de pH, desecación, bacteriófagos, etc (Flemming y Wingender, 2010; De la Fuente-Núñez *et al.*, 2013). Solar Venero (2020) reportó un mayor índice de formación de *biofilm* en cultivos de LB microaeróbicos respecto a los aeróbicos, pero los valores obtenidos fueron mucho menores que los hallados en este estudio. En los ensayos de este trabajo, la sonicación para disgregar el *biofilm* se realizó posteriormente a la exposición a GSNO y no antes, por lo que el *biofilm* formado en ambas fuentes de carbono podría estar protegiendo a la bacteria contra el estrés causado por el GSNO. El GSNO es un dador de NO y si bien el NO está involucrado en la dispersión de *biofilms* en *P. aeruginosa*,

esto se da a concentraciones no letales de este compuesto y exposiciones a tiempos más prolongados que las utilizadas en nuestros ensayos (Barraud *et al.*, 2006). Es más, en *P. aeruginosa* a concentraciones letales/elevadas de otro dador de NO, el nitroprusiato de sodio (SNP), la formación de biofilm aumenta como una posible respuesta adaptativa a niveles tóxicos de este compuesto (Barraud *et al.*, 2006).

Cuando se analizó la respuesta frente al estrés oxidativo, observamos que *P. extremaustralis* fue más sensible al estrés en condiciones de baja tensión de oxígeno, aunque el mioinositol no le confirió un efecto protector. Sin embargo, al estudiar el efecto combinado con estrés nitrosativo en microaerobiosis, los cultivos realizados con mioinositol resistieron más el estrés a medida que se incrementó la concentración de nitrito. El estrés nitrosativo y oxidativo se encuentran relacionados dado que muchas especies reactivas del nitrógeno pueden tener reacciones cruzadas con ROS que conlleven a la formación de nuevas especies reactivas. El NO, por ejemplo, puede reaccionar con el  $O_2^-$  formando peroxinitrito ( $OONO^-$ ), que posee un poder oxidante incluso mayor (Hausladen y Stamlert, 2017). Muchos de los *targets* celulares de las ROS y RNS (lípidos, DNA y proteínas) son compartidos, por lo que es esperable que las respuestas estén solapadas, aunque otras serán exclusivas (Chautrand *et al.*, 2022). Entre los mecanismos de defensa comunes se encuentran el citocromo bd que posee actividad peroxidasa y descompone tanto  $H_2O_2$  como ONOO y el sistema metionina sulfóxido reductasa (Msr) que repara el daño en proteínas (Giuffrè *et al.*, 2014; Chautrand *et al.*, 2022). Las estrategias propias de la detoxificación de RNS incluyen flavohemoglobinas y las nitrato y nitrito reductasas (Staerck *et al.*, 2017). Las defensas antioxidantes de ROS incluyen las superóxido dismutasas, que transforma  $O_2^-$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$ , y las catalasas, descomponiendo el peróxido de hidrógeno. Por otro lado, distintas fuentes de carbono pueden favorecer la expresión de distintas enzimas capaces de combatir estrés oxidativo (Mailloux *et al.*, 2011). El mioinositol podría inducir la expresión de enzimas distintas a la glucosa que responden diferencialmente al estrés combinado.

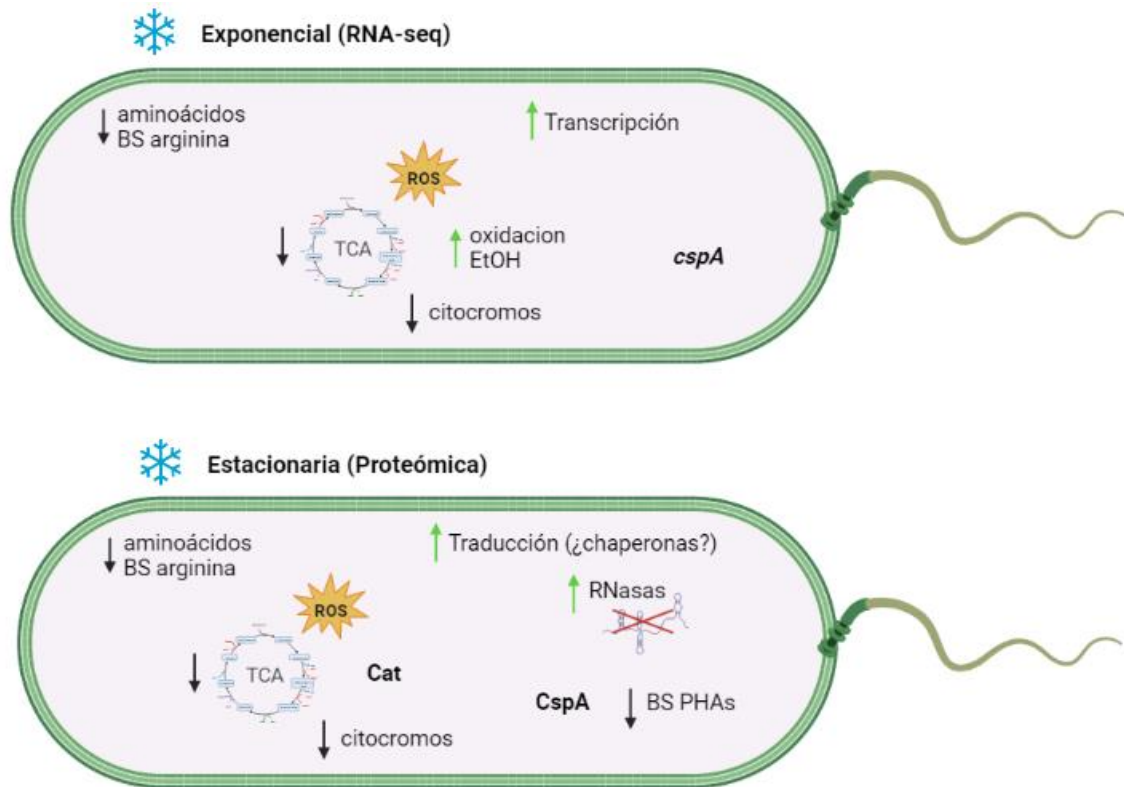
La exposición a bajas temperaturas es también una condición estresante para las bacterias por lo que, en este trabajo de tesis exploramos también algunos aspectos relacionados con la fisiología en estas condiciones. En condiciones de frío, las bacterias ajustan la fisiología celular para adaptarse y las características tradicionalmente reconocidas como involucradas en la adaptación al frío implican la modificación estructural de enzimas, cambios en la fluidez de la membrana, expresión de proteínas de *cold shock*, adaptación de la maquinaria de traducción y transcripción y la presencia de solutos compatibles (Barria *et al.*, 2013; Tribelli y López, 2018). En este trabajo se observó que *P. extremaustralis* desplegó un perfil proteico que tenía algunas de estas características. Se encontró sobre-expresión de proteínas relacionadas con la traducción y a su vez con la degradación del RNA. Esto podría parecer contradictorio, pero dado que las bajas temperaturas generan la estabilización de

estructuras secundarias en los ácidos nucleicos que pueden impedir la traducción se ha sugerido que la expresión de RNAsas degrada el RNA estructurado en estas condiciones (Fonseca *et al.*, 2011; Barria *et al.*, 2013). La sobreexpresión de proteínas relacionadas a la traducción, en especial ribosomales, en bacterias psicrófilas ya ha sido reportado por otros autores (Kumar *et al.*, 2020) y se ha sugerido que parte de estas (aquellas de la familia Rpl) poseen una actividad extraribosomal y podrían estar actuando como chaperonas importantes para la supervivencia a bajas temperaturas (Kovacs *et al.*, 2009; Aseev y Boni, 2011). También se hallaron algunas proteínas relacionadas con mecanismos de defensa como una proteína de *cold shock* (CspA) y una catalasa. Mediante el análisis por RT-qPCR en este trabajo también se observó la sobreexpresión de *cspA* a 8 °C respecto a 28°C aunque es necesario realizar más replicas. Las catalasas son proteínas con actividad antioxidante son por ende claves en la defensa contra estrés oxidativo (Rajendrasozhan, 2023) y a bajas temperaturas existe un incremento del estrés oxidativo resultando en una mayor producción de ROS (Chattopadhyay *et al.*, 2011). Respecto a las proteínas reprimidas, se encontró que en *P. extremaustralis* muchas de las proteínas reprimidas se encontraban relacionadas con la obtención y conversión de energía, en especial citocromos y proteínas asociadas. A bajas temperaturas las bacterias psicrófilas y psicrotolerantes reprimen el metabolismo oxidativo primario, incluyendo los citocromos (Piette *et al.*, 2011; Tribelli y López, 2018). Los citocromos forman parte de la cadena respiratoria y dado que esta es una fuente de ROS y que en frío hay un incremento en el estrés oxidativo reprimirlos podría ayudar a disminuir el estrés. Asimismo, se encontró represión de proteínas relacionadas con la vía de síntesis de PHA probablemente debido a que esta bacteria sintetiza este polímero bajo un exceso en la disponibilidad de fuente de carbono respecto a otros nutrientes (López *et al.*, 2015) y los cultivos analizados se encontraban en fase estacionaria de crecimiento donde existe mayor producción de este polímero. Dado que los resultados son comparativos esta observación indicaría que la síntesis de PHA está favorecida a 28°C en comparación condiciones de frío.

El estudio del proteoma realizado proporcionó un análisis cuantitativo de las diferencias en la expresión de proteínas entre frío y temperatura ambiente de 28°C. Este estudio fue realizado con las proteínas totales y por las características de la técnica permitió la identificación de alrededor de 1335 proteínas en promedio en las condiciones y réplicas analizadas que representaron aproximadamente el 22% del total de secuencias codificantes (CDS) anotadas en el genoma de *P. extremaustralis* 14-3b (5965 proteínas según la base de datos NCBI). Sin embargo, al comparar este estudio con datos de un análisis transcriptómico realizado a las mismas temperaturas por Tribelli *et al.* (2015) se encontró que solo el 1,5% de los transcritos sobre-expresados se correspondían con proteínas y, en el caso de los reprimidos fue el 4,33%. Esto podría deberse a distintos factores. Por un lado, si bien este tipo de estudio proteómico provee un panorama general con significado estadístico de las

proteínas mayoritarias en una condición con respecto a la otra, comparada con los estudios de transcriptómica la cobertura obtenida es menor. Esto se debe a que la técnica únicamente detecta las proteínas más abundantes de la muestra (Timp y Timp, 2020). Una forma de lograr mayor cobertura consiste en analizar fracciones celulares por separado como fracciones citosólicas, de membrana y periplásmicas. Utilizando este tipo de estrategias otros autores se han logrado ampliar la cobertura obtenida, por ejemplo, Nilsson *et al.* (2019) lograron identificar el 41,5% del total de secuencias codificantes (CDS) anotadas en el genoma de *Rhizobium favelukesii* LPU83. Otra posible explicación radica en que la traducción es un proceso altamente regulado y una elevada cantidad de transcrito no necesariamente indica elevada cantidad de producto proteico (Timp y Timp, 2020; Tollerson e Ibba, 2020). También, las proteínas poseen una vida media variada y aquellas con vida media corta podían no ser detectadas en el análisis (Trötschel *et al.*, 2013). Asimismo, si bien las condiciones de cultivo (medio utilizado, temperatura, agitación) fueron las mismas en ambos estudios, en el estudio transcriptómico los cultivos se encontraban en fase exponencial de crecimiento y en el proteómico en fase estacionaria. En consecuencia, la bacteria podría reajustar las respuestas que despliega de acuerdo a las necesidades de cada fase de crecimiento mostrando perfiles de expresión no coincidentes, lo cual podría explicar por qué 14 de las proteínas sobreexpresadas reprimían la expresión de sus genes en fase exponencial. Se encontró que los perfiles de represión fueron más coincidentes que los de sobreexpresión. Si bien el porcentaje de coincidencia fue bajo, muchas de las vías metabólicas y funciones reprimidas se mantuvieron así en ambas fases de crecimiento. Por ejemplo, en el análisis del transcriptoma se había observado la represión del metabolismo de muchos aminoácidos, en especial la biosíntesis de arginina y esto también se observó en el proteoma por más que no todas las proteínas coincidieran con transcritos. Lo mismo ocurrió con citocromos y proteínas asociadas a la producción de energía, entre las que se encuentran proteínas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Como se mencionó anteriormente esto podría deberse a que en frío las bacterias reprograman su metabolismo oxidativo en un intento de aliviar el estrés oxidativo (Piette *et al.*, 2011; Tribelli y López, 2018). Sin embargo, otras características reprimidas no se mantuvieron así en fase estacionaria o no pudieron ser detectadas como la producción de exopolisacáridos y putrescina y espermidina, así como proteínas de motilidad. En cuanto a los perfiles de sobreexpresión, estos no fueron coincidentes entre ambas fases de crecimiento exceptuando la proteína CspA. En fase exponencial *P. extremaustralis* sobreexpresa genes de la transcripción, de la resistencia a estrés osmótico y de la oxidación del etanol (Tribelli *et al.*, 2015) y ninguna proteína asociada a estas vías se encontró en fase estacionaria. Sin embargo, los experimentos de RT-qPCR realizados permitieron observar que la expresión de *cspA* fue similar y elevada entre ambas fases de crecimiento indicando, para esta característica, correspondencia entre transcripción y traducción.

Los mecanismos asociados a la adaptación al frío son complejos e involucran muchas estrategias. Además, a medida que las bacterias transitan las distintas fases de crecimiento los requerimientos necesarios para adaptarse a cada una de ellas pueden variar. Los cambios fisiológicos más relevantes observados en *P. extremaustralis* expuesta al frío en fase exponencial y estacionaria se resumen en la **Figura 1D**.



**Figura 1D:** Resumen de las respuestas detectadas frente a la exposición a frío en fase exponencial y estacionaria de crecimiento en *P. extremaustralis*. BS: biosíntesis.



## CONCLUSIONES GENERALES

- *P. extremaustralis* es capaz de catabolizar mioinositol y puede hacerlo bajo distintas condiciones de aireación y temperatura, lo que indicaría que la batería de genes involucradas en este catabolismo se encuentra completa. El crecimiento no mostró diferencias con el uso de glucosa.
- En presencia de inositol y condiciones microaeróbicas se observó un aumento en la producción de pioverdinas.
- La utilización de mioinositol como fuente de carbono no afectó la capacidad de *swimming*.
- En condiciones microaeróbicas y medio mínimo suplementado con mioinositol o glucosa el GSNO no afectó el crecimiento bacteriano y el biofilm formado podría estar confiriéndole un efecto protector.
- El mioinositol protegió contra el estrés nitro-oxidativo generado a elevadas concentraciones de  $\text{KNO}_3$  en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- A bajas temperaturas por tiempo prolongado el perfil proteómico de *P. extremaustralis* mostró distintas estrategias de adaptación al frío como la expresión de RNAsas y proteínas ribosomales con posible actividad chaperona, proteínas *cold shock* y una catalasa y represión de citocromos y proteínas asociadas a la producción de energía.

***REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

Aseev, L. V., & Boni, I. V. (2011). Extraribosomal functions of bacterial ribosomal proteins. *Molecular Biology*, 45, 739-750.

Ayub, N. D. *et al.* (2004). A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas sp.* isolated from antarctic environments with high stress resistance. *Current Microbiology*, 49(3), pp. 170–174.

Barria, C., Malecki, M., & Arraiano, C. M. (2013). Bacterial adaptation to cold. *Microbiology*, 159, 2437-2443.

Barraud, N., Hassett, D. J., Hwang, S. H., Rice, S. A., Kjelleberg, S., & Webb, J. S. (2006). Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 188(21), 7344–7353.

Bauer, G. (2019). The synergistic effect between hydrogen peroxide and nitrite, two long-lived molecular species from cold atmospheric plasma, triggers tumor cells to induce their own cell death. *Redox biology*, 26, 101291.

Berman, T., & Magasanik, B. (1966). The pathway of myo-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*: ring scission. *Journal of Biological Chemistry*, 241(4), 807-813.

Caranto, J. D. (2019). The emergence of nitric oxide in the biosynthesis of bacterial natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, 49, 130-138.

Catone, M. V., Ruiz, J. A., Castellanos, M., Segura, D., Espin, G., & López, N. I. (2014). High polyhydroxybutyrate production in *Pseudomonas extremaustralis* is associated with differential expression of horizontally acquired and core genome polyhydroxyalkanoate synthase genes. *PloS one*, 9(6), e98873.

Chattopadhyay, M. K., Raghu, G., Sharma, Y. V., Biju, A. R., Rajasekharan, M. V., & Shivaji, S. (2011). Increase in oxidative stress at low temperature in an antarctic bacterium. *Current microbiology*, 62(2), 544–546.

Chautrand, T., Souak, D., Chevalier, S., & Duclairoir-Poc, C. (2022). Gram-Negative Bacterial Envelope Homeostasis under Oxidative and Nitrosative Stress. *Microorganisms*, 10(5), 924

Colin, R., Ni, B., Laganenka, L., & Sourjik, V. (2021). Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS microbiology reviews*, 45(6), fuab038.

Crespo Tapia, N., Dorey, A. L., Gahan, C. G. M., den Besten, H. M. W., O'Byrne, C. P., & Abee, T. (2020). Different carbon sources result in differential activation of sigma B and stress resistance in *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 320, 108504.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.

De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology*, 16(5), 580-589.

Dell'Anno, F., Vitale, G. A., Buonocore, C., Vitale, L., Palma Esposito, F., Coppola, D., Della Sala, G., Tedesco, P., & de Pascale, D. (2022). Novel Insights on Pyoverdine: From Biosynthesis to Biotechnological Application. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11507.

Fonseca, P., Moreno, R., & Rojo, F. (2011). Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Environmental microbiology reports*, 3(3), 329-339.

Fry, J., Poole, P. S., & Wood, M. (1998). myo-inositol utilisation by *Rhizobium leguminosarum*. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century: Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, Institut Pasteur, Paris, France, July 20–25, 1997* (pp. 485-485). Springer Netherlands.

Fry, J., Wood, M., & Poole, P. S. (2001). Investigation of myo-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and its effect on nodulation competitiveness. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(8), 1016-1025.

Fu, H., Yuan, J., & Gao, H. (2015). Microbial oxidative stress response: Novel insights from environmental facultative anaerobic bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 584, 28–35.

Galbraith, M. P., Feng, S. F., Borneman, J., Triplett, E. W., de Bruijn, F. J., & Rossbachl, S. (1998). A functional myo-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 144(10), 2915-2924.

Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., and Koonin, E. V. (2021). COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic acids research*, 49(D1), D274–D281.

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., & Phillips, G. B. (1981). *Manual of methods for general bacteriology*.

Giuffrè, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P., & Forte, E. (2014). Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(7), 1178-1187.

Hausladen, A., & Stamlert, J. S. (2017). Resistance factors for nitrosative and oxidative stress. *Nitric Oxide and the Cell: Proliferation, Differentiation, and Death*, 5149, 41.

Ibarra, J.G. (2017). Estudios microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos vegetales en zonas desfavorables. Tesis Doctoral. Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Imlay J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 11(7), 443–454.

Imlay J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental microbiology*, 21(2), 521–530.

Kawamoto, J., Kurihara, T., Kitagawa, M., Kato, I., & Esaki, N. (2007). Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 11(6), 819–826.

Kim, H. S., Park, S. J., & Lee, K. H. (2009). Role of NtrC-regulated exopolysaccharides in the biofilm formation and pathogenic interaction of *Vibrio vulnificus*. *Molecular microbiology*, 74(2), 436-453.

King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 301–307.

Kearns D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 634–644.

Kohler, P. R., Choong, E. L., & Rossbach, S. (2011). The RpiR-like repressor lolR regulates inositol catabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5155-5163.

Kohler, P. R. *et al.* (2010). Inositol catabolism, a key pathway in *Sinorhizobium meliloti* for competitive host nodulation. *Applied and environmental microbiology*, 76(24), 7972–7980.

Kovacs, D., Rakacs, M., Agoston, B., Lenkey, K., Semrad, K., Schroeder, R., & Tompa, P. (2009). Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS letters*, 583(1), 88–92.

Krings, E., Krumbach, K., Bathe, B., Kelle, R., Wendisch, V. F., Sahm, H., & Eggeling, L. (2006). Characterization of myo-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation. *Journal of bacteriology*, 188(23), 8054-8061.

Kumar, S., Suyal, D. C., Yadav, A., Shouche, Y., & Goel, R. (2020). Psychrophilic *Pseudomonas helmanticensis* proteome under simulated cold stress. *Cell stress & chaperones*, 25(6), 1025–1032.

Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., & Witholt, B. (1988). Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Applied and environmental microbiology*, 54(12), 2924-2932.

Larionov, A., Krause, A., & Miller, W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC bioinformatics*, 6(1), 1-16.

Loewus, F. A., & Murthy, P. P. (2000). myo-Inositol metabolism in plants. *Plant science*, 150(1), 1-19.

López, N. I., Pettinari, M. J., Stackebrandt, E., Tribelli, P. M., Pötter, M., Steinbüchel, A., & Méndez, B. S. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate) producer isolated from an Antarctic environment. *Current microbiology*, 59, 514-519.

López, N. I., Pettinari, M. J., Nickel, P. I., & Méndez, B. S. (2015). Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. *Advances in applied microbiology*, 93, 73-106.

Mailloux, R. J., Lemire, J., & Appanna, V. D. (2011). Metabolic networks to combat oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 433-442.

Manske, C., Schell, U., & Hilbi, H. (2016). Metabolism of myo-inositol by *Legionella pneumophila* promotes infection of amoebae and macrophages. *Applied and environmental microbiology*, 82(16), 5000-5014.

Matthysse, A. G., Marry, M., Krall, L., Kaye, M., Ramey, B. E., Fuqua, C., & White, A. R. (2005). The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(9), 1002-1010.

Mercado-Blanco, J., & Bakker, P. A. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 367-389.

Muchaamba, F., Eshwar, A. K., Stevens, M. J., von Ah, U., & Tasara, T. (2019). Variable carbon source utilization, stress resistance, and virulence profiles among *Listeria monocytogenes* strains responsible for listeriosis outbreaks in Switzerland. *Frontiers in microbiology*, 10, 957.

Morales-Soto, N., Anyan, M. E., Mattingly, A. E., Madukoma, C. S., Harvey, C. W., Alber, M., Déziel, E., Kearns, D. B., & Shrout, J. D. (2015). Preparation, imaging, and quantification of bacterial surface motility assays. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (98), 52338.

Nagar, S. D., Aggarwal, B., Joon, S., Bhatnagar, R., & Bhatnagar, S. (2016). A network biology approach to decipher stress response in bacteria using *Escherichia coli* as a model. *OmicS: a journal of integrative biology*, 20(5), 310-324.

Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), pp.265–270.

Nilsson, J. F., Castellani, L. G., Draghi, W. O., Pérez-Giménez, J., Torres Tejerizo, G. A., & Pistorio, M. (2019). Proteomic analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in response to acid stress. *Journal of proteome research*, 18(10), 3615-3629.

Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research*, 27(1), 29–34.

O'Toole, G. A. and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), pp. 295–304.

Palleroni, N. J., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., & Garrity, G. M. (2005). *Pseudomonas* in *Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag. New York, NY, 2, 323-379.

Palma, V., Gutiérrez, M. S., Vargas, O., Parthasarathy, R., & Navarrete, P. (2022). Methods to evaluate bacterial motility and its role in bacterial–host interactions. *Microorganisms*, 10(3), 563.

Pang, M. et al. (2015). Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. *Scientific reports*, 5, p. 9833.

Piette, F., D'Amico, S., Mazzucchelli, G., Danchin, A., Leprince, P., & Feller, G. (2011). Life in the cold: a proteomic study of cold-repressed proteins in the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3881–3883.

Poh, W. H., & Rice, S. A. (2022). Recent Developments in Nitric Oxide Donors and Delivery for Antimicrobial and Anti-Biofilm Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3), 674.

Raiger lustman, L. J., Tribelli, P. M., Ibarra, J. G., Catone, M. V., Solar Venero, E. C., & López, N. I. (2015). Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremophiles*, 19, 207-220.

Rajendrasozhan, S. (2023). Bacterial redox response factors in the management of environmental oxidative stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 11.

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4, 124-140.



Rinaudi, L. V., & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS microbiology letters*, 304(1), 1-11.

Ruiz, J. A., Bernar, E. M., & Jung, K. (2015). Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *PLoS one*, 10(1), e0117040.

Rodrigues, D. F., & Tiedje, J. M. (2008). Coping with our cold planet. *Applied and environmental microbiology*, 74(6), 1677-1686.

Santaella, C., Schue, M., Berge, O., Heulin, T., & Achouak, W. (2008). The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environmental Microbiology*, 10(8), 2150-2163.

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.

Severino, R., Froufe, H. J., Barroso, C., Albuquerque, L., Lobo- da- Cunha, A., da Costa, M. S., & Egas, C. (2019). High- quality draft genome sequence of *Gaiella occulta* isolated from a 150 meter deep mineral water borehole and comparison with the genome sequences of other deep- branching lineages of the phylum Actinobacteria. *Microbiologyopen*, 8(9), e00840.

Siuti, P., Green, C., Edwards, A. N., Doktycz, M. J., & Alexandre, G. (2011). The chemotaxis-like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters*, 323(2), 105-112.

Solar Venero, E. C., Ricardi, M. M., Gomez-Lozano, M., Molin, S., Tribelli, P. M., & López, N. I. (2019). Oxidative stress under low oxygen conditions triggers hyperflagellation and motility in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *Extremophiles*, 23, 587-597.

Solar Venero, E.C. (2020). Mecanismos de adaptabilidad a microaerobiosis y estrés oxidativo en *Pseudomonas extremaustralis*. Tesis Doctoral. Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J. P., & Fleury, M. J. J. (2017). Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis*, 110, 56-65.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607–D613.

Timp, W., & Timp, G. (2020). Beyond mass spectrometry, the next step in proteomics. *Science Advances*, 6(2), eaax8978

Tollerson, R., & Ibba, M. (2020). Translational regulation of environmental adaptation in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10434-10445.

Trevors, J. T., Bej, A. K., Mojib, N., van Elsas, J. D., & Van Overbeek, L. (2012). Bacterial gene expression at low temperatures. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 16(2), 167–176.

Tribelli, P. M., Méndez, B. S., & López, N. I. (2010). Oxygen-sensitive global regulator, Anr, is involved in the biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*. *Microbial Physiology*, 19(4), 180-188.

Tribelli, P. M., & López, N. I. (2011). Poly (3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*, 15, 541-547.

Tribelli, P. M., Solar Venero, E. C., Ricardi, M. M., Gómez-Lozano, M., Raiger lustman, L. J., Molin, S., & López, N. I. (2015). Novel Essential Role of Ethanol Oxidation Genes at Low Temperature Revealed by Transcriptome Analysis in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PloS one*, 10(12), e0145353.

Tribelli, P. M., & López, N. I. (2018). Reporting key features in cold-adapted bacteria. *Life*, 8(1), 8.

Trötschel, C., Albaum, S. P., & Poetsch, A. (2013). Proteome turnover in bacteria: current status for *Corynebacterium glutamicum* and related bacteria. *Microbial biotechnology*, 6(6), 708-719.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature methods*, 13(9), 731–740.

Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H. D., & Rojo, F. (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environmental microbiology*, 10(7), 1690-1702.

Wauters, G., Janssens, M., STEIGERWALT, A. G., & BRENNER, D. J. (1988). *Yersinia mollaretii* sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 424-429.

Weber, M., & Fuchs, T. M. (2022). Metabolism in the niche: a large-scale genome-based survey reveals inositol utilization to be widespread among soil, commensal, and pathogenic bacteria. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e02013-22.

Wadhwa, N., & Berg, H. C. (2022). Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nature reviews. Microbiology*, 20(3), 161–173.

Wilkins M. R. (2009). Hares and tortoises: the high- versus low-throughput proteomic race. *Electrophoresis*, 30 Suppl 1, S150–S155.

Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., & Brinkman, F. S. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic acids research*, 44(D1), D646–D653.

Wood, M., & Stanway, A. P. (2001). Myo-inositol catabolism by *Rhizobium* in soil: HPLC and enzymatic studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(3), 375-379.

Yaryura, P. M., León, M., Correa, O. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., & García, A. F. (2008). Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization

of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. *Current microbiology*, 56, 625-632.

Yebra, M. J., Zúñiga, M., Beaufils, S., Pérez-Martínez, G., Deutscher, J., & Monedero, V. (2007). Identification of a gene cluster enabling *Lactobacillus casei* BL23 to utilize myo-inositol. *Applied and environmental microbiology*, 73(12), 3850-3858.

Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Kinehara, M., Ikeuchi, M., Ashida, H., & Fujita, Y. (2008). myo-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry*, 283(16), 10415–10424.

Yuan, C., Yang, P., Wang, J., & Jiang, L. (2019). Myo-inositol utilization by *Citrobacter koseri* promotes brain infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(3), 427-432.

# ***ANEXO RESULTADOS***

**Tabla 1:** Proteínas sobre-expresadas a 10 °C, mostrando las veces de cambio y su clasificación funcional en categorías de COGs (c-COG). T = análisis transcriptómico realizado en Tribelli *et al.*, 2015.

Gen	Locus Tag	Función	c-COG	Veces de Cambio	Presencia en T
<b>C: Energy production and conversion</b>					
<i>narH</i>	PE143B_0126680	Nitrate reductase	CP	2.07	-
<i>aceA</i>	PE143B_0123985	Isocitrate lyase	C	2.11	-
	PE143B_0113090	Pyruvate dehydrogenase	C	3.12	-
<i>glpK</i>	PE143B_0109470	Glycerol kinase	C	7.23	-
<b>D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning</b>					
<i>mreB</i>	PE143B_0128290	Rod shape-determining protein MreB	DZ	2.01	-
<b>E: Amino acid transport and metabolism</b>					
<i>carB</i>	PE143B_0101750	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	EF	3.31	-
	PE143B_0122450	Arginine N-succinyltransferase	E	2.21	-
<i>metX</i>	PE143B_0110825	Homoserine O-succinyltransferase / homoserine acetyltransferase	E	2.30	-
	PE143B_0116870	Peptide ABC transporter ATP-binding protein	E	2.58	-
<i>dppD</i>	PE143B_0116865	Peptide ABC transporter ATP-binding protein	EP	6.23	-
<i>hisP</i>	PE143B_0106420	Amino acid transporter	E	2.04	-
<i>dppa_1</i>	PE143B_0116850	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	E	2.34	-
	PE143B_0103570	Butanediol dehydrogenase	E	9.26	-
<i>argD</i>	PE143B_0109400	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	E	7.00	-
<i>selD</i>	PE143B_0119545	Selenide, water dikinase	E	4.05	-
<b>F: Nucleotide transport and metabolism</b>					
<i>purB</i>	PE143B_0123965	Adenylosuccinate lyase	F	2.23	-
<i>purL</i>	PE143B_0115400	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	F	2.99	-
<b>G: Carbohydrate transport and metabolism</b>					
<i>zwf</i>	PE143B_0125220	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G	2.71	-
<i>malP</i>	PE143B_0104265	Alpha-1,4 glucan phosphorylase / maltodextrin phosphorylase	G	4.26	-
<b>I: Lipid transport and metabolism</b>					

<i>psd</i>	PE143B_0105090	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme	I	2.69	-
<i>fadD_2</i>	PE143B_0125180	Long-chain fatty acid--CoA ligase	I	2.01	-
<b>J: Translation, ribosomal structure and biogenesis</b>					
<i>rpsB</i>	PE143B_0106240	30S ribosomal protein S2	J	2.23	-
<i>rpsT</i>	PE143B_0117175	30S ribosomal protein S20	J	3.75	-
<i>rpsA</i>	PE143B_0121900	30S ribosomal protein	J	2.31	-
<i>rpsD</i>	PE143B_0123720	30S ribosomal protein S4	J	3.17	-
<i>rpsK</i>	PE143B_0123725	30S ribosomal protein S11	J	5.48	-
<i>rpsM</i>	PE143B_0123730	30S ribosomal protein	J	2.79	-
<i>rpsE</i>	PE143B_0123750	30S ribosomal protein S5	J	2.38	-
<i>rpsH</i>	PE143B_0123765	30S ribosomal protein S8	J	2.09	-
<i>rpsC</i>	PE143B_0123805	30S ribosomal protein S3	J	2.06	-
<i>rpsS</i>	PE143B_0123815	30S ribosomal protein S19	J	2.90	-
<i>rpsG</i>	PE143B_0123855	30S ribosomal protein S7	J	2.80	-
<i>rpsL</i>	PE143B_0123860	30S ribosomal protein S12	J	4.68	-
<i>rpsI</i>	PE143B_0130235	30S ribosomal protein S9	J	4.07	-
<i>rplA</i>	PE143B_0123885	50S ribosomal protein	J	2.28	-
<i>rplP</i>	PE143B_0123800	50S ribosomal protein L16	J	2.56	-
<i>rplV</i>	PE143B_0123810	50S ribosomal protein L22	J	2.92	-
<i>rplB</i>	PE143B_0123820	50S ribosomal protein L2	J	2.24	-
<i>rplW</i>	PE143B_0123825	50S ribosomal protein L23	J	2.13	-
<i>rplC</i>	PE143B_0123835	50S ribosomal protein L3	J	2.46	-
<i>rplO</i>	PE143B_0123740	50S ribosomal protein L15	J	2.30	-
<i>rplR</i>	PE143B_0123755	50S ribosomal protein L18	J	2.31	-
<i>rplF</i>	PE143B_0123760	50S ribosomal protein L6	J	2.28	-
<i>rplE</i>	PE143B_0123775	50S ribosomal protein L5	J	2.77	-
<i>rplN</i>	PE143B_0123785	50S ribosomal protein L14	J	2.21	-
<i>rplY</i>	PE143B_0117345	50S ribosomal protein L25	J	2.05	-
<i>rplT</i>	PE143B_0124900	50S ribosomal protein L20	J	2.54	-
<i>rplS</i>	PE143B_0115510	50S ribosomal protein L19	J	2.95	-
<i>rplM</i>	PE143B_0130240	50S ribosomal protein L13	J	2.61	-

<i>rsmA</i>	PE143B_0121075	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	J	5.40	-
<i>rsgA</i>	PE143B_0105115	Small ribosomal subunit biogenesis GTPase RsgA	J	2.28	-
<i>rlmB</i>	PE143B_0105220	23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase RlmB	J	2.08	-
<i>infB</i>	PE143B_0101820	Translation initiation factor IF-2	J	3.52	-
<i>lepA</i>	PE143B_0109145	Elongation factor 4	J	2.31	-
<i>lysS</i>	PE143B_0106025	Lysine--tRNA ligase	J	2.56	-
<i>glnS</i>	PE143B_0113800	Glutamine--tRNA ligase	J	2.22	-
<i>trpS</i>	PE143B_0130265	Tryptophan--tRNA ligase	J	2.30	-
<i>truB</i>	PE143B_0101830	tRNA pseudouridine synthase B	J	3.34	-
<i>rne</i>	PE143B_0122220	Ribonuclease E	J	3.40	-
<i>pnp</i>	PE143B_0101840	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	J	2.69	-
<i>der</i>	PE143B_0115330	GTPase Der	J	2.83	-
<b>K: Transcription</b>					
<i>rnr</i>	PE143B_0105215	Ribonuclease R	K	2.21	-
<i>rpoA</i>	PE143B_0123715	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	K	2.28	-
<i>rpoC</i>	PE143B_0123865	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	K	2.37	-
<i>rpoD</i>	PE143B_0121005	RNA polymerase sigma factor RpoD	K	2.45	-
<b>L: Replication, recombination and repair</b>					
<i>dbpA</i>	PE143B_0118950	RNA helicase	L	5.45	-
<i>rhIE_1</i>	PE143B_0118805	ATP-dependent RNA helicase RhIE	L	15.88	-
<i>rhIE_3</i>	PE143B_0108265	RNA helicase	L	10.49	-
<i>deaD</i>	PE143B_0114355	ATP-dependent RNA helicase DeaD	L	14.20	-
<i>parC</i>	PE143B_0105070	DNA topoisomerase 4 subunit A	L	2.34	-
<i>uvrA</i>	PE143B_0123695	UvrABC system protein A / excinuclease ABC subunit A	L	3.73	-
<i>smc</i>	PE143B_0100060	Chromosome segregation protein SMC	L	2.33	-
<i>obgE</i>	PE143B_0120465	GTPase Obg / CgtA	LD	4.08	-
	PE143B_0101650	Dynammin	L	2.00	-
<i>rhIB</i>	PE143B_0108900	ATP-dependent RNA helicase RhIB	L	ON	-
<b>M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>					
<i>murA</i>	PE143B_0128430	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	M	7.10	-
<i>dacC</i>	PE143B_0100585	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	M	2.33	-



<i>bamA</i>	PE143B_0106280	Outer membrane protein assembly factor BamA	M	2.87	-
<i>bamB</i>	PE143B_0115325	Outer membrane protein assembly factor BamB	M	2.21	-
<i>bamD</i>	PE143B_0117105	Outer membrane protein assembly factor BamD/DNA transporter	M	2.06	-
	PE143B_0127090	Membrane protein	M	2.04	-
	PE143B_0124485	Oxidoreductase	M	3.15	-
<i>rkpK_2</i>	PE143B_0102715	UDP-glucose 6-dehydrogenase	M	4.83	-
	PE143B_0124470	Energy transducer TonB	M	2.12	-
<i>LpoA</i>	PE143B_0117645	Uncharacterized protein	M	3.75	-
<i>ompA</i>	PE143B_0113900	Uncharacterized protein	M	2.98	-
<i>BamC</i>	PE143B_0107175	Uncharacterized protein	M	2.59	-
<i>tolC</i>	PE143B_0115865	Transporter	M	4.13	-
<i>oprE</i>	PE143B_0111250	Porin	M	2.52	-
<i>yidC</i>	PE143B_0118535	Membrane protein insertase YidC	M	2.55	-
<i>tolC</i>	PE143B_0106710	Multidrug transporter	M	3.69	-
<i>arnA</i>	PE143B_0102740	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA/ UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose formyltransferase	MJ	4.26	-
<b>N: Cell motility</b>					
	PE143B_0108635	Flagellin	N	1	-
<b>O: Posttrans-lational modification, protein turnover, chaperones</b>					
<i>HflK</i>	PE143B_0105170	Protein HflK	O	2.21	-
<i>prc</i>	PE143B_0115105	Peptidase S41	O	4.38	-
<i>hflB</i>	PE143B_0101775	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	O	2.28	-
<i>flkI</i>	PE143B_0115080	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	O	2.64	-
<i>hscA</i>	PE143B_0115275	Chaperone protein HscA homolog	O	2.55	-
	PE143B_0127890	Uncharacterized protein	O	2.49	-
<i>lon_3</i>	PE143B_0113550	Lon protease / DNA binding protein	O	5.65	-
<i>lon_2</i>	PE143B_0101230	Endopeptidase /ATP-dependent protease	O	2.75	-
<b>P: Inorganic ion transport and metabolism</b>					
<i>ppk</i>	PE143B_0111470	Polyphosphate kinase	P	2.03	-
	PE143B_0115140	ABC transporter substrate-binding protein	P	2.89	-
<i>pstB</i>	PE143B_0124375	Phosphate import ATP-binding protein PstB	P	10.95	-

	PE143B_0122590	Iron ABC transporter substrate-binding protein	P	3.07	-
<i>pstS</i>	PE143B_0102245	Phosphate-binding protein PstS	P	27.20	-
<i>pstS_1</i>	PE143B_0124360	Phosphate-binding protein	P	72.29	-
	PE143B_0101655	GTP-binding protein	P	2.44	-
<i>bfrD</i>	PE143B_0116925	Ligand-gated channel protein	P	ON	-
<b>R: General function prediction only</b>					
	PE143B_0107465	ABC transporter ATPase	R	6.78	-
	PE143B_0101660	GTPase	R	2.07	-
	PE143B_0127880	Uncharacterized protein	R	3.88	-
	PE143B_0123075	Uncharacterized protein	R	2.43	-
	PE143B_0115695	Imelysin	R	2.31	-
	PE143B_0112695	Cobalamin biosynthesis protein CobW	R	ON	-
<b>S: Function unknown</b>					
	PE143B_0115910	Uncharacterized protein	S	2.99	-
	PE143B_0115555	Uncharacterized protein	S	3.07	-
	PE143B_0124870	Uncharacterized protein	S	2.84	-
<b>T: Signal transduction mechanisms</b>					
<i>cheB</i>	PE143B_0108810	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	T	2.79	-
<i>cheA</i>	PE143B_0108805	Chemotaxis protein CheA	T	2.87	-
<i>typA</i>	PE143B_0104255	GTP-binding protein TypA	T	7.74	-
<b>U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport</b>					
<i>secA</i>	PE143B_0119935	Protein translocase subunit SecA	U	2.14	-
<i>YajC</i>	PE143B_0115215	Preprotein translocase subunit YajC	U	2.72	-
<i>secG</i>	PE143B_0101795	Preprotein translocase subunit SecG	U	2.13	-
<b>V: Defense mechanisms</b>					
<i>mepB</i>	PE143B_0106715	Efflux pump membrane transporter/ Multidrug transporter	V	4.87	-
<i>ttgA</i>	PE143B_0106720	Antibiotic transporter	VM	3.73	-
	PE143B_0101470	Type I restriction-modification protein subunit M	V	5.49	-
<i>cat</i>	PE143B_0123705	Catalase	V	3.23	-
<i>cspA</i>	PE143B_0106405	Cold-shock protein	V	4.12	Si

	PE143B_0101495	Type I restriction enzyme R Protein	V	ON	-
	PE143B_0100075	Restriction endonuclease subunit M	V	ON	-

**Tabla 2:** Proteínas con expresión disminuída a 10°C, mostrando las veces de cambio y su clasificación funcional en categorías de COGs (c-COG). T = análisis transcriptómico realizado en Tribelli *et al.*, 2015.

Gen	locusTag	Función	c-COG	Veces de cambio	Presencia en T
<b>C: Energy production and conversion</b>					
<i>petC</i>	PE143B_0130185	Cytochrome C	C	-2.36	-
<i>petA</i>	PE143B_0130195	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	C	-3.43	-
	PE143B_0108135	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II	C	-3.46	-
<i>ccoP1</i>	PE143B_0108125	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	C	-9.29	-
<i>etfA_2</i>	PE143B_0107560	Electron transfer flavoprotein subunit beta	C	-2.43	Sí
<i>ubil</i>	PE143B_0111315	2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	CH	-2.07	-
	PE143B_0108100	(Fe-S)-binding protein	C	-9.76	-
<i>glcB</i>	PE143B_0120825	Malate synthase G	C	-2.38	Sí
<i>fumA</i>	PE143B_0119840	Fumarate hydratase class I	C	-2.03	-
	PE143B_0105755	Phosphate acetyltransferase	C	-3.94	-
<i>ackA</i>	PE143B_0105750	Acetate kinase	C	-3.25	-
<i>ldhA</i>	PE143B_0128925	2-hydroxyacid dehydrogenase	CH	-4.50	-
<i>adhB</i>	PE143B_0106840	Alcohol dehydrogenase	C	-16.65	-
	PE143B_0128125	Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein	C	-2.39	-
<i>adh</i>	PE143B_0103270	Alcohol dehydrogenase	C	-31.74	-
<i>petB</i>	PE143B_0130190	Cytochrome b	C	OFF	Sí
<b>D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning</b>					
	PE143B_0106065	Chromosome partitioning protein ParA	DN	-8.71	-
<b>E: Amino acid transport and metabolism</b>					
<i>arcA</i>	PE143B_0120170	Arginine deiminase	E	-13.35	Sí
<i>arcB</i>	PE143B_0120165	Ornithine carbamoyltransferase	E	-10.57	Sí
<i>arcC1</i>	PE143B_0120160	Carbamate kinase	E	-4.27	-

<i>argD</i>	PE143B_0103140	Ornithine aminotransferase	E	OFF	-
<i>bkdB</i>	PE143B_0113215	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex / branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	E	-2.04	-
<i>mmsB</i>	PE143B_0120345	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	E	-3.37	-
<i>thrC</i>	PE143B_0115530	Threonine synthase	E	-3.00	-
<i>puuA_2</i>	PE143B_0111190	Glutamine synthetase	E	-2.46	-
<i>asnB</i>	PE143B_0127125	Asparagine synthase	E	-5.53	-
<i>aspA</i>	PE143B_0124315	Aspartate ammonia-lyase	E	-10.80	Sí
<i>ilvE</i>	PE143B_0113205	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	EH	-2.17	Sí
<i>hmgA</i>	PE143B_0109015	Homogentisate (1,2-dioxygenase)	EQ	-5.98	Sí
<i>gcvT</i>	PE143B_0111300	Aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T)	E	-2.47	Sí
<i>iaaM_2</i>	PE143B_0120965	Amine oxidase/ Lysine 2-monooxygenase	E	-4.65	Sí
	PE143B_0120655	Periplasmic aromatic amino acid aminotransferase beta precursor	E	-4.54	Sí
<i>dppA_4</i>	PE143B_0116835	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	E	-3.19	-
<i>spuE_1</i>	PE143B_0105970	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	E	-10.42	-
<i>ansA</i>	PE143B_0124820	Glutaminase/ Asparaginase	E	-3.20	Sí
<b>F: Nucleotide transport and metabolism</b>					
<i>nrdB</i>	PE143B_0131010	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta (Fragment)	F	-5.58	-
<i>apt</i>	PE143B_0108065	Adenine phosphoribosyltransferase	F	-3.52	-
<b>G: Carbohydrate transport and metabolism</b>					
<i>mgo</i>	PE143B_0117835	Probable malate:quinone oxidoreductase	G	-2.35	Sí
	PE143B_0125215	6-phosphogluconolactonase	G	-6.29	-
<i>adhP</i>	PE143B_0126365	Ethanol-active dehydrogenase	G	-3.78	-
<b>H: Coenzyme transport and metabolism</b>					
<i>pqqC</i>	PE143B_0120940	Pyrrroquinoline-quinone synthase	H	-2.99	-
<i>gpr_2</i>	PE143B_0102535	NADP-dependent oxidoreductase (Aldo/keto reductase)	H	-4.83	-
<i>gpr_1</i>	PE143B_0125325	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase	H	-6.25	-

<i>hemN_2</i>	PE143B_0108075	Coproporphyrinogen-III oxidase	H	-19.28	-
<i>hemF</i>	PE143B_0118415	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase	H	-2.14	-
<i>hemX</i>	PE143B_0125860	Uroporphyrin-III methyltransferase	H	-3.37	-
<i>nadC</i>	PE143B_0116995	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	H	-10.42	-
<i>mutT</i>	PE143B_0119945	Uncharacterized protein	H/V	-5.62	-
<i>sttH_2</i>	PE143B_0127025	Isochorismatase	HR	-3.90	Sí
<b>I: Lipid transport and metabolism</b>					
	PE143B_0105730	3-ketoacyl-ACP reductase	I	-40.11	-
<i>fabB</i>	PE143B_0113960	3-oxoacyl-ACP synthase	IQ	-2.19	Sí
<i>acsA</i>	PE143B_0122495	Acetyl-coenzyme A synthetase	I	-3.43	Sí
	PE143B_0117750	Long-chain fatty acid--CoA ligase	I	-3.31	-
<i>mmgB</i>	PE143B_0127650	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	I	-3.19	-
<i>mmgC_2</i>	PE143B_0102690	Acyl-CoA dehydrogenase	I	-2.17	-
<i>echA8</i>	PE143B_0102685	Enoyl-CoA hydratase	I	-3.38	-
<i>ygfF</i>	PE143B_0127340	Oxidoreductase	I	-8.05	-
	PE143B_0126370	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	I	-6.45	-
	PE143B_0100255	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	I	-5.92	-
<i>mdcD</i>	PE143B_0110685	Malonate decarboxylase subunit beta	I	-2.44	-
	PE143B_0105765	Phasin	I	-8.94	-
<i>phbX</i>	PE143B_0105760	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase	I	-7.65	-
	PE143B_0105725	Acetyl-CoA acetyltransferase	I	-48.76	-
<i>phaA</i>	PE143B_0119495	Acetyl-CoA acetyltransferase	I	-3.00	-
<b>J: Translation, ribosomal structure and biogenesis</b>					
<i>dusA</i>	PE143B_0121775	tRNA-dihydrouridine(20/20a) synthase	J	-7.20	-
	PE143B_0114265	Membrane protein	J	-2.28	-
<i>gatB</i>	PE143B_0128275	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	J	OFF	Sí
<b>L: Replication, recombination and repair</b>					
<i>recG</i>	PE143B_0124460	ATP-dependent DNA helicase RecG	L	-2.48	-
<b>M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>					
<i>pagL</i>	PE143B_0117290	Lipid A 3-O deacylase	M	-2.58	Sí

<i>murG</i>	PE143B_0117590	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl- (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N- acetylglucosamine transferase	M	-2.45	-
	PE143B_0123645	proteina externa de membrana OmpW	M	-7.62	-
	PE143B_0125535	Outer membrane porin. OprD family	M	-2.04	Sí
<b>O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</b>					
<i>htrA</i>	PE143B_0107140	Periplasmic serine endoprotease	O	-2.49	Sí
<i>clpB</i>	PE143B_0117090	Chaperone protein ClpB	O	-3.80	Sí
<i>msrA</i>	PE143B_0104830	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	O	-2.72	-
	PE143B_0129340	Peptidase	O	-6.58	-
	PE143B_0106285	Skp (probable outer membrane protein precursor)	MO	-3.17	-
<b>P: Inorganic ion transport and metabolism</b>					
<i>modA</i>	PE143B_0102420	Molybdate ABC	P	-6.30	Sí
<i>metQ</i>	PE143B_0122945	Methionine ABC transporter substrate-binding protein	P	-3.32	-
<b>Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>					
	PE143B_0100190	NADP-dependent oxidoreductase / Putative oxidoreductase YncB	QR	-3.64	Sí
<b>T: Signal transduction mechanisms</b>					
<i>mcpQ_8</i>	PE143B_0114540	Chemotaxis protein / Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)	T	-6.22	Sí
<i>zraR_1</i>	PE143B_0101895	Fis family transcriptional regulator	T	-2.04	-
	PE143B_0100880	Cyclic nucleotide-binding protein	T/R	-3.08	-
<b>V: Defense mechanisms</b>					
<i>hylD</i>	PE143B_0111365	Hemolysin secretion protein	VM	-3.72	Sí
<i>katE</i>	PE143B_0122960	Catalase	V	-4.94	-
<i>sod</i>	PE143B_0125285	Superoxide dismutase	V	-4.93	Sí
	PE143B_0113965	Peroxiredoxin	V	-4.23	-
	PE143B_0105715	Glycoside hydrolase family 43/hIYD	VM	OFF	-