

Tesis Doctoral

Influencia del regulador global Anr en la fisiología de *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria productora de polihidroxiбутirato

Tribelli, Paula María

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tribelli, Paula María. (2011). Influencia del regulador global Anr en la fisiología de *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria productora de polihidroxiбутirato. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Tribelli, Paula María. "Influencia del regulador global Anr en la fisiología de *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria productora de polihidroxiбутirato". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Influencia del regulador global Anr en la fisiología de *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria productora de polihidroxitirato

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Paula María Tribelli

Director de Tesis: Nancy Irene López.

Consejeros de Estudio: María Julia Pettinari

Buenos Aires, 2011.

Influencia del regulador global Anr en la fisiología de *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria productora de polihidroxi butirato.

Resumen

Pseudomonas extremaustralis es un organismo Antártico, que presenta alta resistencia al estrés y produce polihidroxi butirato (PHB). En este trabajo, se estudió su metabolismo microaeróbico, que está regulado en *Pseudomonas* por Anr. Se observó que es capaz de utilizar nitrato, reduciéndolo solo a nitrito. El genoma posee todos los genes involucrados en la desnitrificación, con excepción de los genes *nir*. Los genes de la fermentación de L-arginina son funcionales en esta especie.

Anr afectó positivamente la síntesis de PHB. Asimismo, influyó el estado redox celular, el consumo de oxígeno, el nivel de especies reactivas de oxígeno, la producción de exopolisacáridos (EPS) y proteínas extracelulares, la biosíntesis de aminoácidos y la utilización de distintas fuentes de carbono.

Los biofilms presentan gradientes de O₂. El PHB contribuyó a la supervivencia en forma planctónica en biofilms en frío y su ausencia resultó en una mayor formación de biofilms y EPS y menor movilidad. Anr también afectó el desarrollo de biofilms, dado que mutantes *anr* mostraron defectos en su formación, así como menor adhesión, agregación y mayor movilidad. En el genoma de esta especie se detectaron 167 probables blancos de regulación (Regulon Anr). Los resultados en conjunto muestran la importancia de Anr sobre la fisiología de *P.extremaustralis*.

Pseudomonas oxígeno Anr polihidroxi butirato redox biofilms

Influence of the Global Regulator Anr on the physiology of *Pseudomonas extremaustralis*, a polyhydroxybutyrate producer bacteria

Abstract

Pseudomonas extremaustralis is an Antarctic organism that shows high stress resistance and polyhydroxybutyrate (PHB) production. We studied the microaerobic metabolism, which is controlled by Anr in *Pseudomonas* species. This strain was capable to reduce nitrate, used as an electron acceptor, to nitrite. *P.extremaustralis* genome presented the genes involved in denitrification, excepting the *nir* genes. The genes involved in L-arginine fermentation were also functional in this species.

Anr positively affected PHB synthesis. In addition, this regulator influenced the cellular redox state, oxygen consumption, the presence of oxygen reactive species, the exopolysaccharides (EPS) and extracellular proteins production, the aminoacid biosynthesis and carbon source utilization.

Biofilms show oxygen gradients. PHB contributed to the survival of planktonic cells in the biofilm at cold conditions and its absence resulted in higher biofilm formation and EPS production and also lower motility. Additionally, Anr affected biofilm development; since an *anr* mutant strain showed defects in biofilm formation and cellular adhesion and aggregation and motility alterations. We detected 167 putative regulated target genes at the *P.extremaustralis* genome. These results show the important role of Anr in the *P.extremaustralis* physiology.

Pseudomonas oxygen Anr polyhydroxybutyrate redox biofilm

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Microbianas del Dpto. de Química Biológica por brindarme el lugar para hacer esta Tesis.

A mi Directora Nancy López. Gracias por estos años de trabajo, por guiarme y aconsejarme. Gracias por soportar mis ideas locas y hasta entusiasmartelo con algunas. Gracias por darme libertad y gracias por frenarme cuando fue necesario. Gracias por soportar las millones de interrupciones a tu trabajo con mis preguntas existenciales, preguntitas y preguntontas. Gracias por ser generosa en todos los aspectos de este trabajo. Muchas gracias por todo tu empeño, dedicación y cariño.

A la Dra. Beatriz Méndez por aconsejarme siempre y por compartir conmigo toda su experiencia para sea una mejor profesional.

A la Dra. María Julia Petinari por brindarme su ayuda y responder las miles de preguntas que le hice como consejera estos años.

A la Universidad de Cornell y al Dr. Anthony Hay por recibirme en su laboratorio. A la International Union of Biochemistry and Molecular Biology por permitir esta estadía.

A la Dra. Diana Posadas por los plásmidos para fluorescencia. A Daiana Votta por prestarme la sonda para ROS y ayudarme en la citometría de flujo.

A los chicos con los que compartí la docencia y aprendí de cada uno algo valioso: Alfonso, Carlos, Cybele, Fernando, Laura, Federico, y alguno que me puedo estar olvidando.

A los investigadores y docentes del Departamento de Química Biológica que en más de una oportunidad me ayudaron.

A Pablo por los consejos y la ayuda en la medición del poder reductor.

Al Laboratorio del Dr. Iusem: Norberto, Jose, Rodrigo y Melina por prestarme infinidad cosas y equipos. Por adoptarme casi como una media becaria de allá.

A Eva, no podría haber hecho las fermentaciones sin tu paciencia, ni los experimentos sin tu trabajo. Sos muy valiosa y especial, sabes que quiero que solo me quieras a mí. Gracias por todo!!

A los chicos del labo: gracias por todas las meriendas/cumples/festejos/mates/risas, gracias porque todo se hace más llevadero, porque soportan mis chinchas y ríen con mis exageraciones. Gracias por compartir! Mili, Marie, Manuel, Carla, Jime, Lau, Mer y los que ya no están entre nosotros jajaja (Pablo, Ale, Mariano)...los quiero!!!! A Lau también le agradezco las vueltas en el 42 y todas las veces que tuviste que aguantarme quejándome. A Jose, mi "hijo" y amigo, gracias por dejar que juegue un ratito a ser responsable de vos jaja, por ayudarme y dejar que te malcríe!. Gracias Mariana A. porque sabemos reírnos juntas de nosotras mismas, por volver locos a todos,

porque sos la que porque mas me entiende (No a la 24!), también gracias por ayudarme con consejos para los experimentos...al final nos vamos a doctorar!.

A mis amigas del corazón Shir, Maru y Lau. Gracias porque siempre estuvieron en este camino, gracias por escucharme y entenderme, las quiero mucho.

A mis papas Adriana y Roberto porque aunque ya abandone el nido se siguen preocupando por cómo andan esos bichitos y siguen tratando de entender que es lo que hago. Gracias por cuidarme y pensar en mí. Gracias por haberme enseñado como transitar la vida con esfuerzo, trabajo, honestidad y amor. Gracias por haberme impartido la fe en Dios que me guía y sostiene.

A Martiniano, mi esposo, mi compañero de la vida. No hay palabras para agradecer todo tu amor, comprensión y esfuerzo. Gracias por entender y compartir mis sueños y vocación. Sin tu apoyo esta Tesis no hubiese sido posible.

A los que siempre me acompañan

Algunos de los resultados descritos en esta Tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

Tribelli PM. and López NI. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the Antarctic novel species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. 2011. *Extremophiles*. 15:541-7.

Tribelli PM, Méndez B and López N. The oxygen sensitive global regulator, Anr, is involved in biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*. 2010. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 19:180–188.

.- Validation List N° 132. 2010. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 469–472. Publicación del nombre *Pseudomonas extremaustralis* (López,NI, Pettinari,MJ ,Stackebrandt, E., **Tribelli, P.M.**, Potter, M., Steinbüchel, A. and B.S. Méndez, 2010) como válido de acuerdo a los requisitos del Bacteriological Code (1990, Review).

López N., M. Julia Pettinari, Erko Stackebrandt, **Paula M. Tribelli**, Markus Pötter, Alexander Steinbüchel and Beatriz S. Méndez. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov. A poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an Antarctic environment. *Current Microbiology*.2009. 59:514–519.

Además se encuentran en preparación los siguientes artículos

Paula M. Tribelli, Laura J. Raiger Iustman, Mariela V. Catone, Carla Di Martino, Santiago Revale, Beatriz S. Méndez and Nancy I. López. Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis* a highly stress resistant Antarctic bacterium. Listo para ser enviado a la revista *Journal of Bacteriology*.

Tribelli PM, Hay A and Lopez NI. Biofilms development and cellular aggregation are impaired in an *anr* mutant strain.

Tribelli PM, Nickel PI, Oppezo O and Lopez Nancy. Redox state and oxidative stress resistance are modulated by Anr in *Pseudomonas extremaustalis*.

INDICE

INTRODUCCION

1. Generalidades de las especies del género <i>Pseudomonas</i>	1
2. El metabolismo energético de especies del género <i>Pseudomonas</i>	1
3. Obtención de energía en condiciones de baja tensión de oxígeno	2
Respiración del nitrato	3
Desnitrificación en especies del género <i>Pseudomonas</i>	4
Balance energético de la desnitrificación	6
Fermentación del aminoácido L-arginina en especies del género <i>Pseudomonas</i>	7
4. Regulación del metabolismo microaeróbico: El regulador global Anr	8
Rol de los reguladores globales	8
Funciones celulares reguladas por Anr en el género <i>Pseudomonas</i>	9
Estructura de los reguladores globales del metabolismo anaeróbico Fnr y Anr	11
5. Estado redox celular en el género <i>Pseudomonas</i> , estrés oxidativo y el papel de los reguladores globales.	13
Estrés oxidativo en células bacterianas	13
Estado redox en células bacterianas y los reguladores globales	15
6. Los polihidroxicanoatos bacterianos	16
Los polihidroxicanoatos y su relación con la fisiología bacteriana	17
Reguladores específicos y globales en la síntesis de PHB	19
7. Comunidades microbianas en condiciones de baja tensión de oxígeno:	21
Biofilms bacterianos	
Generalidades de los Biofilms	21
Formación de biofilms en el género <i>Pseudomonas</i>	23
Matriz extracelular en biofilms	26
Heterogeneidad en el biofilm: papel del oxígeno	27
Efecto de las bajas temperaturas en la fisiología bacteriana:	27
Papel de los biofilms	
8. <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	28
OBJETIVOS	29

MATERIALES Y METODOS

1. Cepas y plásmidos empleados	31
2. Técnicas de Biología molecular	33
Reacción Cadena de la Polimerasa (PCR)	33
Oligonucleótidos empleados	34
Programas de PCR utilizados	35
Preparación de DNA plasmídico	35
Digestión con enzimas de restricción	36
Purificación de fragmentos	37
Ligación en el sistema pGEMT-easy®	37
Reacción de Ligación	37
Obtención de <i>E.coli</i> competentes	37
Transformación de <i>E.coli</i>	38
3. Clonado y análisis del gen <i>anr</i> de <i>P.extremaustralis</i>	38
Complementación de <i>E. coli</i> Δ <i>fnr</i>	39
4. Construcción de <i>P.extremaustralis anr</i>	39
5. Condiciones de cultivo	41
Cultivos en Biorreactor	41
6. Determinaciones analíticas	43
Desnitrificación y utilización de arginina	
Determinación de nitrito	43
Determinación de la actividad enzimática arginina deiminasa (ADI)	43
Determinación de PHB	44
Determinación del estado redox celular	44
Determinación de la tasa de consumo de oxígeno	45
Estudios de la resistencia al estrés oxidativo	45
Estudio de proteínas extracelulares en cultivos controlados en biorreactor	47
Cuantificación de Exopolisacáridos totales	48
Caracterización del metabolismo de utilización de fuentes de carbono:	48
Ensayos empleando Biolog System	
Caracterización del metabolismo de aminoácidos	49
en <i>P. extremaustralis anr</i>	

7. Estudios de la expresión génica	50
Extracción de RNA	
Obtención del cDNA total	51
Experimentos de PCR cuantitativa en Tiempo Real (qPCR RT)	51
8. Estudios de la formación de biofilms en <i>P.extremaustralis</i>	52
Ensayos de biofilms en placas multipocillo	
Biofilms en condiciones batch: mini placas de Petri “bottom glass”	53
Ensayos de adhesión a tiempos cortos	54
Experimentos de agregación	55
Ensayos de movilidad bacteriana	55
9. Test estadísticos	55
10. Observación de células por Microscopía	56
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	56
Microscopía electrónica de transmisión	56
11. Análisis Bioinformáticos	57
Predicción <i>in silico</i> del Regulon Anr en <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	57
Análisis bioinformático de los genes de <i>P. extremaustralis</i>	57
12. Expresión de la proteína Anr*	59
13. Anexo	60
<u>RESULTADOS</u>	
Capítulo 1	65
i) Clonado y Análisis del gen <i>anr</i> en <i>P. extremaustralis</i>	65
Obtención del gen <i>anr</i> de <i>P. extremaustralis</i>	
Determinación de la funcionalidad de Anr de <i>P. extremaustralis</i> :	68
complementación en <i>E.coli</i> Δfnr	
ii) Estudio del metabolismo microaeróbico de <i>P. extremaustralis</i>:	69
Desnitrificación y Fermentación de L-Arginina	
Desnitrificación en <i>P. extremaustralis</i>	69
Fermentación del aminoácido L-arginina en <i>P. extremaustralis</i>	77
Capítulo 2: Influencia de <i>anr</i> sobre la producción de PHB	83
i) Construcción de una mutante <i>anr</i>	83

Caracterización inicial de una cepa <i>anr</i> de <i>P. extremaustralis</i>	84
iii) Estudios en Biorreactor	85
Crecimiento de <i>P.extremaustralis</i> y de su mutante <i>anr</i> en biorreactor	85
iv) Efecto de la mutación de <i>anr</i> sobre la acumulación de PHB	88
vi) Estudios de la regulación de Anr sobre la síntesis de PHB en <i>P. extremaustralis</i>	90
Estudios de expresión de los genes PHB en cultivos controlados en biorreactor	92
Capítulo 3: Influencia de <i>anr</i> sobre diversos parámetros celulares en <i>P. extremaustralis</i>	95
i) Estudio del estado redox celular: Determinación del cociente redox	95
ii) Efecto de la mutación <i>anr</i> sobre la resistencia a estrés oxidativo	98
Sensibilidad a peróxido de hidrógeno en medio sólido	98
Crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno	99
Presencia de especies reactivas de oxígeno	101
iii) Estudios del consumo de oxígeno	105
iv) Influencia de Anr sobre la utilización de diversas fuentes de carbono	108
iv) Determinación de los aminoácidos claves para el crecimiento.	110
v) Estudio del efecto de la tensión de oxígeno y de la mutación <i>anr</i> sobre la producción de exopolisacáridos y su relación con el PHB en <i>P. extremaustralis</i>	110
vi) Influencia de la tensión de oxígeno y de Anr sobre la producción de proteínas extracelulares en <i>P. extremaustralis</i>	112
vii) Efecto de la tensión de oxígeno y de la mutación <i>anr</i> en la morfología celular en <i>P.extremaustralis</i>	113
Capítulo 4: Biofilms en <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	116
i) Biofilms en frío: Rol del polihidroxibutirato	116
ii) Influencia de Anr sobre la formación de biofilms en <i>P. extremaustralis</i>	121
Biofilms en “Glass Bottom Petri Dishes”	122
Crecimiento planctónico en microaerobiosis	130
Experimentos de adhesión y agregación	132

Ensayos de movilidad	133
Capítulo 5: Predicción del Regulon Anr en <i>P.extremaustralis</i>	136
Discusión	144
Metabolismo de <i>P. extremaustralis</i> en condiciones de baja tensión de oxígeno y el papel de Anr	144
Rol del PHB en la formación de Biofilms a bajas temperaturas	155
Influencia de Anr en la formación de Biofilms	159
Perspectivas futuras	161
Conclusiones	163
Bibliografía	165

Introducción

1.Generalidades de las especies del género *Pseudomonas*

Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos que se encuentran distribuidas en diversos ambientes naturales, encontrándose, por ejemplo, en agua y suelo. Poseen una gran versatilidad metabólica que les permite sobrevivir y colonizar nichos ecológicos con condiciones poco favorables. Se las ha aislado de ambientes extremos donde predominan bajas temperaturas o altas salinidades, entre otros, y también en aquellos contaminados con hidrocarburos. Además existen especies patógenas tanto de especies animales como vegetales. En particular, las infecciones provocadas por *P. aeruginosa* son una de las causas principales de morbilidad y mortalidad entre pacientes con fibrosis quística. Por otra parte, también resultan beneficiosas como el caso de especies promotoras del crecimiento vegetal, cuyo ejemplo principal es *P. fluorescens*.

Además, son capaces de producir diversos compuestos de interés como pigmentos con propiedades antibióticas (O'Sullivan y O'Gara, 1992) y polímeros de importancia biotecnológica como los alginatos y los polihidroxicanoatos.

Por estas características, así como por su relativamente fácil manipulación en el laboratorio, las especies de *Pseudomonas* son de gran interés en microbiología, no solo básica sino también aplicada.

2.El metabolismo energético de especies del género *Pseudomonas*

Las especies del género *Pseudomonas* fueron consideradas tradicionalmente como organismos no fermentadores con respiración aeróbica (Stanier et al., 1966). Los elementos involucrados en la respiración en estas especies comprenden un pool de 17 deshidrogenasas respiratorias responsables del pasaje de los electrones desde las coenzimas hacia las quinonas (Williams et al., 2007). *P. aeruginosa* posee cinco oxidasas terminales que catalizan la reducción del oxígeno en agua: tres de ellas son citocromo c oxidasas (Cbb3-1, Cbb3-2 y Aa3), mientras que las dos restantes: el citocromo bo_3 (Cy_o) y la oxidasa insensible al cianuro (Cio) son quinol oxidasas. Las

distintas oxidasas terminales poseen diferente afinidad por el oxígeno y capacidad para el bombeo de protones (Arai, 2011).

La denominada oxidasa Cio ha sido descrita con baja afinidad al oxígeno y una baja capacidad de translocación de protones, algo similar a lo observado para Cyo. Por otro lado, los citocromos tipo Cbb3 poseen una alta afinidad al oxígeno y una mediana capacidad de translocación de protones a través de la membrana, mientras que el citocromo tipo Aa3 posee alta afinidad por el oxígeno y alta capacidad de translocación de protones. El conjunto de oxidasas terminales que pueden funcionar en las distintas condiciones de crecimiento le permiten a las especies de *Pseudomonas* una alta versatilidad metabólica (Arai, 2011).

La regulación de la expresión de los distintos citocromos está actualmente en estudio y existen distintos trabajos que señalan la importancia de la influencia de reguladores tipo redox (Cunnigham et al., 1997; Ugidos et al., 2008; Arai et al., 2011). En aquellas condiciones en las cuales la tensión de oxígeno disminuye, varias especies de este género son capaces de llevar adelante reacciones de respiración utilizando especies oxidadas de nitrógeno, como el nitrato o nitrito y en ausencia de estos, pueden realizar la fermentación del aminoácido L-arginina para la obtención de energía (Luthi et al., 1986).

3. Obtención de energía en condiciones de baja tensión de oxígeno

Respiración en ausencia de oxígeno: Utilización de compuestos oxidados del nitrógeno en el género *Pseudomonas*

En ausencia de oxígeno muchas *Pseudomonas* son capaces de utilizar al nitrato (NO_3^-) como aceptor alternativo de electrones en una serie de reacciones que involucran distintas proteínas, quinonas y citocromos, llevando a la generación de energía. En ciertas especies tales como *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *P. desnitrificans* (Jüngst et al., 1991) la reducción del nitrato se continúa con una serie de pasos secuenciales hasta nitrógeno molecular (N_2). En otras especies del género como *P. putida* KT2440 solo es posible el primer paso en el proceso de desnitrificación, es decir el pasaje de NO_3^- a NO_2^- , mientras que por ejemplo *P. fluorescens* CHAO-1 no es capaz de crecer en bajas tensiones de oxígeno (Laville et al., 1998; dos Santos et al., 2004).

Respiración del nitrato

El nitrato (NO_3^-) es un anión y su ingreso a la célula no puede ser por simple difusión a través de la membrana plasmática. Es necesario entonces, transporte activo con gasto de energía y síntesis de proteínas, tanto para el ingreso del nitrato como para la salida del nitrito generado, que es exportado al periplasma. Esto ha sido demostrado para *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, y *E. coli*. Estudios genéticos y fisiológicos sugieren que en algunas bacterias el transporte de nitrato puede ocurrir tanto por transportadores de tipo ABC así como por transportadores secundarios, que en *P. aeruginosa* corresponden a los productos génicos codificados por *narK1* y *narK2* (Sharma et al., 2006).

La enzima clave involucrada en la reducción del NO_3^- a NO_2^- , se encuentra tanto en aquellas especies que son capaces de llevar adelante la desnitrificación completa como aquellas que no, y esta enzima se denomina nitrato reductasa. Existen dos tipos de nitrato reductasas presentes en distintas especies bacterianas, aquella unida a la membrana plasmática (Nar) que genera fuerza protón motriz (FPM) a través de la membrana, permitiendo la síntesis de ATP, y por otro lado, la denominada Nap que parece ser desasimilatoria *sensu stricto* dado que si bien no está acoplada directamente a FPM para la generación de energía, interviene en la oxidación de las quinolonas vía un citocromo (tetrahemo) anclado en la membrana (Moreno-Vivian et al., 1999). Se cree que aunque esta enzima no aportaría FPM sí estaría involucrada en el mantenimiento del estado redox de la célula y en la denominada desnitrificación aeróbica (Richardson et al., 2001).

La enzima asociada a la respiración anaeróbica es entonces la denominada Nar. La caracterización bioquímica y estructural se ha llevado a cabo principalmente en *E. coli* y *Paracoccus denitrificans* y ha sido purificada además de otras bacterias capaces de respirar nitrato (Stewart et al., 1988; Zumft et al., 1997, Ballar y Ferguson, 1998; Grove et al., 2003). Se ha descrito que en *E. coli* existen dos isoenzimas distintas, la denominada Nar, que en anaerobiosis y en presencia de nitrato representa el 90% de la actividad respiratoria y la denominada Narz que se expresa constitutivamente pero en bajas cantidades y que sería importante en la transición de aerobiosis a anaerobiosis (Bonney et al., 1994).

La enzima Nar está compuesta por tres subunidades y los genes que codifican estas proteínas se encuentran organizados en un operon *narGHJI* en *P. aeruginosa* (Scheiber et al., 2007). La subunidad catalítica se denomina NarG (112-140 KD con

molibdeno como cofactor), la subunidad NarH (52-64 KD), que es soluble y que posee entre uno y tres centros FeS, y por último una subunidad integrada a la membrana, NarI (19-25 KD) una proteína quinol-oxidante y contiene además dos grupos hemo como parte de su estructura (Moreno-Vivian et al., 1999). La proteína NarJ no ha sido caracterizada completamente, sin embargo se cree que es una chaperona involucrada en la funcionalidad del resto del *cluster* (Blasco et al., 1998). Los componentes generales de la reacción de reducción del NO_3^- Figura 1I.

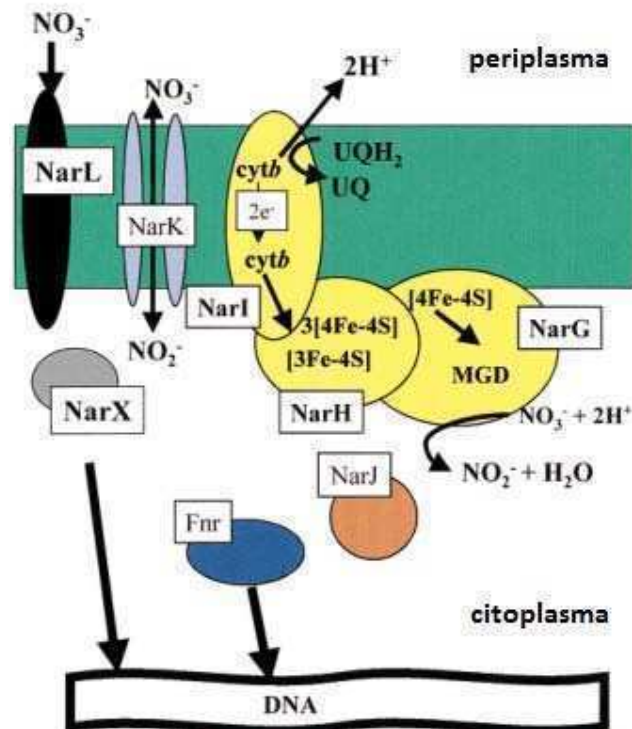


Figura 1I: Esquema de la enzima NAR en la utilización del nitrato. Modificado de Morozkina y Zvyagilskaya (2007).

Desnitrificación en especies del género *Pseudomonas*

En la sección anterior se ha descrito con detalle la reducción del nitrato, debido a que, además de ser el primer paso de reducción de especies oxidadas del nitrógeno acopladas a generación de energía, es compartido por distintas especies bacterianas pertenecientes a diversos géneros. Sin embargo, varias especies del género *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* o *P. stutzeri*, son capaces además de continuar el proceso de reducción hasta compuestos gaseosos como el NO o el N_2 . Las enzimas

involucradas en estos pasos se denominan nitrito reductasa (Nir), oxido nítrico reductasa (Nor) y la oxido nitroso reductasa (Nos) (Ye et al., 1994) y los pasos secuenciales de reducción se esquematizan en la Figura 2I.

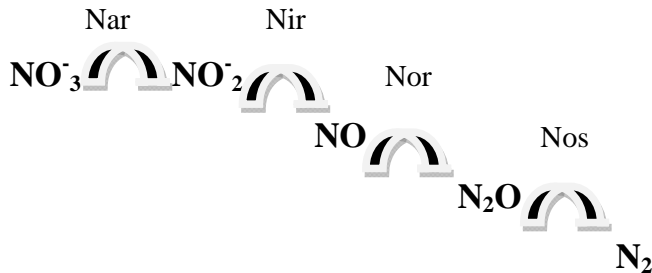


Figura 2I: Esquema de los pasos secuenciales de la desnitrificación completa.

La conversión de NO_2^- a NO es catalizada por la nitrito reductasa (Nir), una enzima periplásmica, que puede contener hemo o cobre en su estructura (Zumf, 1997).

La enzima Nir de *P. aeruginosa* corresponde a aquellas que contienen un grupo hemo (Cutruzola et al., 2001), y ha sido estudiada en profundidad. El operon que contiene los genes involucrados en la reducción del nitrito, *nirSMCFDLGHJEN*, fue también descrito en esta especie (Hasegawa et al., 2001).

El gen *nirS* codifica el gen estructural de la enzima, inmediatamente río abajo de éste se encuentran los genes *nirM* y *nirC* que codifican citocromos actuando como dadores de electrones durante la reducción del nitrito en *P. aeruginosa* (Hasegawa et al., 2001). En cambio, en algunas cepas de *P. fluorescens* y en *P. stutzeri* existe además, *nirT*, que codifica una proteína con un grupo tetrahemo. En otras especies menos estudiadas del género, como *Pseudomonas* sp. G-179 y *P. aureofaciens* se han encontrado Nir que contienen cobre (Cu), de las cuales no se ha determinado aún su funcionalidad. El óxido nítrico, producto de la reacción catalizada por esta enzima, es el intermediario más importante en bacterias desnitrificadoras y se le han adjudicado diversas funciones en el metabolismo anaeróbico, mucho más amplias que las relacionadas con la obtención de energía, que serán mencionadas en otras secciones de este trabajo.

Las enzimas oxido nítrico reductasas (Nor) son proteínas que pueden ser del grupo de hemo-proteínas como de no hemo-proteínas. Estas proteínas pueden ser además clasificadas según posean un dominio de citocromo c (cadena corta) o un dominio quinol oxidasa (cadena larga) (Zumft, 2005). Recientemente, se han descrito

una variedad de proteínas que pueden tener actividad oxido nítrico reductasa: citocromo *c'*, citocromo *c*, flavohemoglobina, flavorubredoxina, flavohierro proteínas y el citocromo tetrahemo *c*₅₅₄ (Zumft, 2008). El esquema general de los componentes moleculares de la desnitrificación y su ubicación en la célula se puede observar en la Figura 3I.

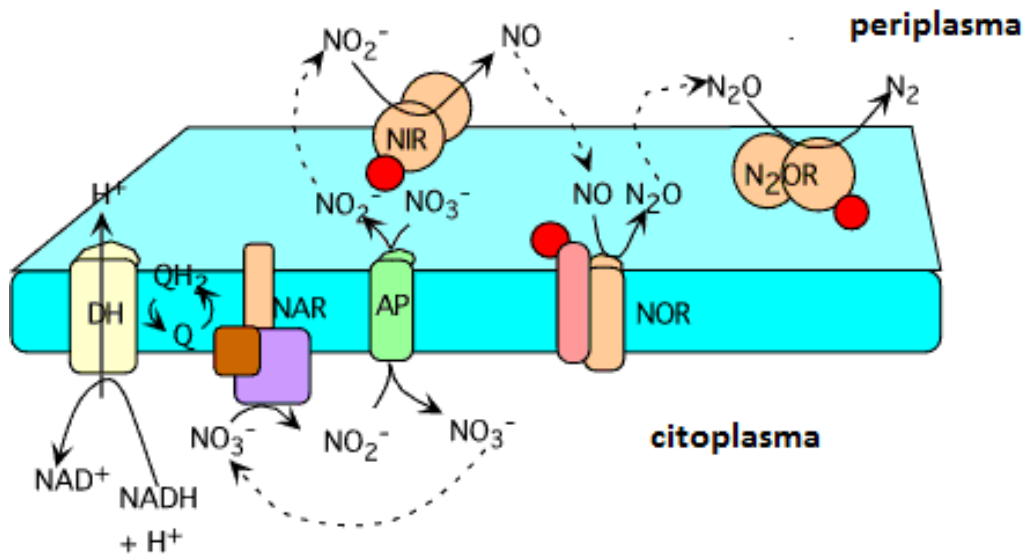
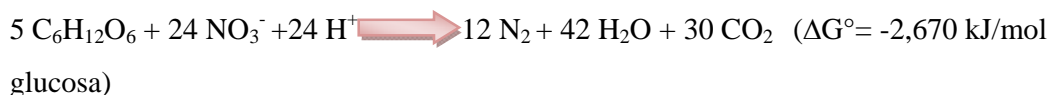
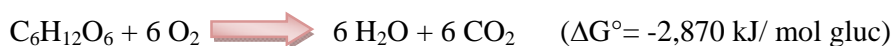


Figura 3I: Componentes moleculares de la desnitrificación. Modificado de Paustian, 1999.

Balance energético de la desnitrificación

El metabolismo lleva a la producción de equivalentes de reducción, que luego en la cadena respiratoria serán empleados para la producción de energía en forma de ATP, siendo el oxígeno como aceptor final de electrones en aquellos microorganismos aeróbicos. Lo mismo ocurre con la respiración microaeróbica en presencia de compuestos oxidados de nitrógeno como los discutidos en secciones anteriores.

En la siguiente ecuación se observa el balance energético que se obtiene en ambos casos:



De estas ecuaciones se esperaría que la cantidad de ATP obtenido a partir del nitrato sea similar que en la respiración aeróbica, por lo que en ausencia de oxígeno, la respiración del nitrato sería preferida frente a otros metabolismos (Strohm et al., 2007).

La reducción de NO_3^- a N_2 involucra cinco grandes complejos: la Nar (discutida anteriormente), NADH deshidrogenasa y la Nor que son proteínas integrales de membrana; a estas se agregan, Nir y la Nos en el periplasma. La NADH deshidrogenasa y la Nar están involucradas en el bombeo de protones activo, mientras que los otros componentes consumen protones en el espacio periplásmico, sin afectar la producción de ATP. La reducción de dos moléculas de NO_3^- a N_2 con 5 moléculas de NADH como dador de electrones produce la translocación de 36 protones a través de la membrana (Strohm et al., 2007). Si se asume que 4 protones son necesarios para la síntesis de una molécula de ATP, 9 moléculas de ATP pueden ser sintetizadas a partir de las moléculas de 5 moléculas de NADH provenientes del metabolismo de carbono con la fuerza protón motriz que se desprende de la reducción de dos moléculas de NO_3^- siendo entonces el resultado 1,8 moléculas de ATP por molécula de NADH (Dimroth, 2000; Strohm et al., 2007).

Es entonces posible observar que las especies que llevan adelante un proceso de desnitrificación completa obtendrán más energía a partir del NO_3^- que aquellas como *E. coli* que sólo es capaz de realizar el primer paso de este proceso (Moreno-Vivian et al., 1999).

Fermentación del aminoácido L-arginina en especies del género *Pseudomonas*

En ausencia de oxígeno o de nitrato las especies del género *Pseudomonas* son capaces de llevar adelante una reacción de fermentación a partir del aminoácido L-arginina llevando a la generación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato (Vander Wauven et al., 1984). La degradación de este aminoácido tiene como intermediarios ornitina y citrulina y el esquema general de las reacciones se observa en la Figura 6I.

Los genes involucrados en este metabolismo se encuentran ubicados en el operon *arcDABC* y en la regulación de la expresión de los genes intervienen distintos factores, entre ellos la tensión de oxígeno, la presencia de nitrato en el medio de cultivo y una regulación global que luego será abordada con mayor detalle.

La enzima arginina deiminasa (ADI) es clave para este metabolismo y se encuentra codificada por el gen *arcA*; cataliza el paso irreversible de arginina a citrulina con liberación de amoníaco. La segunda enzima, ornitina carbamoiltransferasa, que interviene en el paso de conversión de citrulina a ornitina, es codificada por el gen *arcB*. El producto del gen *arcC* se denominó carbamato kinasa que cataliza la reacción que

lleva a la formación de ATP (Figura 4I) (Vader Wauven et al., 1984). El primer gen del operón, *arcD*, codifica una proteína a la que se le ha adjudicado una actividad arginina/ornitina “*antiporter*” y presenta 13 pasos transmembrana. Este transporte es equimolar y se cree que se produce para mantener el equilibrio dentro de la célula ya que ambos compuestos están cargados positivamente (Verhoogt et al., 1992).

En conjunto, las proteínas que se expresan desde el operón *arcDABC* permiten que las especies del género *Pseudomonas* utilicen el aminoácido L-arginina como fuente de energía, sin embargo, sólo se obtiene una molécula de ATP por cada molécula de arginina por lo que se cree que la importancia de este tipo de metabolismo radica en el mantenimiento de la supervivencia en condiciones de estrés, o desfavorables, o en la transición de aerobiosis a microaerobiosis (Eschbach et al., 2004; Trunk et al., 2011).

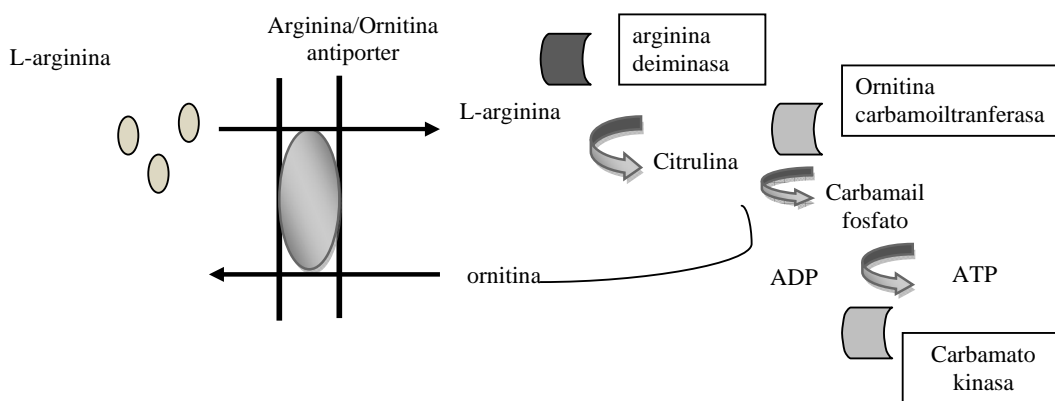


Figura 4I: Esquema del camino metabólico de la fermentación del aminoácido L-arginina en *P. aeruginosa*.

4.Regulación del metabolismo microaeróbico: El regulador global Anr

Rol de los reguladores globales

La respiración aeróbica y anaeróbica, y la fermentación constituyen diferentes caminos metabólicos que permiten a las bacterias optimizar la obtención de energía según el nivel de oxígeno disponible en el ambiente (Patschkowski et al., 2000). Existen sofisticados mecanismos y redes regulatorias interrelacionadas que determinan la expresión de distintas vías metabólicas de acuerdo a la disponibilidad de oxígeno u otros aceptores de electrones. Por ejemplo, en el caso de la desnitrificación, las señales

que inducen la síntesis de los componentes involucrados en esta vía son la baja tensión de oxígeno y la presencia de óxidos de nitrógeno respirables, tales como el nitrato y el nitrito, además de hierro para la síntesis *de novo* de enzimas y citocromos (Zumt, 1997). En general este tipo de respuestas adaptativas están coordinadas por reguladores globales; en *E. coli* por ejemplo, Fnr y ArcA constituyen reguladores de este tipo.

En las especies del género *Pseudomonas*, los genes involucrados en la transición aeróbica-microaeróbica están regulados de forma directa o indirecta por el regulador global del metabolismo anaeróbico Anr (Arginine Nitrate Regulation). Este regulador ha sido caracterizado molecularmente en *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, donde se lo denominó *fnrA*, *P. putida*, *P. fluorescens*, y en varios patovares de *P. syringae* pv *tomatoe*, *phaseolicola* y *syringae* (Sawers, 1991).

Funciones celulares reguladas por Anr en el género *Pseudomonas*

El regulador Anr controla positivamente los genes del operón *arcDABC*, la enzima nitrato reductasa (Galiman *et al.*, 1991) y al regulador Dnr, que activa a su vez la transcripción de los genes involucrados en los siguientes pasos de desnitrificación. Además, tanto Anr como ArcA en *E. coli* regulan negativamente, los genes que codifican proteínas implicadas en la respiración aeróbica, como por ejemplo, el complejo citocromo oxidasa (Cotter *et al.*, 1997; Ugidos *et al.*, 2008). En *P. aeruginosa*, Anr está además involucrado en la regulación de los genes de la fermentación del piruvato, que le permite a la célula sobrevivir largos periodos de tiempo a bajas tensiones de oxígeno y en ausencia de nitrato y arginina (Schreiber *et al.* 2006). La regulación del metabolismo energético es compleja e interrelacionada (Figura 5I), por ejemplo, la utilización de arginina está controlada positivamente no sólo por Anr sino también por ArgR, pero a su vez en presencia de nitrato la transcripción de estos genes se ve parcialmente reprimida por el regulador NarL, que a su vez está controlado por Anr (Schreiber *et al.*, 2007; Benkert *et al.*, 2008). Además de esto, la proteína ArgR actúa regulando varios genes involucrados también en la utilización y síntesis de arginina (Park *et al.*, 1997).

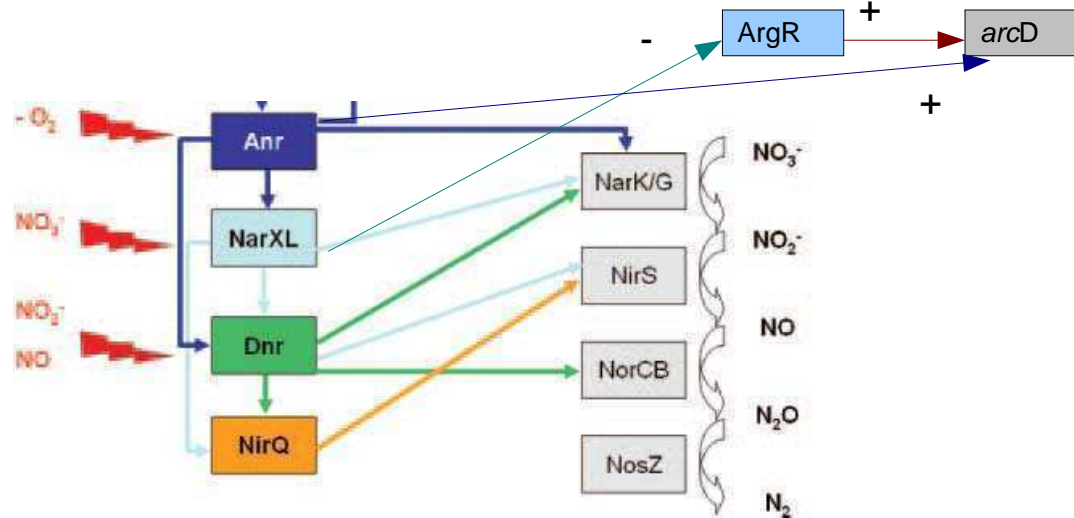


Figura 5I: Relación entre los reguladores de los genes involucrados en el metabolismo energético en bajas tensiones de O_2 . Figura modificada de Schreiber et al., 2007

Si bien los genes relacionados con la obtención de energía en anaerobiosis han sido los primeros y los más tradicionalmente estudiados, se conoce actualmente que otras funciones celulares están bajo el control de Anr, por ej. genes de aerotaxia, genes fimbriales, y es esencial en *P. aeruginosa* en procesos de patogenicidad en modelos de infección en lechuga (Filiatrault *et al.*, 2006; Vallet-Gely *et al.*, 2007). Un resumen de los genes cuya regulación por Anr se ha comprobado experimentalmente se muestra en la Tabla II, incluyendo un pequeño RNA regulatorio que regula el *quorum sensing* (QS) demostrándose muy recientemente por primera vez una relación entre el oxígeno y el QS en *P. aeruginosa* (Sonnleitner *et al.*, 2011).

Recientemente se realizó un trabajo de proteómica y de transcriptómica en *P. aeruginosa* intentando dilucidar el denominado Regulón de Anr (Trunk *et al.*, 2010). En dicho trabajo se pueden encontrar una gran variedad de genes que estarían controlados por Anr (aunque aún queda pendiente la realización de estudios experimentales con cada uno de ellos). Entre los posibles blancos, que aún no han sido estudiados en profundidad, se pueden destacar el gen *katA* (catalasa), *mexR* (regulador del sistema de multiresistencia a drogas), *fhp* (flavoproteínas), varios genes involucrados en el metabolismo de los aminoácidos, como *dadA*, *gabT*, *thrB* entre otros.

Tabla 1I: Genes regulados por Anr. Esta regulación ha sido comprobada experimentalmente.

Gen	Función relacionada/enzima	Referencias
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>dnr</i>	Regulador transcripcional	Arai et al., 1997
<i>ackA</i>	Acetato kinasa	Eschbach et al., 2004
<i>cytN fixN ccoN</i>	Citocromo oxidasa	Comolli y Donohue, 2004
<i>aer</i>	Aerotaxia	Hong et al., 2004
<i>adh</i>	Alcohol deshidrogenasa	Boes et al., 2008
<i>hcnA</i>	Producción de HCN	Pessi y Haas, 2000
<i>narX</i>	Sensor de Nitrato	Schreiber et al., 2007
<i>arcD, nar</i>	Fermentación de L-arginina Nitrato reducción	Galimand et al., 1991
<i>azu</i>	Transporte de electrones	Vijgenboom et al., 1997
<i>phRS</i>	RNA regulatorio	Sonnleitner et al., 2011
<i>cupA</i>	Fimbrias	Vallet-Gely et al., 2007
<i>P. putida KT2440</i>		
<i>Cyo, cioAB, cbb3.1</i>	citocromos	Ugidos et al., 2008

Estructura de los reguladores globales del metabolismo anaeróbico Fnr y Anr

Los reguladores, Fnr de *E.coli* y Anr de *Pseudomonas* comparten, tal como se ha mencionado anteriormente, algunas características estructurales. La capacidad de “senar” el oxígeno y la de actuar como factor de transcripción se encuentran en la misma proteína. En la descripción tradicional de estos reguladores, se observa que una agrupación o *cluster* Fe-S sensible al oxígeno es el dominio responsable de detectar el nivel de oxígeno (Figura 6I).

Ambos reguladores presentan un dominio de unión al DNA a través del cual se unen a secuencias consenso, denominadas “Fnr o Anr-box” respectivamente, ubicadas río arriba de los genes que regulan (Sawers, 1991). La secuencia aminoacídica de Anr revela tres cisteínas conservadas en la región amino-terminal y una cisteína interna (122 numeración *E. coli*) que están relacionadas con el centro $[4Fe-4S]^{2+}$ “sensor” de O_2

(Crack et al, 1993). En ausencia de oxígeno, por monómero de proteína, se produce la transformación desde la forma inactiva $[2\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ a la forma activa $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$. Esta reducción del centro hierro-azufre determina un cambio conformacional que permite la dimerización aumentando la unión sitio específica al DNA en los genes blanco (Lazazzera et al., 1993; Jervis y Green, 2007).

La unión de estos reguladores a los promotores de los genes que regulan se da a través de un motivo hélice-vuelta-hélice (HTH) en la región C-terminal. Este motivo estructural contiene residuos conservados Glu-209 y Ser-212 (numeración de *E. coli*), requeridos para la unión al DNA (Moore *et al.*, 2006). En Fnr, los aminoácidos Met-144, Met-147, Ile-151 y Ile-158 (numeración de *E. coli*) forman una interfase hidrofóbica que promueve la dimerización (Akyol y Çömlekcoglu, 2009).

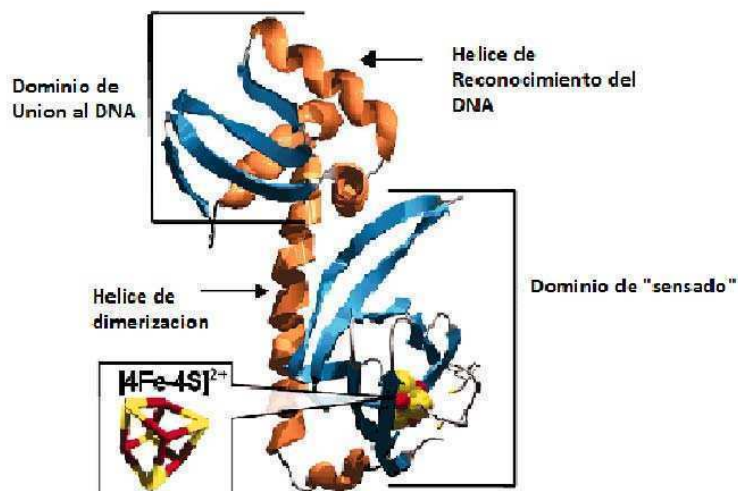


Figura 6I: Esquema de la estructura de un monómero de Fnr. Modificado de Crack et al., 2007

5. Estado redox celular en el género *Pseudomonas*, estrés oxidativo y el papel de los reguladores globales.

Estrés oxidativo en células bacterianas

Cuando los organismos se desarrollan empleando oxígeno o especies oxidadas del nitrógeno, como el nitrato, para la obtención de energía en la cadena respiratoria, se producen continuamente compuestos denominados especies reactivas del oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), como por ejemplo H_2O_2 , O_2^\bullet , NO^\bullet entre otros. Las especies reactivas son toleradas y mantenidas en niveles tolerables por distintos procesos enzimáticos de detoxificación que involucran proteínas como catalasas, superóxido dismutasas, glutatión reductasas que dependen, en algunos casos, de moléculas como el NADPH por ejemplo (Meyer et al., 2009).

El daño celular por estrés oxidativo puede provocar la muerte celular debida a la destrucción de las macromoléculas, además es conocido que las ROS modulan gran cantidad de procesos celulares, por lo que los mecanismos y defensas anti-oxidativas son de gran importancia para el mantenimiento celular. Los blancos biológicos de las ROS y de las RNS son el DNA, RNA, proteínas y lípidos (Koharyiva y Kollarova, 2008).

En los lípidos, los radicales libres pueden atacar directamente los ácidos grasos preferentemente insaturados e inician la peroxidación lipídica. El efecto primario de la peroxidación es la disminución de la fluidez de membrana, lo cual altera a su vez las propiedades de la misma, produciendo además la disrupción de la unión a proteínas que se encuentran en la membrana. Esto actúa como un amplificador del efecto debido a que más radicales libres son formados y los lípidos afectados se degradan en diversos compuestos, algunos de los cuales son aldehídos altamente reactivos, que tienen como blanco a las proteínas. Estos aldehídos poseen una vida media más larga y pueden atacar a moléculas que se encuentran distantes al punto de origen del estrés oxidativo y son conocidos como mensajeros secundarios tóxicos (Humphries y Sweda 1998).

En el caso del efecto sobre el DNA, las ROS o RNS actúan tanto sobre las bases nitrogenadas como sobre los azúcares, produciendo, por ejemplo, rupturas en la cadena tanto simple como doble, aductos de las bases y el azúcar, uniones cruzadas con otras moléculas y lesiones que bloquean la replicación (Koharyiva y Kollarova, 2008).

Por otro lado, las proteínas también son susceptibles al daño por parte de las especies reactivas. Entre los daños más comunes se incluyen: la oxidación de los grupos sulfhidrilos, la formación de uniones no adecuadas entre proteínas, la aducción oxidativa de los aminoácidos cercanos a grupos metálicos, la modificación de grupos prostéticos o metálicos y la carbonilación (Koharyiva y Kollarova, 2008).

Debido a las consecuencias de un aumento o exceso de radicales libres los sistemas que controlan su producción o detoxifican estas moléculas son de gran importancia para el mantenimiento celular.

En *E.coli*, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es eliminado del citoplasma, por dos catalasas (KatE and KatG) y por una peroxidasa (AhpCF). Recientemente se ha destacado el papel de transportadores de cisteína, presentes en el periplasma, en el balance oxidativo de las células ya que en este espacio tiene lugar la siguiente reacción:



En *E. coli* se ha observado que la expresión de los genes que codifican los transportadores de cisteína, FliY y YdeD, se ve aumentada en presencia de H_2O_2 constituyendo un nuevo sistema de resistencia al peróxido de hidrogeno complementario a las catalasas citoplasmáticas (Ohtsu et al., 2010).

P. aeruginosa posee una gran batería de defensas contra las especies reactivas, que incluyen dos superóxido dismutasas (SODs) que pueden presentar como cofactor al hierro o al manganeso, tres catalasas (KatA, KatB y KatC) y cuatro alkil hidroperóxido reductasas (AhpA, AhpB, AhpCF, and Ohr) (Salunkhe et al., 2005).

P. aeruginosa posee múltiples sistemas dependientes de OxyR, presentando además funciones solapadas. Se han identificados tres blancos del regulador OxyR, *katB-ankB*, *ahpB* y *ahpC-ahpF*, que responden a distintos agentes exógenos, incluyendo H_2O_2 , paraquat y peróxidos orgánicos (Hasset et al., 2000). El papel de los reguladores sobre estos genes ha despertado gran interés y es un campo que actualmente está siendo intensamente estudiado debido a la importancia que tienen estas defensas frente al estrés oxidativo generado por ejemplo, por el sistema inmune ante una infección, por antibióticos y por distintas condiciones ambientales.

Estado redox en células bacterianas y los reguladores globales.

Un proceso de vital importancia para el mantenimiento de las células es la obtención de energía, mediante reacciones de tipo oxidativas que tienen como objetivos fundamentales (i) la construcción de estructuras celulares (ii) el mantenimiento de estas estructuras y (iii) la provisión de la energía necesaria para llevar adelante los procesos celulares. La energía proviene del movimiento de electrones hacia los aceptores finales de electrones, que dependerá del tipo de organismo. Los pares oxido-reductores son moléculas responsables de mantener un estado de óxido-reducción adecuado para cada especie, por lo que es posible monitorear el estado redox celular a partir de estos pares de moléculas (Schafer y Buettner, 2001).

Los pares de moléculas oxido-reductoras más importantes son: NADH/ NAD⁺, NADPH/NADP⁺ y GSH/GS⁺. Durante la respiración, el cofactor NADH actúa primeramente en la generación de ATP durante la fosforilación oxidativa; contrariamente, el cofactor redox NADPH actúa en reacciones de tipo anabólicas. Para que sea posible llevar adelante estas funciones estos dos cofactores no están normalmente en equilibrio termodinámico y el cociente entre las formas reducidas y oxidadas es normalmente un indicador del estado redox celular (Fuhrer y Sauer, 2009).

Además de su participación en reacciones anabólicas, el NADPH tiene un papel preponderante en las defensas oxidativas ya que actúa como cofactor de diversas enzimas antioxidantes, como por ejemplo la glutatión reductasa (Mailloux et al., 2010). En *P. fluorescens* se ha observado que cuando las células son expuestas a estrés oxidativo se modula el *pool* NADH+NAD⁺ y NADPH + NADP⁺ derivando gran parte de la concentración de los mismos hacia la forma fosforilada (Mailloux et al., 2010). Esto es debido a que, por un lado disminuye el aporte de equivalentes de reducción hacia la cadena respiratoria disminuyendo así las especies reactivas de oxígeno que se dan normalmente durante la respiración. Por otro lado, como ya se ha señalado, un aumento en la concentración de NADPH contribuye a la detoxificación de ROS o de RNS que actúan en condiciones de estrés oxidativo (Mailloux et al., 2010).

6. Los polihidroxicanoatos bacterianos

El estado redox celular puede considerarse como la resultante del conjunto de procesos metabólicos que tienen lugar en la célula. Estos procesos comprenden reacciones del metabolismo primario, como lo son la generación de energía y el crecimiento celular pero también involucra otros procesos celulares no esenciales tales como la producción de sustancias de reserva o de pigmentos que pueden tener influencia en el estado redox celular.

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros de reserva sintetizados por una gran variedad de bacterias y se almacenan en gránulos intracelulares discretos, pudiendo alcanzar hasta el 90% del peso seco celular (Madison y Huisman, 1999). Las bacterias productoras y otros microorganismos del ambiente son a su vez capaces de degradarlos, mediante la acción de enzimas específicas, hasta CO₂ y agua en condiciones aeróbicas. El primer PHA descubierto y el más estudiado es el poli (3-β-hidroxi-butirato) (PHB), un homopolímero que fue descrito en la especie *Bacillus megaterium* en el año 1925 (Lemoigne, 1926). A partir de este descubrimiento se han detectado otros polímeros con una gran diversidad en cuanto a los ácidos hidroxicanoicos que los integran, lo cual determina que exista una enorme variedad de biopolímeros con propiedades físicas y químicas diferentes. Existen distintos polímeros según su composición monomérica (un esquema general se observa en la Figura 7I): PHA de cadena media, los PHA_{mlc} (cuyos monómeros están compuestos desde 6 a 15 carbonos) y los denominados PHA de cadena corta (PHA_{slc}), cuyo monómeros poseen menos de 3 a 5 carbonos. Entre estos últimos se clasifica el PHB (que posee 4 carbonos en sus monómeros). Los genes involucrados en la biosíntesis de PHB han sido estudiados en un amplio rango de especies (Steinbüchel y Valentin, 1995). El camino biosintético más ampliamente distribuido, para la síntesis de PHB, incluye 3 enzimas: una β-cetotiolasa, que condensa 2 moléculas de acetyl-CoA en acetoacetyl-CoA, una reductasa dependiente de NADPH o NADH, encargada de reducir este compuesto para dar D(-)-3-hidroxi-butiril CoA y una PHB sintasa o polimerasa, que usa este compuesto como sustrato para la polimerización (Steinbüchel y Hein, 2001). En el caso de los PHA de cadena media el camino biosintético que lleva a la producción de estos polímeros depende de un grupo de genes constituidos por dos sintasas *phaC1* y *phaC2* separados por un gen que codifica una depolimerasa, *phaZ*.

Entre las bacterias productoras de PHA de cadena corta se encuentra *Cupriavidus necator* (anteriormente denominada *Ralstonia eutropha*) y entre las productoras de cadena media la mayoría de las especies de *Pseudomonas* (Rehm, 2003). La producción de PHA_{mlc} es considerada un rasgo general y casi exclusivo de las *Pseudomonas* (Huisman *et al.*, 1991; Timm *et al.*, 1994).

La utilidad de estos bioplásticos está limitada por su costo, ya que su precio sigue siendo demasiado alto como para reemplazar a los plásticos tradicionales. Por lo tanto, el análisis de los factores que controlan su biosíntesis resulta fundamental para lograr la optimización de los procesos de producción. Entre los factores que contribuirían a abaratar los costos a escala industrial se encuentran aquellos derivados de la agitación del cultivo para lograr el suministro adecuado de oxígeno. Teniendo en cuenta que el petróleo es un recurso no renovable y que las proyecciones internacionales indican que la escasez del mismo se incrementará en los próximos años, el estudio de estos biopolímeros con miras a lograr la disminución de sus costos de producción, resulta de gran relevancia para la economía, sobre todo de países en desarrollo. La progresiva acumulación de los desechos sólidos es un problema global que se incrementa con la industrialización y el consumo. La acumulación de plásticos en particular, constituye un serio problema por su persistencia dado que permanecen en la superficie terrestre prácticamente inalterables por miles de años (de Almeida *et al.*, 2004). Por este motivo, el estudio de los PHA es actualmente de gran interés debido a su posible aplicación industrial y a las ventajas ambientales y económicas que proveería su utilización a gran escala.

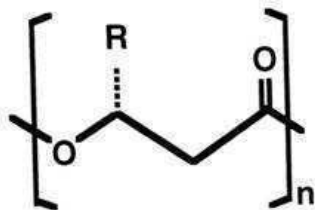


Figura 7I: Esquema general de una molécula de polihidroxicanoato (PHA), modificada de Almeida *et al.*, 2004.

Los polihidroxicanoatos y su relación con la fisiología bacteriana

Los PHAs son, además de un producto de interés biotecnológico, importantes para la fisiología bacteriana.

La biosíntesis de estos polímeros puede darse a partir de distintos precursores provenientes de la degradación de hidratos de carbono y de la síntesis de novo de ácidos grasos y la β -oxidación, tal como se puede diferenciar en la Figura 8I (Aldor y Keasling,

2003). Es importante destacar que la síntesis de PHA se desencadena en condiciones de desbalance nutricional, con altos niveles de carbono y bajo nitrógeno, por ejemplo.

Para la síntesis del polímero, además de los esqueletos carbonados, es necesario el aporte de equivalentes de reducción. En condiciones desfavorables para el crecimiento el PHA puede ser degradado para la obtención de energía. En este aspecto, un elemento relevante, y que actualmente se encuentra en estudio, es la disponibilidad de oxígeno, ya que impacta de manera directa en el estado redox, la disponibilidad de poder reductor, la expresión de genes de respiración, etc.

La síntesis y degradación de los PHA es un proceso dinámico y se ha demostrado en *P. putida* U que las enzimas polimerasas y depolimerasas son activas en forma simultánea, en base a estas observaciones se podría inferir que se genera un ciclo fútil, sin embargo, se ha sugerido que el metabolismo global de estos polímeros es regulado por el flujo intracelular de los cocientes $[NADH]/[NAD^+]$ y $[acetil-CoA]/[CoA]$ (Ren et al., 2009).

En *P. putida* la actividad de la enzima polimerasa es estimulada por un alto cociente $[3\text{-hydroxyacyl-CoA}]/[CoA]$. Durante la fase activa de crecimiento este cociente es alto así como el cociente $[NADH]/[NAD^+]$, mientras que esta relación se invierte durante la fase estacionaria del crecimiento (Ren et al., 2009). Si bien el contenido de la enzima se ha visto aumentado en con el crecimiento bacteriano la actividad enzimática se ve disminuida (Ren et al., 2010) con lo cual el estado celular y la presencia de otras proteínas influyen en el ciclo de síntesis y degradación.

A

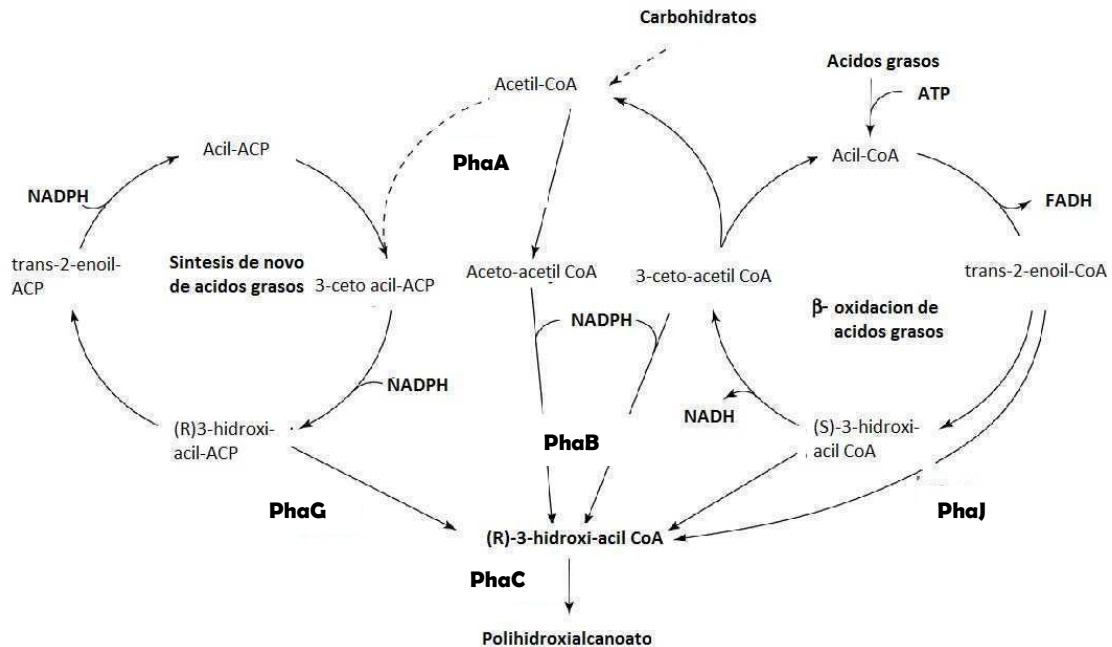


Figura 8I: Esquema general de la síntesis de los PHA desde distintos metabolismos centrales. Modificado de Aldor y Keasling, 2003.

Reguladores específicos y globales en la síntesis de PHA

Los trabajos realizados hasta el momento sobre la regulación de la síntesis de PHA en diversas especies productoras demuestran que la expresión de estos genes es inducible y está sometida a dos tipos de regulación. El primer tipo de regulación es específica y está mediada por reguladores de la transcripción, asociados normalmente a los genes estructurales, que asegura que estos genes sólo se expresen en presencia de los sustratos necesarios para la síntesis del polímero; y en muchos casos estas proteínas regulatorias se han encontrado unidas a los gránulos de PHA en el citoplasma de la célula (Matsusaki et al., 1998; Prieto et al., 1999; Maehara et al., 2002; Peralta-Gil et al., 2002).

Superpuesta a esta regulación específica existe una regulación global, mediada por reguladores que afectan a muchos genes, y que asegura que la expresión de los genes necesarios para la síntesis y/o degradación de PHA sólo se induzca en

determinadas condiciones fisiológicas. Sin embargo, poco se conoce acerca de la influencia de los mecanismos de regulación global en el metabolismo de los PHA. En este sentido, estudios realizados en nuestro laboratorio en *Pseudomonas* con *rpoS*, el regulador global de la respuesta a estrés, demostraron la relación entre la degradación de PHA, el aumento de la alarmona tetrafosfato de guanósina, ppGpp, y la concentración intracelular de RpoS (Ruiz *et al.*, 2001, Ruiz *et al.*, 2004). Estos resultados mostraron por primera vez un mecanismo molecular que relaciona la respuesta general a estrés, controlada por RpoS, y la depolimerización de PHA.

Dentro de los mecanismos de control global en microorganismos aerobios se encuentran aquellos involucrados en la respuesta a distintas concentraciones de oxígeno. En *E. coli* la transición de una condición aeróbica a otra anaeróbica provoca un cambio que afecta a más de un centenar de proteínas. Los reguladores globales involucrados en la respuesta a la concentración de oxígeno, Fnr y ArcA, han sido estudiados extensivamente en esta bacteria (Levanon *et al.*, 2005; Kumar y Shimizu, 2010). Si bien *E. coli* no produce PHA, estudios realizados con cepas recombinantes, productoras de PHB y mutantes para el regulador del estado redox ArcA, mostraron alta acumulación del polímero en microaerobiosis (Nikel *et al.*, 2006). Esto resulta sumamente interesante para la producción a escala industrial mediante procesos de fermentación, ya que el costo de mantener un cultivo en condiciones de microaerobiosis es menor que en aerobiosis, debido a que se evita el gasto ocasionado por la alta agitación y el burbujeo de oxígeno.

Existen pocos trabajos que analizan la relación entre la acumulación de polímeros de reserva y los reguladores involucrados en la respuesta a limitación de oxígeno en productores naturales de PHA. En *Paracoccus denitrificans*, se ha demostrado la capacidad de acumular PHB a partir de moléculas orgánicas de bajo peso molecular como el acetato en condiciones de microaerofilia (Barak y van Rijn, 2000). En *Azotobacter vinelandii*, se ha señalado que *cydR*, gen homólogo a *fnr*, está involucrado en el control de la síntesis de PHB (Wu *et al.*, 2001). Otro ejemplo de esto, lo constituye el regulador AniA de *Sinorhizobium meliloti* que funciona a baja tensión de oxígeno y está relacionado con la modulación del flujo de carbono (Povolo y Casella, 2000).

Es entonces de interés profundizar el conocimiento acerca de la regulación global de la síntesis de los PHA en bacterias productoras naturales, en relación con el

estado fisiológico, la disponibilidad de aceptores de electrones y poder reductor, y la coordinación de la expresión génica.

7. Comunidades microbianas en condiciones de baja tensión de oxígeno: Biofilms bacterianos

La producción de polímeros de reserva en bajas tensiones de oxígeno es de interés en nuestro laboratorio así como el rol del regulador global Anr en la fisiología bacteriana. En los últimos años se ha destacado el papel de los biofilms en la supervivencia y crecimiento bacteriano en la naturaleza y teniendo en cuenta, que esta forma de vida se desarrolla en presencia de gradientes en la tensión de oxígeno se abordará en esta tesis el estudio de los biofilms en *P.extremaustralis*.

Generalidades de los Biofilms

Se denominan biofilms a las comunidades bacterianas adheridas a una superficie, que puede ser biótica o abiótica, embebidas en una matriz extracelular (Figura 9I) (Costerston et al., 1999). Esta forma de vida ha sido encontrada y estudiada en diversos géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, por mencionar algunos ejemplos (Dunne, 2002).

Los biofilms bacterianos son importantes desde el punto de vista de las actividades humanas; resulta claro que tienen un gran impacto en la medicina. Los biofilms se forman en implementos médicos como catéteres, respiradores, caderas artificiales y lentes de contacto (Dolan, 2002) y son resistentes a distintos tratamientos con agentes antibacterianos. En el caso de implantes, esto genera que en gran cantidad de casos termine siendo necesaria la remoción del mismo, aumentando los costos de los tratamientos así como el sufrimiento del paciente. Se ha estimado que un 65% de las infecciones nosocomiales están relacionadas con este modo de vida y se calcula que el gasto en combatir estas infecciones asciende a 1 billón de dólares anuales (Mah and O'Toole, 2001). Además constituyen un factor importante en la morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística (Lee et al., 2011). En pulmones de estos pacientes se han encontrado biofilms muy robustos y recalcitrantes, que presentan una estructura y versatilidad metabólica muy compleja (Platt et al., 2008). Otro aspecto de la vida humana que se ve negativamente afectado por los biofilms lo constituyen las redes de distribución de aguas. La biomasa microbiana asociada a las cañerías reduce la asepsia del agua corriente, aumenta la tasa de corrosión de los materiales e incrementa la

supervivencia de especies patógenas en las redes de distribución de agua (Lehtola et al., 2004).

Entre los efectos benéficos de los biofilms se pueden mencionar los relacionados a las actividades agrícolas tales como la promoción del crecimiento vegetal y la simbiosis y también son importantes para la biorremediación (Singh et al., 2006; Danhorn y Fuqua, 2007; Rodríguez Navarro et al., 2007; Rudrappa et al., 2008)

Además de estos efectos tanto negativos como positivos sobre actividades humanas, los biofilms son importantes para la supervivencia, adaptabilidad y dispersión bacteriana en ambientes naturales y muchas veces en condiciones hostiles para el crecimiento (Decho, 2000). Estas estructuras brindan un ambiente protegido para el desarrollo y se ha demostrado que en comparación con el estado planctónico este estado aumenta la resistencia a estrés oxidativo, a altas presiones osmóticas, a antibióticos y a pH extremos y también se ha reportado que protege contra protozoos depredadores de células bacterianas (Wai et al., 1998; Cochran et al., 2001, Albesa et al., 2004; Matz and Kjelleberg, 2005).

Un aspecto de gran importancia y que influye en la fisiología bacteriana en ese ambiente, es la heterogeneidad espacial, que tiene como consecuencia la formación de gradientes de distintos nutrientes, que influyen en el *set* de genes y proteínas que luego se expresan en las células pertenecientes al biofilm (Wimpenny et al., 2000; Rani et al., 2007).

El proceso de formación de biofilms es complejo e incluye factores tanto intrínsecos como ambientales. A continuación se describen en forma resumida los pasos y componentes fundamentales que participan en el proceso de formación de los biofilms.

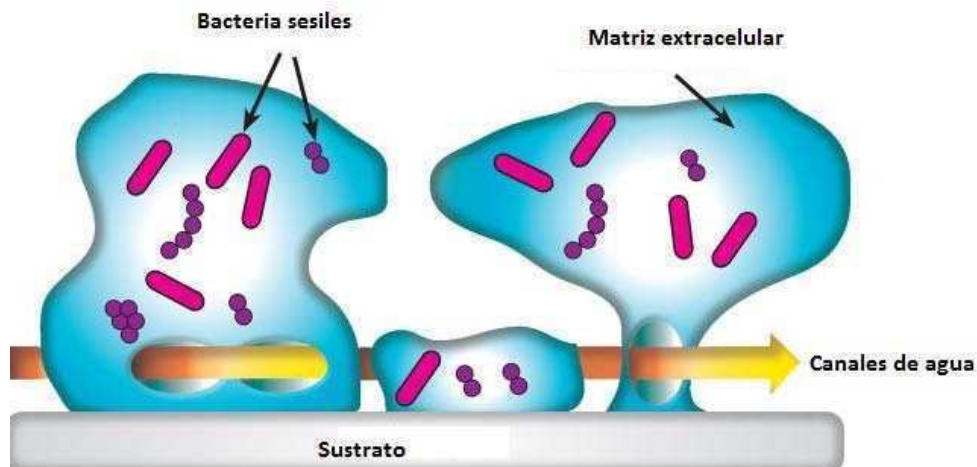


Figura 9I: Esquema de un biofilm maduro de *P. aeruginosa*, modificado de Nizet, 2009.

Formación de biofilms en el género *Pseudomonas*

El microorganismo más estudiado y que constituye uno de los modelos en la formación de biofilms es *Pseudomonas aeruginosa*, una especie patógena oportunista de gran relevancia médica. En esta especie la estructura y las características del biofilm dependen de la fuente de carbono que se emplea durante el cultivo. Si el medio de cultivo a utilizar se suplementa con glucosa entonces se forman estructuras complejas y heterogéneas en forma de hongos con presencia de canales de agua, mientras que si se emplea citrato se obtienen biofilms planos y muy dinámicos (Klausen et al., 2003). Debido al interés médico que posee esta especie los pasos involucrados en el desarrollo de las estructuras se han caracterizado y resultan de importancia para comprender los genes relevantes en este fenómeno: (1) *adhesión reversible*, (2) *adhesión irreversible*, (3) *formación de microcolonias*, (4) *maduración*, (5) *dispersión* (Figura 10I) (Klausen et al., 2003).

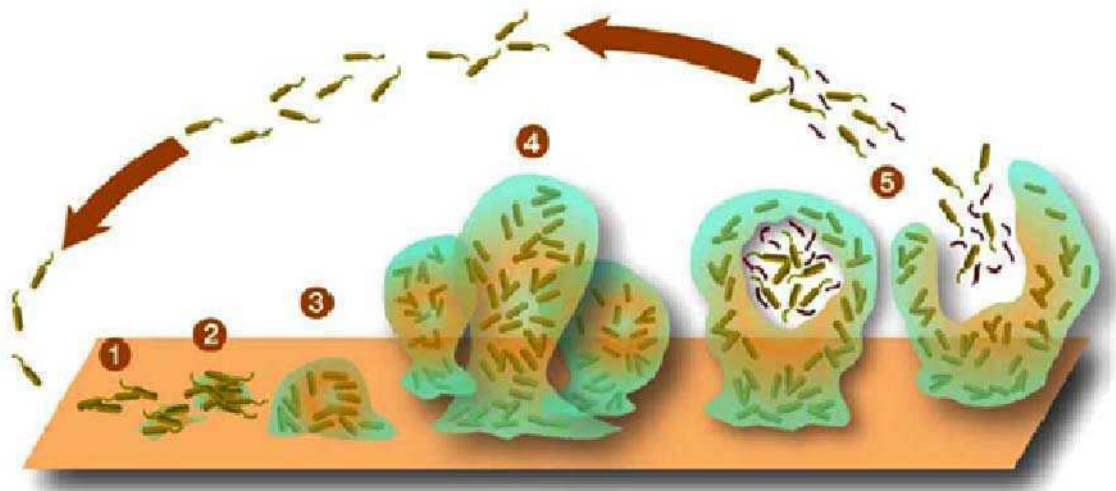


Figura 10I: Pasos en la formación y dispersión en un biofilms de *P.aeruginosa*. Esquema tomado de Klausen et al., 2003

Adhesión a la superficie

La adhesión al sustrato por parte de las células es un fenómeno complejo que involucra una gran cantidad de variables que incluyen desde la composición de las membranas bacterianas, la composición y naturaleza química de la superficie, factores

ambientales y la presencia de distintos productos génicos (Dunne, 2002). Sin embargo, es posible realizar una primera aproximación afirmando que la adhesión a superficies abióticas está dada por la interacción de fuerzas no específicas (ej. hidrofóbicas), mientras que la adhesión a tejidos o células vivas está dada generalmente por componentes moleculares específicos como adhesinas, lectinas o ligandos, lo cual es conocido como “*docking molecular*” (Dunne et al., 2002). En *P. aeruginosa* se han detectado una gran variedad de componentes involucrados en la adhesión a las superficies, flagelos, el pili de tipo IV fimbrias, y el polisacárido Psl (Vallet et al., 2001; Sauer et al., 2002; Chiang y Burrows, 2003; Ma et al., 2009). El gen *sadB* ha sido señalado como importante para la adhesión y dispersión de las superficies en *P. aeruginosa* (Caiazza y O’Toole, 2004). Se cree que luego de una adhesión que puede resultar reversible se da paso a una irreversible y al inicio de la producción de los exopolisacáridos (EPS) que luego conformarían la matriz extracelular (Davis et al., 1993).

Formación de microcolonias

Las microcolonias fueron denominadas por Monds y O’ Toole (2009) como un *cluster* pequeño de células (aproximadamente del orden de 100 células) que representan las etapas tempranas del desarrollo del biofilm.

Maduración del biofilm

La formación de microcolonias es seguida, al menos en ciertas condiciones, por la formación de macrocolonias. Estas pueden tener forma de hongo, como en el caso de *P. aeruginosa* en cultivos suplementados con glucosa, que pueden llegar a alturas de 100 μm o más. Las macrocolonias además están típicamente separadas por canales llenos de líquido. En esta etapa se observa una importante respuesta génica especialmente en reguladores y proteínas involucradas en el *quorum sensing* y en el metabolismo anaeróbico; esto último se debe a la generación de zonas con baja tensión de oxígeno (Kuchma y O’ Toole, 2000). Se cree que para la formación de estas estructuras de tipo hongo es necesaria la presencia de flagelos, así como de pili de tipo IV (Barken et al., 2008). El flagelo estaría involucrado en el ascenso de las células a la zona superior del hongo y el pili de tipo IV tendría relevancia en la unión de este al DNA extracelular (Barken et al., 2008). Por otra parte, se cree que un tipo de migración

sería importante en fases más tardías del desarrollo y que involucraría tanto los flagelos como el pili de tipo IV (Harmsen et al., 2010).

La matriz del biofilm también se desarrolla completamente durante la fase de maduración y comprende uno de los aspectos más importantes del rol protector de los biofilms y que por lo tanto se describirá luego en más detalle.

Dispersión

La pérdida de células desde el biofilm se da durante todo su desarrollo debido a causas relacionadas con la erosión y se ha considerado un proceso pasivo diferente a la dispersión activa que se da luego de la maduración del biofilm (Purevdorj-Gage et al., 2005). Esta etapa puede dispersarse por diversos motivos, entre los cuales se puede mencionar un aumento en la fuente de carbono (Sauer et al., 2004), la presencia de profagos que se activan, así como la generación de especies oxidativas o nitrosoactivas dentro del biofilm (Barrud et al., 2006). La dispersión de células del biofilm estaría relacionada con la colonización de nuevos nichos, los factores de *quorum sensing* y movilidad tendrían un rol preponderante (Sauer et al. 2002; Pársec y Greenberg, 2005). La tasa de dispersión estaría relacionada además con un aumento en la expresión de flagelos y una disminución en la movilidad de tipo *Twitching*.

En *P. aeruginosa* en la etapa inicial de la dispersión pueden observarse células no móviles en las paredes de las estructuras de tipo hongo que formarían la parte externa del mismo, mientras que células móviles estarían presentes en el interior del hongo. Esta subpoblación sería capaz de encontrar la salida desde el centro de la estructura, quedando entonces vacío. Este proceso depende de un tamaño de la macrocolonia que resulta crítico (Harmsen et al., 2010).

El óxido nítrico ha sido señalado como un compuesto de gran importancia en el desarrollo de los biofilms. Además del papel durante la generación de energía en la desnitrificación se ha mencionado como una molécula señal importante en diferentes procesos pero a la vez tóxica, lo que implica la necesidad de controlar su generación dentro de la célula (Yoon et al., 2007). El NO es un agente altamente oxidante, existen evidencias que indican daño a macromoléculas producido por altas concentraciones de este compuesto, como por ejemplo en el DNA y compromete además, el funcionamiento de proteínas al oxidar *clusters* de tipo Fe-S y actuar sobre grupos hemo (Soum and Drapier, 2003; Woodmansee and Imlay, 2003). Estos efectos se dan tanto en condiciones de biofilms así como en cultivos planctónicos.

En particular en el caso de biofilms el NO actúa gatillando la dispersión de los mismos. Se ha observado un aumento en la dispersión en mutantes de la enzima óxido nítrico reductasa así como una disminución en mutantes en la enzima nitrito reductasa en *P. aeruginosa*, poco se sabe de este factor en otras especies que no son capaces de llevar adelante la reducción del nitrito. El mecanismo de acción estaría relacionado con un aumento en la capacidad de movilidad de tipo *swimming* y *swarming* en presencia de NO (Barraud et al., 2006).

Matriz extracelular en biofilms

La matriz extracelular que forma parte de la estructura de los biofilms posee varias funciones de gran importancia en la protección frente a distintos factores ambientales que pueden resultar perjudiciales para las células. Si bien no es adecuado realizar generalizaciones, la matriz extracelular funcionaria como “secuestradora” de compuestos tóxicos como metales, toxinas, etc. Además, sería importante en la protección a la luz ultravioleta y a los pH extremos, como así también contra predadores; permitiendo además el intercambio de material génico y la comunicación célula-célula (Molin y Tolker-Nielsen, 2003, Anderson and O’Toole 2008, Ma et al., 2009, Yang et al., 2009). Existen evidencias en *P. aeruginosa* que la matriz extracelular es sintetizada en respuesta a señales ambientales “sensadas” por las proteínas LasS, RetS y GacS (Ventre et al., 2006).

Los polisacáridos, así como proteínas y DNA extracelulares son considerados como componentes claves en la formación de la matriz extracelular, además es posible encontrar células muertas como parte de estas estructuras (Stewart et al., 2001).

Los polisacáridos son el componente principal de esta matriz, pueden actuar en la captación de especies reactivas de oxígeno y otros compuestos tóxicos (Ryder et al., 2007). La naturaleza de los polisacáridos varía según la especie bacteriana, en *P. aeruginosa* durante el proceso de infección crónica en pulmones de pacientes con fibrosis quística, las células producen alginato, uno de los polisacáridos más estudiados (Davies et al., 1993). En *E.coli* y otras enterobacterias la celulosa constituye el polisacárido de la matriz (Branda et al., 2005). En especies de *Pseudomonas*, que no se encuentren en procesos infecciosos crónicos (biofilms no mucosos) se observan dos polisacáridos, PEL, rico en glucosa, y PLS, rico en manosa (Branda et al., 2005).

El *quorum sensing* (QS) también tiene un rol en la producción de la matriz extracelular. Los ramnolípidos, compuestos por ramnosa y una cadena lipídica, tienen la función de mantener la estructura de los canales de agua y son importantes para mantener la integridad de la matriz en *P.aeruginosa*. La expresión de los genes involucrados en su síntesis está directamente controlada por los reguladores de QS.

Heterogeneidad en el biofilm: papel del oxígeno

Debido a la alta complejidad estructural que presentan los biofilms son considerados ambientes heterogéneos, donde estas características y la presencia de la matriz determinan que la difusión de los distintos compuestos sea diferente según la zona, ocasionando la formación de gradientes (Stewart y Franklin, 2008). Se conoce que existen gradientes de nutrientes, oxígeno o de otros aceptores de electrones a través de las distintas zonas del biofilm, creando microambientes a los cuales las células responden (Spormann 2008, Stewart y Franklin, 2008). Como consecuencia de esto, los microorganismos presentan distintos patrones de expresión génica aun proviniendo de un crecimiento clonal (Fux et al., 2005).

Uno de los componentes más importantes para el metabolismo bacteriano es el oxígeno (Harmsen et al., 2010). Se han realizado estudios donde se ha medido con microelectrodos la tensión de oxígeno existente en biofilms formados en cámara continua, encontrándose desde 6 mg/l de oxígeno en la superficie hasta valores menores a 0,2 mg/l en el interior del biofilm. Debido a esto, las células dentro del biofilm, especialmente aquellas situadas en las capas más profundas, presentarían un metabolismo de tipo microaeróbico o anaeróbico en el cual la presencia de aceptores de electrones alternativos al oxígeno sería fundamental (Xu et al., 1998). Muy recientemente se ha relacionado directamente el oxígeno con el *Quorum sensing*, importante también en biofilms, a través de un pequeño RNA regulatorio cuya expresión estaría controlada directamente por Anr (Sonnleitner et al., 2011).

Efecto de las bajas temperaturas en la fisiología bacteriana: Papel de los biofilms

Los ambientes fríos constituyen hábitats desfavorables que limitan la supervivencia de las células bacterianas y la colonización de nuevos nichos debido a la influencia de las condiciones extremas sobre los parámetros físicos y bioquímicos celulares. La exposición al frío provoca cambios en la solubilidad de las moléculas, entre ellas el oxígeno, la velocidad de las reacciones enzimáticas, la fluidez de las

membranas celulares, la conformación y estabilidad de las proteínas y también afecta la expresión génica (D'Amico et al. 2006, Strocchi et al. 2006) de manera que, las especies que sobrevivan en estas condiciones deben poseer adaptaciones o estrategias para sobrellevar las condiciones desfavorables. Recientemente se ha descrito que las bajas temperaturas incrementan la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) disparando además la expresión de las enzimas antioxidantes claves (Chattopadhyay et al. 2011). Estas observaciones concuerdan con resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los cuales describimos el papel esencial del PHB para mantener el estado redox celular durante el crecimiento en frío y evitar el daño oxidativo en *P. extremaustralis* (Ayub et al., 2009). Los biofilms podrían ser entonces, una estrategia adoptada por distintas especies bacterianas para afrontar este tipo de ambientes.

8. *Pseudomonas extremaustralis*

El trabajo de esta Tesis está basado en el estudio de *P. extremaustralis*. Esta bacteria ha sido aislada, caracterizada y descrita como nueva especie (López et al., 2009) por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana -FCEyN UBA, donde se desarrolló esta Tesis. El aislamiento fue realizado a partir de una charca temporal del Continente Antártico. Sus características más importantes, que la hacen de interés para su estudio, son la alta producción de PHB, más del 80% de su peso seco (Ayub et al., 2004) y su alta resistencia al estrés tanto oxidativo, calor o frío (Ayub et al., 2004, 2009). Además presenta como particularidad la presencia de una isla genómica de adaptabilidad, probablemente adquirida por transferencia lateral, en la cual se encuentran los genes de síntesis de PHB y otros genes posiblemente relacionados con la adaptabilidad al frío (Ayub et al., 2007). La producción de PHB resultó una característica sumamente interesante debido a que las especies del género *Pseudomonas* producen normalmente PHA de cadena media y no de cadena corta, como el PHB. Los genes de síntesis de este polímero mostraron similitud con especies del género *Burkholderia* (Ayub et al., 2007). Es importante para el trabajo de esta Tesis destacar que la síntesis de PHB en *P. extremaustralis* se produce a partir de ácidos grasos, como el octanoato de sodio, pero no desde glucosa, esto se debe a que el gen *phaA* que codifica la enzima β -tiolasa presenta una mutación que provoca la pérdida de funcionalidad de la misma (Ayub et al., 2006).

Las características particulares de esta especie, como la producción de PHB y la alta resistencia al estrés, así como otras generalizables a otras especies de *Pseudomonas*

no patógenas hacen de *P. extremaustralis* una especie de gran interés para el estudio de procesos fisiológicos que pueden ser abordados desde distintos puntos de vista.

OBJETIVOS

En el laboratorio de Biotecnología ambiental y Ecología bacteriana (Dpto. de Química Biológica, FCEyN-UBA) se analizan diversos aspectos relacionados con el metabolismo de los PHA. En particular, gran parte del trabajo se ha orientado al estudio del papel de estos polímeros en la supervivencia y en la resistencia a factores de estrés. Estos trabajos demostraron que los PHA incrementan la supervivencia en ambientes naturales y la resistencia a estrés y otorgan habilidades competitivas frente a las bacterias autóctonas. La síntesis de PHA consume una gran cantidad de equivalentes de reducción tales como NADH o NADPH, por lo que el polímero actúa, además de como un reservorio de carbono, como reservorio de electrones. Estas funciones también le otorgan importancia en el balance redox celular. La síntesis de PHA puede estar influenciada por reguladores específicos, pero también en forma directa o indirecta, por reguladores del estado redox celular. Existen pocos estudios que analicen la producción de PHA en condiciones de baja tensión de oxígeno teniendo en cuenta las redes regulatorias globales. El estudio del regulador global Anr puede resultar de interés tanto con fines básicos como aplicados. En particular, el desarrollo de procesos de producción industrial en condiciones de microaerobiosis podría contribuir a la disminución de los costos de estos bioplásticos por reducción de los gastos derivados de la agitación y la aireación. Además, en la naturaleza existe una gran cantidad de ambientes microaeróbicos, por lo cual es importante la comprensión de la fisiología bacteriana en estos ambientes y la influencia de los reguladores globales que permiten el desarrollo en tales condiciones.

Por último, la formación de biofilms, es también de importancia debido al impacto que tienen estas estructuras en diversas actividades humanas y en la supervivencia en general de las especies bacterianas en ambientes desfavorables.

Anr es uno de los factores de transcripción que están bajo activa investigación debido a la importancia que tiene sobre la fisiología de las especies del género *Pseudomonas*. Sin embargo, la demostración experimental de la regulación sobre muchos procesos celulares aún no ha sido completada. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es el estudio de la influencia del Regulador Global Anaeróbico, Anr, en

Pseudomonas extremaustralis, en distintos aspectos de la fisiología celular y en particular en la síntesis de PHB. Además, es de interés el estudio de la formación de biofilms en esta especie en distintas condiciones y el papel de Anr en este proceso.

Este objetivo fue desglosado en los siguientes objetivos particulares:

- i) Estudiar del metabolismo microaeróbico en *P. extremaustralis*: utilización del nitrato y Fermentación de L-arginina.
- ii) Análizar la producción de PHB en *P. extremaustralis* en relación al oxígeno y al regulador global Anr.
- iii) Investigar la influencia de Anr sobre el estado redox celular y otros parámetros asociados.
- iv) Describir la formación de biofilms en *P. extremaustralis*: análisis de sus características e impacto de la mutación en el regulador Anr.
- v) Analizar el papel de PHB en la formación de biofilms durante el crecimiento en bajas temperaturas.

Materiales y Métodos**1. Cepas y plásmidos empleados**

Durante el trabajo se utilizó *Pseudomonas extremaustralis* DSM 17835 (López et al., 2009). Las cepas bacterianas así como los plásmidos utilizados para estudiar los diferentes fenotipos regulados por *anr* y las cepas empleadas para el estudio de biofilms en frío se detallan a continuación en la Tabla 1MyM. Para los antibióticos se emplearon las siguientes abreviaturas: Amp (Ampicilina), Km (Kanamicina), Tet (Tetraciclina), Sm (Estreptomycinina).

Cepas	Características relevantes	Cita u origen
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>ndA1 hsdR17 supE44 thi- λ recA1</i>	Meselson y Yuan, 1968
S17-1 λ pir	<i>relA1 ΔlacU169 (ϕ80dlacZΔM15)</i>	Simon et al., 1983
MG1655	<i>LaM- rhp-1</i>	Jensen, 1993
MG1655 <i>fnr- 267</i>	LAM- <i>fnr- 267</i> (del) <i>rhp-1</i>	Jensen, 1993
MG1655 <i>fnr- 267</i>	<i>LaM- fnr- 267</i> (del) <i>rhp-1 Sm^R</i>	Soupeine et al. 2003
JM109 Anr*	Salvaje. El gen <i>anr</i> * activo en aerobiosis se encuentra en el plásmido pQE32 bajo promotor inducible por IPTG y con el agregado de un <i>Histag</i> . Amp ^R	Tribelli, 2006 Ibarra, 2011
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>anr- Km^R</i>	
<i>P.extremaustralis anr</i>	Desnitrificadora.	Esta Tesis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

PAO-1 <i>P.extremaustralis phaC</i>	Mutante <i>phaC</i> , incapaz de acumular PHB. Km ^R	Holloway et al., 1987 Ayub et al., 2009
<i>P.extremaustralis phaC</i> complementada	Posee el plasmido pBBR1MCS-1 con el gen <i>phaC</i> clonado, capaz de acumular PHB. Cm ^R	Ayub et al., 2009
<i>P.extremaustralis-GFP</i>	Posee el plasmido pBBR1MCS-2 con la proteína GFP. Km ^R	Esta Tesis
<i>P.extremaustralis anr-GFP</i>	Posee el plasmido pHC60 con la proteína GFP. TetR Km ^R	Esta Tesis

Plásmidos		
pGEM-T <i>easy</i>	Empleado para clonados directos desde PCR.	Promega
pBluescript II KS-	Utilizado para subclonados. Amp ^R Contiene un <i>cassette</i> de resistencia a	Fermentas
pUC K4	Km para la construcción de mutantes.	Pharmacia, California.
pGAN	Plásmido pGEM-T con <i>anr</i> completo clonado. Amp ^R	Esta tesis
pGDAN	Plásmido pGEM-T con <i>anr</i> incompleto clonado y <i>cassette</i> de resistencia a Km inserto. Amp ^R Km ^R	Esta tesis
pHC60	Plásmido con la proteína GFP clonada río abajo del promotor Plac (constitutivo).Tet ^R	Cheng et al., 1998

pBBRMCS-2GFP	Plásmido con la proteína GFP clonada río abajo del promotor Plac (constitutivo). Km ^R
--------------	--

Básicamente los cultivos fueron realizados empleando los siguientes medios:

NEO: medio mínimo con el agregado de una pequeña proporción de extracto de levadura, octanoato de sodio y bajo nitrógeno que permite la acumulación de PHB en esta cepa (Huisman et al., 1992).

NEON: NEO suplementado con nitrato de potasio.

NEONC: NEON suplementado con casaminoácidos, particularmente necesario para el crecimiento de la cepa *P. extremaustralis anr*.

La composición completa de los medios de cultivo empleados a lo largo de este trabajo se encuentran descriptos al final de esta sección en un anexo.

2. Técnicas de Biología molecular

Reacción Cadena de la Polimerasa (PCR)

La composición de la mezcla de reacción utilizada se detalla a continuación. Los oligonucleótidos y programas empleados se muestran en las Tablas 2MyM y 3MyM, respectivamente.

Reactivos por tubo	(50µl volumen final)
Buffer de reacción 10X	5µl
Magnesio 25 mM	Dependiente de la reacción
dNTPs (20mM)	5µl
Taq polimerasa (Promega, 2,5 unidades)	0,5µl
Muestra de DNA	5 µl DNA genómico 10 µl de una colonia resuspendida en agua destilada “ colony PCR”

Oligo upper (3μM)	10μl para oligonucleótidos degenerados 5 μl para oligonucleótidos específicos
Oligo lower (3μM)	10μl oligonucleótidos degenerados 5 μl para oligonucleótidos específicos
Agua	Completa volumen

Oligonucleótidos empleados

Tabla 2 MyM: oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto a obtener / Posición del oligonucleótido a partir del ATG del gen blanco
Anr2up	CGATTCAAATGTCCGAGCCA	<i>anr</i> / -8 del gen <i>anr</i>
Anrapt low	AAGCCGCTGATCCTGTTCCGCA	<i>anr</i> / 61 luego del codón stop de <i>anr</i>
AnrRup	TCTTAAAGGATCCAATCAACGAAGA AGACCG CCGACGAGCG	Δanr /+249 del gen <i>anr</i>
AnrRlow	TTGATTGGATCCTTTAAGACATCGCT CAGGCTGAATGT CTT	Δanr /+472 del gen <i>anr</i>
DR1up	TGCAATTCAGCCTGACGTTCGAAC	Verificación de doble recombinación -436 del gen <i>anr</i>
DR1low	ATTACGCTGACTTGACGGGACGG	Verificación de doble recombinación +250 del gen Km.
DR2up	TCGAGCAAGACGTTTCCCGTTG	Verificación de doble recombinación/ +1115 del gen Km.
DR2low	TTGGCCGCCGCGATCAAAGTAC	Verificación de doble recombinación/ 462 luego del stop de <i>anr</i> .
FA1up	CAGCCAGAAAGTGAGGGAGC	Verificación de doble recombinación/ +67 del gen Km.
FA2low	CTATGGAAGTGCCTCGGTGA	Verificación de doble recombinación/ +430 del gen Km.
phaC forward RT	CTTCGTCCTCGGATCTTCTG	<i>phaC</i> /+1437 del gen <i>phaC</i>
phaC reverse RT	ATCGACCCACCAACTCCTG	<i>phaC</i> /+1568 del gen <i>phaC</i>
phaB forward RT	ATCCTCGATCAATGGACAGC	<i>phaB</i> / +429 del gen <i>phaB</i>
phaB reverse RT	ATGCCTTCAAGGATGTCTGG	<i>phaB</i> /+620 del gen <i>phaB</i>
phaR forward RT	ACGAACACCCGAATAACTGC	<i>phaR</i> / +624 del gen <i>phaR</i>

<i>phaR</i> reverse RT	AGAAATCGAGCGTTTGAGGA	<i>phaR</i> /+758 del gen <i>phaR</i>
16S forward RT	CAGCTCGTGTCTGTGAGATGT	rRNA16S /+1056 rRNA16S
rRNA 16S reverse	AAGGGCCATGATGACTTGAC	rRNA16S /+1184 del gen rRNA16S

Programas de PCR utilizados:

Tabla 3 MyM: Detalle de los programas utilizado para las distintas amplificaciones por PCR

Producto	Desnaturalización (94°C)	Annealing	Extensión (72°C)	Primers empleados
<i>anr</i>	45 seg	58°C/ 30 seg	1 min	Anr2up/Anr-aptlow
Frag 1	30 seg	55°C/30seg	30 seg	Anr2up/AnrRlow
Frag 2	45 seg	58°C/30seg	30 seg	AnrRup/Anr aptlow
Δanr	45 seg	54°C/30seg	1 min	Anr2up/Anr-aptlow
Detección de inserción <i>anr</i> en el cromosoma	45 seg	50°C/30seg	2 min	DR1up/FA2low/DR1low DR2up/FA1up/DR2low

Preparación de DNA plasmídico

En el caso de preparación rutinaria de plásmidos o para la verificación del mismo con enzimas de restricción se utilizó el siguiente protocolo (la composición de los buffers mencionados se muestra en la Tabla 4MyM):

- Agregar 200 µl de B1
- Agregar 200 µl de B2. Mezclar por volcado. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Agregar 200 µl de B3
- Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm
- Tomar el sobrenadante y agregarle 900ul de etanol absoluto.
- Centrifugar 20 minutos a 13.000 rpm.
- Retirar el sobrenadante. Dejar secar 30 minutos a 37°C.
- Resuspender en 50 µl de agua destilada.

En aquellas situaciones que lo hayan requerido se extrajo el DNA plasmidico con un kit comercial (Bioamerica).

Tabla 4 MyM: Buffers empleados para la extracción de DNA plasmidico

B1 (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA)				
Volumen total (ml)	TrisHCl 1M pH= 8 (µl)	EDTA 0,5 M (µl)	H2O (µl)	RNAsa 10mg/ml (µl)
1	50	20	930	10
Agregar RNAsa en el momento de usar				
Verificar que la RNAsa esté libre de DNAsas (tratamiento de 100°C 15 min)				
B2 (200 mM NaOH, 1% SDS)				
Volumen total (ml)	1ro. H2O (µl)	2do. SDS 10% (µl)	3ro. NaOH (µl)	
1	400	100	500	
Preparar la solución B2 en el orden indicado				
B3 Acetato de sodio o de potasio 3M pH 5.5				

Digestión con enzimas de restricción

En el caso de ser necesaria la digestión con enzimas de restricción el siguiente protocolo:

Volumen (50 µl finales)

Buffer 10X	5,0 µl
Enzima de restricción:	0,5 µl
DNA	20 µl
H ₂ O destilada	24 µl

Purificación de fragmentos

Para la purificación de fragmentos a ser clonados o secuenciados se utilizó un kit comercial (Qiagen). En ciertos casos se efectuó la purificación del fragmento a partir de un gel de agarosa (0.8%).

Ligación en el sistema pGEMT-easy®

El sistema pGEMT-easy (Promega®) se empleó para el clonado directo de fragmentos de PCR, realizado según las instrucciones del fabricante:

Buffer 2X	5µl
Plásmido pGMT-easy	1 µl
Ligasa T4	1µl
Fragmento de PCR	3 µl

Se incubó 1 h a T ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Reacción de Ligación

Para el clonado de fragmentos que no provenían de PCR se empleó la ligasa T4 (Promega), siguiendo el siguiente protocolo:

Buffer 10X	2µl
Ligasa T4	1µl
Plásmido	50 ng
Inserto	volumen deseado
H ₂ O destilada	a completar 20 µl

Se incubó 1 h a 16°C u *overnight* (o.n.) a 4°C.

El volumen del inserto se calcula según la fórmula:

$$\text{Masa inserto} = 50\text{ng (masa vector)} * \text{base inserto} / \text{bases vector}$$

Obtención de *E.coli* competentes

Para llevar adelante la transformación de *E. coli* primeramente se obtuvieron células competentes usando el siguiente protocolo cuyos pasos fueron:

- Incubar 2 ml de cultivo o.n. a 37 °C en PSIB o LBMg.
- Tomar de ese cultivo 0,5 ml en 50 ml en PSIB o LBMg incubando a 37 °C 2 o 3 horas hasta DO=0,6.
- Incubar 5 minutos 4°C.
- Centrifugar 10 minutos 4°C
- Resuspender en 16 ml de TFBII 4°C.
- Incubar 5 minutos 4°C.
- Centrifugar 10 minutos 4°C.
- Resuspender en 2 ml de TFBII 4°C.

- Incubar 10 minutos 4°C.
- Alicuotar 100 µl de células en tubos Eppendorf de 1,5 ml y guardar a -80°C.

La composición del medio así como los buffers empleados se encuentra detallada en el anexo al final de esta sección.

Transformación de *E.coli*

Para la transformación de *E.coli* DH5- α se empleó el protocolo descrito a continuación:

- Tomar un tubo con 100 µl de *E. coli* competentes en hielo agregando el DNA.
- Incubar en hielo 30 minutos.
- Incubar a 42°C 1 minuto.
- Pasar rápidamente a hielo.
- Incubar en hielo 5 minutos.
- Agregar 0,5 ml de solución LBGM 1 hora en baño a 37°C.

Luego se siembra en placa en el medio adecuado según el caso.

Solución LBGM: 5ml de LB + 36µl Glucosa 50% + 102 µl de MgSO₄ 1M.

3. Clonado y análisis del gen *anr* de *P.extremaustralis*

La secuencia completa del gen *anr* de *P.extremaustralis* fue obtenida por PCR utilizando los *primers* Anr2up y Anr-aptlow. Estos fueron diseñados a partir del alineamiento de la secuencia aminoacídica codificada por del gen *anr* en distintas especies de *Pseudomonas* disponibles en base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El alineamiento de la secuencia aminoacídica se realizó con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Se eligieron regiones conservadas y en el caso del *primer* reverso se eligió una región del gen que se encuentra río abajo de *anr*, denominado *apt* (adenosin fosforibosiltransferasa). El fragmento obtenido de 1100 pb, que contenía el gen *anr* completo (738pb) y parte de *apt*, fue clonado en el plásmido pGEM-T-easy (Promega Corporation) denominado pGAN. Este fragmento de amplificación fue secuenciado (Macrogen Inc.,Korea) y la secuencia resultante fue analizada utilizando el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) depositándola en EMBL Nucleotide Sequence Database bajo el número de acceso AM901400.

Complementación de *E. coli* Δfnr

Para estudiar la funcionalidad del gen *anr* obtenido, el plásmido pGAN fue introducido por transformación en células competentes de *E. coli* MG1655 Δfnr . Para la detección de la complementación se empleó uno de los fenotipos regulados positivamente por *fnr*, gas generado por a partir del cultivo en medio LB-glucosa (2%) en tubos cerrados sin agitación y en presencia de una campana de Durham, luego de dos días de incubación. Además, se estudió la capacidad de reducir el NO_3^- a NO_2^- , observando el color y el tamaño de las colonias de *E. coli* MG1655 Δfnr y de la cepa complementada con pGAN en placas de agar McConkey-nitrato-lactosa. Las cepas se cultivaron durante 48h en jarra anaeróbica utilizando Anaerocult A (Merck) para generar atmósfera anaeróbica. Para estos experimentos también se empleó *E. coli* MG1655 como control positivo.

4. Construcción de *P.extremaustralis anr*

La mutación en el gen *anr* se realizó utilizando la técnica de delección por PCR (*PCR-crossover deletion*) que consta de dos pasos (Link et al., 1997). Esta técnica consiste en la utilización de *primers* largos y complementarios entre sí, en una zona del gen, que se emplean para generar dos fragmentos que luego se empalmarán generando una delección interna en el gen a mutar. En un primer paso se amplificó de manera separada un fragmento amino Terminal (Frag 1) utilizando los *primers* Anr2up y AnrRlow y por otro lado los *primers* AnrRlow y Anr-lowapt para obtener un fragmento carboxi-terminal (Frag 2) (Figura 1 MyM). Para obtener estos fragmentos se llevaron a cabo reacciones de PCR siguiendo el programa referido en la Tabla 3 MyM. Estos fragmentos se purificaron y se emplearon como templado para una segunda PCR en la que se utilizaron como *primers* los denominados Anr2up y Anrlowapt que son externos. En este paso los fragmentos pequeños se superponen gracias a la región complementaria de los *primers* generando entonces un fragmento único como producto. Se obtuvo un fragmento de 850 pb que posee una delección interna de 250pb, denominado Δanr (Figura 2 MyM).

El fragmento fue clonado empleando el sistema pGEMT-Easy (Promega). Una vez obtenidos los clones con el fragmento deseado, se cortó con *BamHI* (ver sección de clonado). Además se obtuvo un *cassette* de Kanamicina (Km) a partir del plásmido pUC

K4 a partir de una restricción con *Bam*HI. Se realizó una reacción de ligación (ver sección clonado) y el plásmido resultante se denominó pGDAN, conteniendo el gen *anr* incompleto, interrumpido por un *cassette* de Km en el medio del mismo (Figura 2 MyM). Esta construcción fue introducida por transformación en células competentes de *P. extremaustralis*, preparadas según el protocolo de Lee et al., (2005). Los clones transformantes fueron seleccionados en LB agar conteniendo 50 µg/ml de Km. La pérdida del plásmido en las colonias seleccionadas se verificó mediante repiques en NEO-Amp (200ug/ml). El doble evento de recombinación fue confirmado por secuenciación empleando los *primers* detallados en la Tabla 2 y 3 de MyM. Para detectar el fenotipo *anr* mutante de las colonias seleccionadas, se realizaron cultivos en medio líquido en microaerobiosis (tubos sin agitación) y se analizó la producción de NO₂⁻.

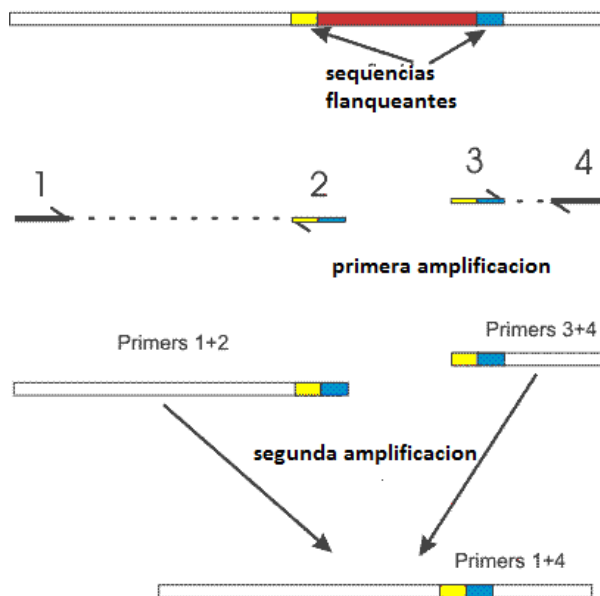


Figura 1 MyM: esquema del protocolo de mutación por delección por PCR. El segmento marcado en color rojo es aquel que será delecionado.

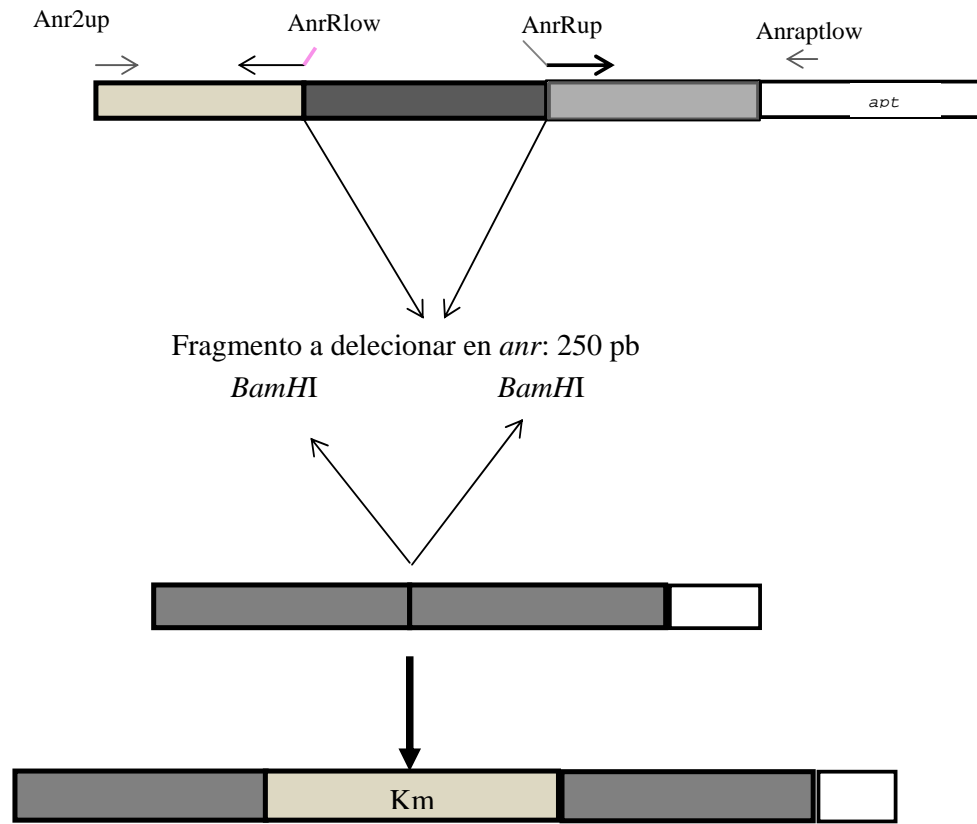


Figura 2 MyM: Esquema de la deleción en el gen *anr* mutante. La construcción final del gen *anr* mutante posee una deleción interna de 250 pb (de un total de 734 pb) y una *cassette* de resistencia a Km agregado a través de sitios *Bam*HI.

5. Condiciones de cultivo

Parte de los experimentos fueron realizados en condiciones microaeróbicas fueron empleando botellas de 100 ml herméticamente cerradas con 50 ml de medio (microaerobiosis moderada) o 100 ml de medio (microaerobiosis severa) con agitación suave (70 rpm). Para establecer condiciones aeróbicas se emplearon Erlenmeyers con un 1/10 del volumen total de medio de cultivo y agitación a 250 rpm.

En otros experimentos los cultivos fueron llevados a cabo bajo condiciones de aireación estrictamente controladas empleando un biorreactor. A menos que se indique lo contrario, todos los cultivos fueron llevados adelante a 28-30°C.

Cultivos en Biorreactor

Los cultivos en biorreactor se realizaron en el modo “Batch”, utilizando un biorreactor de 3,7 L (stirred tank reactor, Bioengineering, Switzerland). Este biorreactor está equipado con una pieza de agitación compuesta por 6 paletas planas. Además posee

sensores de temperatura y O₂, este último se monitorea mediante un electrodo (Ag/AgCl) (Metler, Toledo). Todos los parámetros son regulados automáticamente por un controlador “proporcional-integral-diferencial” (PID), que permite controlar las variables en forma automática. En particular, es de vital importancia la posibilidad de “acoplar” la tensión de O₂ que el operador desea con la agitación del cultivo, en forma automática. Debido a la importancia que tuvo la tensión de oxígeno durante estos experimentos, es importante destacar que en la determinación del 100% de oxigenación la corriente detectada por el sensor fue de 10-11 mA luego de burbujear enérgicamente con aire comprimido y el 0% de oxigenación fue fijado en 4 mA (el valor mínimo posible para el equipo) luego del burbujeo con N₂. La generación y mantenimiento de las condiciones de oxigenación correspondiente se obtuvieron empleando los parámetros y herramientas detallados en la Tabla 5 MyM.

El volumen de trabajo fue en todos los casos de 1,5 L empleando el medio NEON y NEONC. Los cultivos se mantuvieron durante 24 h a 28°C. Para prevenir la formación de espuma se agregó cuando fue necesario el antiespumante Antifoam 289 (Sigma-Aldrich).

Tabla 5 MyM: Parámetros relevantes para el mantenimiento de condiciones de aireación en biorreactor.

Condición	Flujo de aire (L/min)		“sparger” empleado	Tamaño de Burbujas	Disolución de O ₂	% de O ₂	Agitación (rpm)	Gas empleado
	Inicial	Final						
Aeróbica	0,2	1,8	<i>Micro-Sparger</i>	Muy pequeñas	Buena	95-100	100-700	Aire comprimido (21% O ₂)
Microaeróbica	0,06	0,9	<i>Sparger</i>	Única Burbuja grande	Pobre	15-20	100-700	Aire comprimido (21% O ₂)
Anaeróbica	0	0	<i>Micro-sparger</i> saturación inicial con N ₂	Muy pequeñas	-	0	350	Nitrógeno (N ₂)

6. Determinaciones analíticas

Desnitrificación y utilización de arginina

Los experimentos se realizaron utilizando cultivos microaeróbicos en botellas. Para el estudio de la utilización de nitrato se agregó 0,08% de KNO_3 y para los estudios de fermentación de L-arginina se emplearon concentraciones crecientes de este compuesto hasta 50mM. Los cultivos se incubaron a 28°C con una agitación suave de 70 rpm para evitar la formación de agregados celulares. El oxígeno presente inicialmente es consumido durante el crecimiento. El crecimiento en arginina se realizó en microaerobiosis estricta durante 72 h. Se realizó recuento en placa de células viables en agar nutritivo.

Determinación de nitritos

La producción de nitritos se realizó en los sobrenadantes de los cultivos según el protocolo descrito por Gerhardt et al (1981). Brevemente, se construyó una curva de calibración empleando diluciones de una solución de nitrito de potasio (100 μM). 0,1 ml de muestra diluida cien o mil veces, según corresponda al rango de linealidad. Luego se añadió 1 ml de Sulfanilamida (1% en HCl 10%) más 1 ml de α -Naftil-etilendiamina (0,02 % p/v) completando hasta un volumen de 3,5 ml con agua deionizada. Se dejó reposar 15 minutos para permitir la estabilización del color. Luego se determinó la absorbancia a 540 nm por espectrofotometría.

Determinación de la actividad enzimática arginina deiminasa (ADI)

La actividad de la enzima arginina deiminasa (ADI) fue determinada en los cultivos descritos anteriormente. Las células se cosecharon por centrifugación a distintos tiempos de incubación. Los extractos celulares se obtuvieron por sonicación (Ultrasonic Homogenator 4710, Cole Parma) durante 10 segundos a un 40% de potencia 10 veces empleando buffer fosfato pH=7,5. Luego se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La actividad de la enzima ADI se midió en el sobrenadante a través de la detección de citrulina (producto de esta enzima). Para llevar adelante la reacción enzimática en un volumen final de 2 ml se agregan 200 μl de buffer citrato pH=5,5, 10 μmoles de MnCl_2 , 10 μmoles de arginina y 0,1ml del extracto proteico (Mercenier et al., 1980). Se incubaron durante 15 minutos a 37°C y se detuvo la reacción agregando 2 ml de HCl 1N. La citrulina producida por la enzima ADI se determinó empleando la técnica colorimétrica descrita por Archibal et al., (1953).

Brevemente, se centrifugó la reacción anterior quedándose con el sobrenadante, se agregó Diacetilmonoxima (3%, Merck), 1 volumen de ácido sulfúrico (98%) y 3 volúmenes de ácido fosfórico (85%), hirviendo la mezcla durante 10 minutos con los tubos protegidos de la luz, se dejó enfriar 10 minutos y se leyó la absorbancia a 460nm. La curva estándar se realizó con citrulina (Sigma) y los resultados se expresaron en μmol de citrulina/mg proteína. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford.

Determinación de PHB

Como método cualitativo de determinación de PHB se empleó la tinción de Azul de Nilo descrita por Ostle y Holt (1982). Brevemente, se tomó una muestra del cultivo y se extendió sobre un portaobjetos. Una vez seca, se colocó en una solución acuosa de Azul de Nilo al 0,1% previamente calentada ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 10 minutos. Se lavó el preparado con ácido acético al 8%. Se observó luego al microscopio óptico.

Para determinar cuantitativamente el porcentaje de PHB los cultivos fueron liofilizados durante toda la noche. Luego se pesaron aproximadamente 10 mg y fueron derivatizados empleando 1 ml de metanol-sulfúrico (15%) y 1 ml cloroformo, mediante el calentamiento en baño de glicerina a 100°C durante 140 minutos. Posteriormente, se agregaron 0,5 ml de agua destilada y se tomó la fase orgánica transfiriéndola a un nuevo recipiente (Brauggner et al., 1978). Las muestras fueron analizadas por cromatografía gaseosa en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Los resultados se expresaron como % de PHB (gramos de PHB por cada 100 gramos de biomasa luego de ser liofilizada).

Determinación del estado redox celular

Determinación de cociente redox

Los cocientes NADH/NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotido reducido y oxidado respectivamente) y $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (nicotinamina adenina fosfato dinucleotido, reducido y oxidado respectivamente) fueron cuantificados en los pellets celulares de 1 ml provenientes de los cultivos controlados en biorreactor en condiciones microaeróbicas y aeróbicas. Las muestras de los cultivos analizados fueron transferidas a tubos de plástico pre-enfriados y la actividad metabólica fue interrumpida al sumergirlos en N_2 líquido y se guardaron a -75°C por no más de 24h hasta la determinación enzimática. Las muestras fueron tratadas con 300 μl de 0,2 M HCl (para la extracción de NAD(P)H) o 0,2 M NaOH (para la extracción de NAD(P)^+).

La extracción ácida/alcalina fue realizada a 50°C por 10 min, rápidamente fueron colocadas rápidamente en hielo (0°C). Las suspensiones fueron luego neutralizadas agregando pequeñas gotas de 1 M HCl o NaOH y los restos (*debris*) celulares fueron removidos centrifugando a 12.000 rpm por 5 min. Luego los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos e inmediatamente empleados para medir el uso de cofactores. La determinación de nucleótidos se realizó según el protocolo descrito por Bernosky y Swan, usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio como aceptor final de electrones, con las modificaciones descritas por Nickel et al. (2006). En todos los casos se realizó por triplicado en dos cultivos independientes y se normalizó el contenido de dinucleótidos por el peso seco obtenido de un ml de cultivo.

Determinación de la tasa de consumo de oxígeno

Se utilizaron cultivos aeróbicos y microaeróbicos de 24 horas, los cuales fueron centrifugados a 8000 rpm durante 5 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió en solución Ringer. Para la determinación del consumo de oxígeno se empleó un electrodo polagrafático tipo Clark (Biological O₂ Monitor, Model 53, Yellow Springs Instruments Inc.). Se preparó una mezcla de solución Ringer la cual se equilibró en una cámara abierta durante 3 minutos con agitación magnética a 30°C. Luego de esto se tomó una alícuota de las células resuspendidas de manera de que la solución final posea una DO_{600nm} de 0,5 aproximadamente. Luego, se agregó glucosa al 0,2% final, y cerrando rápidamente la cámara, se determinó la caída de la saturación de oxígeno de la mezcla en el tiempo. Al final de la medición, se determinó la DO_{600nm} y una alícuota fue conservada para la posterior determinación de proteínas según el método de Lowry.

Estudios de la resistencia al estrés oxidativo

Sensibilidad al peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en medio sólido

Para determinar la resistencia al estrés oxidativo en *P. extremaustralis* y la cepa *anr*, tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas, se empleó un ensayo de sensibilidad al agua oxigenada. Las bacterias fueron cultivadas durante 24 horas en condiciones aeróbicas o microaeróbicas, luego de lo cual se ajustó la DO de los cultivos aproximadamente a 0,5, y se sembró en placas de medio LB. Estas placas se realizaron con sumo cuidado con 20 ml de medio de manera que siempre presenten el mismo

grosor. Posteriormente se dejaron secar durante 15 minutos y se colocaron 3 filtros estériles (6 mm de diámetro) dejándolos secar nuevamente durante 15 minutos. Luego se agregaron 10 μl de H_2O_2 30% (Sigma). Las placas se incubaron durante toda la noche y se determinó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento.

Ensayos de resistencia al estrés oxidativo

Se realizaron utilizando los siguientes agentes: H_2O_2 , paraquat, menadiona y ácido nialidixico. Se empleó medio NEONC en placas de 96 pocillos (Nunc Brand) con agitación de 150 rpm durante 24 horas. El ensayo fue llevado adelante con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ajustada a 0,05 en cada pocillo y un volumen de 175 μl . Se realizaron diluciones seriadas al medio del agente, por duplicado, como se grafica en la Figura 3 MyM, y se tomaron mediciones de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a lo largo del tiempo. Con los datos obtenidos se calculó la velocidad de crecimiento (μ) en presencia de distintas concentraciones del agente. Se realizaron tres experimentos independientes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Menadiona (Concentración inicial 2mM)	A			Diluciones al medio del agente								
	B	→										
Paraquat (Concentración inicial 200 μM)	C											
	D											
A. Nadilixico (Concentración inicial 2mM)	E											
	F											
Control (sin agente agregado)	G											
	H											

Figura 3 MyM: Esquema de cultivo en presencia de distintos agentes generadores de estrés oxidativo. En el caso de H_2O_2 (3,5 mM como concentración inicial) se empleó una placa similar.

Determinación de ROS por citometría de flujo

Se realizaron cultivos de la cepa salvaje y mutante en condiciones aeróbicas y microaeróbicas en medio NEONC durante 23 horas. La $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de una serie de los cultivos, en ambas condiciones aireación, fue ajustada a 0,5, empleando el mismo medio. Posteriormente, se agregaron 3mM de H_2O_2 y se incubaron en las mismas condiciones durante 1 hora. Todos los cultivos fueron centrifugados a baja velocidad, los pellets fueron luego resuspendidos en solución fisiológica ajustando a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$

de 0,2. Una alícuota de 100 μ l de esta suspensión fue mezclada con 50 μ l de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) obteniéndose una concentración final de 50 μ M. La mezcla fue incubada a 30°C durante 1 hora y centrifugada nuevamente a baja velocidad de manera de retirar la sonda. El *pellet* se resuspendió en 500 μ l de solución fisiológica. La citometría de flujo se realizó empleando el equipo FACS AriaII BD cell sorter (BD, Bioscience) utilizando un filtro FIT-C (Blue Diodo 488nm).

Para distinguir entre la población celular y “el ruido” se utilizó por única vez la cepa *P.extremaustralis*-GFP y el filtro FIT-C, determinando que parámetros se emplearían en el citómetro para detectar solo la población bacteriana, utilizándose siempre los mismos para los experimentos subsiguientes. Los resultados fueron analizados con el programa FCS Express 4 Flow Cytometry (Novo software).

Determinación de otros parámetros celulares

Estudio de proteínas extracelulares en cultivos controlados en biorreactor

Las proteínas extracelulares fueron medidas utilizando el método de Bradford a partir de los sobrenadantes de cultivos en biorreactor que fueron conservados a -80°C hasta su utilización. Brevemente, se realizó una curva de calibración empleando distintas diluciones de BSA (10 mg/ml). Se tomaron distintas alícuotas de los sobrenadantes de los cultivos a analizar y se realizó un blanco con el medio de cultivo sin bacterias. Se agregó en todas las muestras 1ml de reactivo de Bradford, dejándose reposar por 5 minutos. La absorbancia a 595 nm se determinó empleando un espectrofotómetro.

La actividad proteasa se determinó colocando 5 μ l de cada sobrenadante sobre una placa agar-leche, incubándolas a 30°C durante toda la noche, luego se observó la presencia o ausencia de halos de degradación. La actividad amilasa se estudió en placas agar-almidón, de manera similar a lo descrito para las proteasas, pero el revelado se realizó agregando lugol luego de lo cual la presencia de zonas incoloras muestra la actividad enzimática.

Cuantificación de Exopolisacáridos totales

La cantidad de exopolisacáridos totales presentes en los distintos cultivos fue medida usando el reactivo de Antrona. Si bien este método detecta todos los azúcares reductores, los

exopolisacáridos se calculan como equivalentes de glucosa (Quelas et al., 2006). Se empleó glucosa para realizar la curva estándar correspondiente (5µg-500µg). Se tomó 1 ml de sobrenadante de cultivos de biorreactor y se centrifugó durante 40 minutos a 9.500 rpm a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación se transfirió a un envase de vidrio con 3 volúmenes de etanol absoluto y se lo dejó reposar durante toda la noche a -20°C. El siguiente paso consistió en una centrifugación durante 40 min a 4°C. El sobrenadante resultante se descartó y el *pellet* se resuspendió en NaCl (0,5M). A distintas alícuotas de esta preparación se le agregaron 0,5 ml de antrona (0,2% p/v in 95% H₂SO₄). Se hirvió la preparación durante 10 minutos, se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 620 nm protegiendo siempre a la preparación de la luz (Trvelyan y Harrison, 1952).

En el caso de la determinación de los EPS totales pertenecientes a los biofilms en frío se tomaron 8 pocillos como una unidad experimental y se determinó el contenido de los mismos siguiendo el protocolo ya detallado.

Caracterización del metabolismo de utilización de fuentes de carbono: Ensayos empleando Biolog System

Para estudiar la utilización de distintas fuentes de carbono por la cepa salvaje y la cepa *anr* de *P. extremaustralis* se empleó el sistema Microlog (Biolog). Este sistema consta de distintas fuentes de carbono incorporadas en pocillos junto con un compuesto comercial que en presencia de actividad metabólica vira al violeta. Este método es sensible y no depende de la generación de ciertos productos o cambios de pH, sino de la actividad respiratoria celular. Para realizar el ensayo se realizaron cultivos durante toda la noche de ambas cepas en medio LB, las células fueron lavadas dos veces con solución fisiológica (9 g de NaCl por litro de agua), ajustando luego la DO_{600nm} a 0,1 en esta misma solución. Los pocillos se inocularon con esta suspensión y el sistema se incubó con agitación suave (150 rpm) a 28 °C durante 24 h. El color fue observado a simple vista y medido cuantitativamente a 600, empleando el espectrofotómetro µQuant (Biotck Instruments, Inc.) a las 4, 6, 8 y 24 h. Los valores obtenidos se analizaron determinando en primer término la capacidad de utilización del compuesto, tomando como positivos aquellos valores que superaran el control negativo en 3 veces. Luego se calculó un cociente entre los valores obtenidos para la cepa salvaje y la mutante, teniendo en cuenta solo aquellos compuestos cuyo cociente resultara mayor a 3 o menor a 0,30. El experimento fue realizado por duplicado empleando los paneles GN y GP (Biolog).

Caracterización del metabolismo de aminoácidos en *P. extremaustralis anr*

Para estudiar el metabolismo de aminoácidos en la cepa *P. extremaustralis anr* mutante se empleó el medio mínimo E2 suplementado con 0.2% de glucosa. Además se emplearon los 21 L- aminoácidos en una concentración final de 2mM o 0,5 mM. En primera instancia se empleó una mezcla completa de aminoácidos como control positivo (también se utilizó 0,3% de casaminoácidos como otro control positivo). Se realizó un pre-cultivo de la cepa mutante durante toda la noche en medio LB. Inicialmente, se realizaron 3 lavados con medio E2 de modo de eliminar cualquier transferencia de aminoácidos desde el medio rico, por último se ajustó la DO_{600nm} a 0,05. En todos los casos los cultivos se incubaron durante toda la noche a 30°C en placas de 96 pocillos con un volumen de 175 μ l. Las placas de 96 pocillos para cada grupo se sembraron por triplicado. La incubación se realizó con una agitación de 150 rpm. Luego de la incubación se determinó el crecimiento mediante el monitoreo de la DO a 600 nm utilizando un lector de placas μ Quant (Biotek Instruments, Inc.). Para estudiar cual o cuales eran los aminoácidos que debían ser agregados al medio de cultivo para obtener crecimiento se agruparon los aminoácidos siguiendo el siguiente esquema:

A: L-Triptofano, L-Serina, L-Histidina, L-Alanina

B: L-Cisteína, L-Prolina, L-Leucina, L-Valina

C: Acido L-Aspártico, L-Lisina, Acido L-glutámico, L-cistina

D: L-Treonina, L-metionina, L-arginina, L-isoleucina

E: Glicina, Asparragina, Glutamina, Fenilalanina

Luego se redujo el número de aminoácidos realizando una nueva agrupación empleando solo una concentración de 0,5 mM :

A': L-triptofano, L-serina, L-histidina, L-alanina, L-glicina y L-fenilalanina.

B': L-glutamina, L-Asparragina, L-Treonina, L-metionina, L-arginina y L-isoleucina

Además se realizaron las siguientes subagrupaciones

A'1: A' sin L-triptofano

A'2: A' sin L-serina

A'3: A' sin L-histidina

A'4: A' sin L-alanina

A'5: A' sin L-glicina

A'6: A' sin L-fenilalanina

B'1: B' sin L-glutamina

B'2: B' sin L-asparragina

B'3: B' sin L-treonina

B'4: B' sin L-metionina

B'5: B' sin L-arginina

B'6: B' sin L-isoleucina

Se realizaron entonces las combinaciones entre todos los grupos según se puede observar en el siguiente esquema:

Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A'1	A'1	A'1	A'2	A'2	A'2	A'3	A'3	A'3	A'4	A'4	A'4
B	A'5	A'5	A'5	A'6	A'6	A'6	B'1	B'1	B'1	B'2	B'2	B'2
C	B'3	B'3	B'3	B'4	B'4	B'4	B'5	B'5	B'5	B'6	B'6	B'6
D	B'+A'1	B'+A'1	B'+A'1	B'+A'2	B'+A'2	B'+A'2	B'+A'3	B'+A'3	B'+A'3	B'+A'4	B'+A'4	B'+A'4
E	B'+A'5	B'+A'5	B'+A'5	B'+A'6	B'+A'6	B'+A'6	A'+ B'1	A'+ B'1	A'+ B'1	A'+ B'2	A'+ B'2	A'+ B'2
F	A'+B'3	A'+B'3	A'+B'3	A'+B'4	A'+B'4	A'+B'4	A'+B'5	A'+B'5	A'+B'5	A'+B'6	A'+B'6	A'+B'6
G	B'1+A'1	B'1+A'1	B'1+A'1	B'1+A'2	B'1+A'2	B'1+A'2	B'1+A'3	B'1+A'3	B'1+A'3	B'1+A'4	B'1+A'4	B'1+A'4
H	B'1+A'5	B'1+A'5	B'1+A'5	B'1+A'6	B'1+A'6	B'1+A'6	A'	B'	CAS	A'+B'	Negativo	
Placa 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B'2+A'1	B'2+A'1	B'2+A'1	B'2+A'2	B'2+A'2	B'2+A'2	B'2+A'3	B'2+A'3	B'2+A'3	B'2+A'4	B'2+A'4	B'2+A'4
B	B'2+A'5	B'2+A'5	B'2+A'5	B'2+A'6	B'2+A'6	B'2+A'6	B'3+A'1	B'3+A'1	B'3+A'1	B'3+A'2	B'3+A'2	B'3+A'2
C	B'3+A'3	B'3+A'3	B'3+A'3	B'3+A'4	B'3+A'4	B'3+A'4	B'3+A'5	B'3+A'5	B'3+A'5	B'3+A'6	B'3+A'6	B'3+A'6
D	B'4+A'1	B'4+A'1	B'4+A'1	B'4+A'2	B'4+A'2	B'4+A'2	B'4+A'3	B'4+A'3	B'4+A'3	B'4+A'4	B'4+A'4	B'4+A'4
E	B'4+A'5	B'4+A'5	B'4+A'5	B'4+A'6	B'4+A'6	B'4+A'6	B'5+A'1	B'5+A'1	B'5+A'1	B'5+A'2	B'5+A'2	B'5+A'2
F	B'5+A'3	B'5+A'3	B'5+A'3	B'5+A'4	B'5+A'4	B'5+A'4	B'5+A'5	B'5+A'5	B'5+A'5	B'5+A'6	B'5+A'6	B'5+A'6
G	B'6+A'1	B'6+A'1	B'6+A'1	B'6+A'2	B'6+A'2	B'6+A'2	B'6+A'3	B'6+A'3	B'6+A'3	B'6+A'4	B'6+A'4	B'6+A'4
H	B'6+A'5	B'6+A'5	B'6+A'5	B'6+A'6	B'6+A'6	B'6+A'6	CAS	Negativo	A'	B'	A'+B'	salvaje

Luego se observó que aminoácidos eran indispensables para el crecimiento de esta cepa y se agregaron solamente estos de manera de determinar el mínimo número de aminoácidos requeridos por la cepa mutante *anr*.

7. Estudios de la expresión génica

Extracción de RNA

Para la realización de estudios de expresión génica se utilizaron cultivos en diferentes condiciones de crecimiento a 6 y 24 horas, tanto en condiciones no controladas como en cultivos en biorreactor a diferentes tensiones de oxígeno. Las células fueron cosechadas por centrifugación y se realizó la extracción de RNA total empleando el kit comercial de extracción *Total RNA extraction mini Kit* (Bioamerica). Se trató con DNasa I. El RNA

extraído se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, empleando *buffers* y *loading buffer* libres de RNAsas. Se determinó la integridad del RNA obtenido, así como su cantidad aproximada utilizando marcadores de peso molecular. Este RNA se conservó a -80°C hasta su utilización. Para descartar contaminación de DNA se realizó el mismo programa de qPCR empleando el RNA sin el paso a cDNA esperando no encontrar amplificación.

Obtención del cDNA total

Se emplearon para esto hexámeros random (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se tomó aproximadamente 1 µg de RNA al que se le agregó 1µl de hexámeros random y se incubó durante 5 minutos a 70°C. Luego se agregaron dNTPs, buffer de retrotranscriptasa AMVL (Promega), RNAsin (inhibidor de RNAsas) y 25 unidades de AMVL retrotranscriptasa (Promega). Se llevó adelante entonces un ciclo a 37°C durante 1 hora.

Experimentos de PCR cuantitativa en Tiempo Real (qPCR RT)

Los experimentos de PCR cuantitativa en Tiempo Real se llevaron a cabo utilizando el ciclador LightCycler (DNA Engine M.J. Research). Se estudiaron 3 genes relacionados con la síntesis de PHB *phaC*, *phaR* y *phaB*, para la normalización de los niveles de expresión se empleó el gen 16S del rRNA. El programa que se desarrolló se detalla en la Tabla 5 MyM.

Para determinar los niveles de expresión de los genes individuales se utilizó el método de curva Standard (Larionov et al., 2005). De forma arbitraria se empleó la cepa salvaje en condiciones microaeróbicas para realizar al menos 5 diluciones seriadas al medio. Con los valores obtenidos de Ct para estas diluciones se construyó, en cada corrida, una curva de Ct en función del log₂ de la dilución. Se obtuvo en cada oportunidad la ecuación de la recta obtenida, la pendiente de la misma constituye la eficiencia de la reacción, solo se siguió adelante con la cuantificación si la eficiencia resultó más de 0,85 y menos de 1,15.

Tabla 5 MyM: Programas de PCR cuantitativa (PCR Real Time)

Producto	Desnaturalización (95°C)	Annealing 60°C 15 seg	Extensión (72°C) 15 seg
<i>phaC/phaR/phaB</i>	25 seg	60°C 15 seg	15 seg
rRNA 16S	25 seg	60°C 15 seg	15 seg

8. Estudios de la formación de biofilms en *P.extremaustralis*

En esta Tesis se abordará no solo el estudio de los biofilms en relación al regulador Anr sino también la influencia del PHB en relación a los biofilms en frío.

Para estos últimos, se emplearon una cepa mutante *phaC* y una complementada disponibles en el laboratorio (Tabla 1). Los precultivos para el análisis de la influencia de PHB en biofilms se realizaron en caldo nutritivo (Difco) debido a que experimentos anteriores en el laboratorio para el estudio de la supervivencia en frío se llevaron adelante en este medio. Como se describió en la Sección de Introducción esta cepa es incapaz de acumular el polímero en cultivos suplementados con glucosa (0,27%), por lo cual este hidrato de carbono se empleó para lograr condiciones de no acumulación de PHB en la cepa salvaje. Por otra parte, se utilizó octanoato de sodio para permitir la acumulación del polímero. La temperatura de incubación en frío fue de 10°C y la temperatura control 28°C.

Para el estudio de la influencia de Anr sobre la formación de biofilms los precultivos fueron realizados en medio LB y los ensayos se llevaron adelante en un medio similar al NEOCN pero empleando glucosa (0,2%) como fuente de carbono en lugar de octanoato de sodio.

Ensayos de biofilms en placas multipocillo

Para realizar los ensayos de formación de biofilms se utilizaron en primera instancia placas de 96 pocillos de poliestireno (O'Toole y Kolter, 1998), fondo en U sin pre-tratamientos (Gibco). Cultivos de *P. extremaustralis* y su mutante *anr* fueron empleados como inóculos. Se colocaron 200 µl de medio 0.5NE2 suplementado con

casaminoácidos, nitrato de potasio y glucosa en cada pocillo. Las bacterias se incorporaron a una DO_{600nm} inicial de 0,025. Las placas se incubaron a 28° C durante 24 horas luego de lo cual se procedió a evaluar la adherencia utilizando la técnica de tinción con cristal violeta. Brevemente, se tomó el sobrenadante de cada pocillo para determinar la DO_{600nm} de las células planctónicas (Ap), luego se agregaron 200 μ l de Cristal violeta (0,1% en etanol 70%) a cada pocillo (10 por cada cepa). Luego de 20 minutos se lavaron los pocillos suavemente con agua destilada para retirar el cristal violeta remanente, se agregaron entonces 200 μ l de etanol absoluto y se esperaron 20 minutos a que se solubilice el colorante. Luego se tomó el volumen completo y se lo trasladó a una placa de fondo plano y se midió la absorbancia en el lector de Elisa Tasoh Corp MPR Ai4 utilizando un filtro I 550/700 (A_{CV}). Se determinó el índice de adherencia como la relación A_{cv}/A_{pl} .

Para el caso del estudio de los biofilms en frío, se realizaron precultivos de *P. extremaustralis*, *phaC* y *phaC* complementada en caldo nutritivo suplementado con octanoato de sodio y también precultivos de la cepa salvaje suplementados con glucosa. Los biofilms se incubaron durante 72 horas a 28°C (temperatura control) o a 10°C. Se tomaron 8 pocillos como unidad experimental. Se realizó una tinción de CV tal como se explicó anteriormente. Además se llevaron a cabo recuentos de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) totales para lo cual se tomó el contenido total del pocillo: células libres y adheridas, que fueron despegadas mediante raspado mecánico de las paredes del pocillo. El material obtenido se agitó con vórtex durante 20 minutos para disgregar completamente los agregados celulares. Para determinar la supervivencia de las células planctónicas y el cociente entre las células adheridas respecto a las plantónicas ($C_{A/P}$), se tomaron por separado las células adheridas al biofilm (resuspendidas en solución fisiológica utilizando el mismo volumen en el que se encuentran las células plantónicas) y las células que se encontraban en el medio de cultivo del mismo y se determinaron las ufc/ml.

Biofilms en condiciones batch: mini placas de Petri “bottom glass”

Para estos ensayos se emplearon placas de Petri con un pequeño vidrio en la parte inferior de las mismas que permite la observación del biofilm con un microscopio adecuado. Se emplearon placas de Petri de 35mm de diámetro, 14 mm de diámetro para el vidrio y tipo 1 la altura del vidrio (Mat-tek Inc.). Se utilizó el medio 0,5NE2

anteriormente descrito para la formación de biofilms estáticos en placa multipocillo. Los biofilms se incubaron a 28°C durante 24, 48, 72 o 96 horas con agitación suave (50 rpm). Cada 24 horas se cambió el medio de cultivo.

Para analizar la estructura del biofilm, tanto *P.extremaustralis* como la cepa *anr* mutante, fueron transformadas con plásmidos conteniendo la proteína GFP clonada río abajo de promotores constitutivos. Se debieron utilizar dos plásmidos distintos debido a la resistencia de la cepa mutante a la Km (debido a la mutación en *anr*) y a la dificultad de transformar la cepa salvaje con plásmidos conteniendo tetraciclina, siendo el pBBR1MCS-2, el plásmido con mejor eficiencia.

Además se realizó una tinción con el colorante fluorescente DAPI (1 µg/ml). Los biofilms se lavaron cuidadosamente con solución fisiológica (NaCl 9g/l) luego se agregó el colorante y se lo dejó actuar durante 1 hora con agitación muy lenta (25 rpm) y protegido de la luz. Luego se retiró el colorante y se lavó cuidadosamente tres veces.

En todos los casos se agregó agarosa *low melting point* 1% para conservar las estructuras y mantener la hidratación. Las observaciones se realizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX61, utilizando un aumento 200X para fluorescencia y empleando los filtros correspondientes, siendo Near UV (360-370nm) para DAPI y 525-550 nm para la observación de GFP. Las imágenes se tomaron con Cooke Sense Camara Sony Interline Ship (Auburn, Hills MI), el software utilizado fue Slide Book Software package Versión 3.0.10.15 (Junker et al., 2006). Los *stacks* fueron tomados en el plano Z cada 2µm y se emplearon para realizar deconvoluciones con el software ya indicado. Para cada biofilm observado se tomaron al menos 6 *stacks* y se calcularon parámetros (biomasa, grosor promedio, grosor máximo, coeficiente R, etc.) con el programa COMSTAT2, utilizando *Threshold* automático.

Ensayos de adhesión a tiempos cortos

Para estudiar la adhesión a tiempos cortos se emplearon placas multipocillo, tal como se describió anteriormente. Los pocillos fueron inoculados con una DO_{600nm} inicial de 0,3 y la placa fue incubada a 30°C durante distintos tiempos. Luego se realizó la tinción con CV y el índice de adherencia se calculó tal como se describió anteriormente.

Experimentos de agregación

Se realizaron pre-cultivos en medio LB durante toda la noche con agitación (200 rpm). Estos fueron diluidos en medio de cultivo fresco y fueron incubados nuevamente hasta una DO aproximada de 0,8. Luego se tomaron alícuotas de 1 ml, se colocaron en tubos *Eppendorf*, y se dejaron reposar durante dos horas. Se tomaron 200 μ l del cultivo, teniendo especial atención de tomar este volumen desde la superficie sin provocar movimiento o mezcla, y se midió la DO_{600nm}. También se midió este parámetro luego de agitar enérgicamente la totalidad del cultivo restante.

Ensayos de movilidad bacteriana

Se analizaron los movimientos de *swimming*, *swarming* y *twitching*. La composición de los medios de cultivo empleados para evaluar cada tipo de movilidad se detalla en el anexo. Las placas de Petri utilizadas en los ensayos de movilidad fueron preparadas y secadas bajo flujo laminar durante 60 minutos e inoculadas con 5 μ l de pre-cultivos de *P.extremaustralis* y *anr* mutante cultivados durante toda la noche en medio LB. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 48 horas, midiendo luego la movilidad de cada una de las cepas en cm desde el punto de siembra.

En el caso de la determinación de la movilidad en frío se realizaron pre-cultivos de *P.extremaustralis* en caldo nutritivo suplementado con octanoato de sodio (con PHB) o con glucosa (sin PHB). Las placas fueron suplementadas con octanoato de sodio (0,25%) y se incubaron a 28°C o a 10°C durante 3 o 7 días, midiendo luego la movilidad de cada una de las cepas en cm desde el punto de siembra.

Cabe destacar que los medios empleados para comparar la movilidad de la cepa salvaje y *anr* mutante fueron diferentes a los utilizados para estudiar la movilidad en frío debido a las deficiencias de crecimiento de la cepa *anr* en algunos de los medios recomendados tradicionalmente.

9. Test estadísticos

La comparación de la diferencia entre valores promedios de los experimentos se llevó adelante con el paquete estadístico del programa GraphPad Prisma versión 5 (www.graphpad.com/prism/). Se empleó el t-test con un intervalo de confianza del 95 y una $p < 0,05$ para ser consideradas diferencias significativas.

10. Observación de células por Microscopía

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se realizaron observaciones empleando esta técnica para estudiar la forma y el tamaño de las células de la cepa salvaje y de las mutantes en distintas condiciones de crecimiento. Los cultivos celulares realizados empleando el medio NEONC en condiciones aeróbicas (Erlenmeyer o en biorreactor controlado) o microaeróbicas (botella o biorreactor controlado) fueron fijados durante una hora en Glutaraldehído al 0,1 %. Luego se procedió a deshidratar progresivamente las células pasando por alcoholes de distintas concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90, 95, 100°). Las células se trataron con vacío y se les agregó una fina capa de oro (Proceso de metalización). Para visualizar las muestras se utilizó el Microscopio de Barrido del Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

Microscopía electrónica de transmisión

Para llevar adelante observaciones de microscopía electrónica de transmisión se emplearon pre-cultivos o.n. de ambas cepas en medio LB. Se realizó luego una dilución de los mismos y se cultivaron hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,8. Luego se tomaron alícuotas de 1 ml y se dejaron sin agitación durante 2 horas antes de realizar el tratamiento necesario en forma similar a lo realizado para los ensayos de agregación, mientras que otras alícuotas del cultivo inicial fueron inmediatamente tratadas para su observación al microscopio. Una gota de 10 μ l de cada condición de cultivo se colocó suavemente sobre una gota de Uranio (1%), luego de 1 minuto se coloca la gota sobre una red (Mesh) más comúnmente conocidas como *grids*. Las observaciones se realizaron el microscopio Philips EM 201 empleando distintos aumentos (de 10.000 a 30.000).

11. Análisis Bioinformáticos

Predicción *in silico* del Regulon Anr en *Pseudomonas extremaustralis*

Para predecir *in silico* el denominado Regulon Anr se utilizó el software *on line* PRODORIC (<http://prodoric.tu-bs.de/>) empleando su herramienta *Virtual Footprinting*. Los sitios de unión a Anr en la secuencia del genoma de *P. extremaustralis* fueron predichos empleando tres matrices disponibles para Anr de *P. aeruginosa*. Una vez determinados los sitios probables se analizó individualmente en qué posición dentro del genoma se encontraron, de esta forma aquellos box que se encontraban dentro de un marco abierto de lectura fueron descartados, de la misma manera fueron descartados aquellos que se encontraran a más de 800 pares de bases río arriba del ATG inicial. Los probables genes blanco fueron agrupados por función. Luego, en una segunda ronda se empleó el Regulon Anr/Dnr descrito para *P. aeruginosa* (Trunk et al., 2010) y se buscaron Anr-boxes en la zona promotora de estos genes ya sea nuevamente con el programa PRODORIC o manualmente.

Para determinar la matriz de unión de Anr sobre los distintos genes blanco de *P. extremaustralis* se empleó el programa Logo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) disponible en la red, utilizando no solo los probables boxes hallados con el programa PRODORIC sino también aquellos hallados manualmente en distintos genes de interés.

Análisis bioinformático de los genes de *P. extremaustralis*

Los genes de *P. extremaustralis* (excepto aquellos en que se indique lo contrario) fueron obtenidos a partir de la secuenciación del genoma completo (INDEAR, Argentina). Las secuencias se encuentran depositadas en el servidor RAST (<http://rast.nmpdr.org>), para obtener la presencia y detalle de localización de cada gen de interés se utilizó el servidor seviewer (<http://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi>), el cual cuenta con herramientas, como BLAST, para realizar búsquedas dentro del genoma de *P. extremaustralis*. Cada secuencia obtenida fue luego analizada (como secuencia aminoacídica deducida de la nucleotídica) utilizando el programa BLAST *protein* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), de cada comparación se eligieron las secuencias con mayor score. Luego empleando el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) se determinaron los porcentajes de identidad (tomando

en cuenta los aminoácidos idénticos entre ambas secuencias) y de similitud (tomando en cuenta los aminoácidos idénticos y los similares químicamente).

12. Expresión de la proteína Anr*

La construcción de la proteína Anr*, que presenta actividad en aerobiosis, fue realizada durante la Tesis de Licenciatura de Lic. Jose Ibarra (Ibarra, 2011). Esta construcción fue empleada para transformar una cepa de *E.coli* JM109, cuyos cultivos se indujeron con IPTG (1mM) durante 1 hora. La expresión fue detectada por medio de la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos anti 6x-His (Santa Cruz) como anticuerpo primario y anti-mouse HRP conjugado como anticuerpo secundario (Santa Cruz). Esto se llevó a cabo según se detalla a continuación: Se realizó en primer lugar una corrida electroforética en gel de poliacrilamida de las muestras empleando un marcador de peso molecular preteñido (Rainbow full range, GE). El contenido total de proteínas en el extracto crudo se estimó por el método de Bradford, a fin de sembrar cantidades similares de cada muestra.

Los buffers empleados se detallan en el anexo al final de esta sección y la composición de los geles de poliacrilamida utilizados en la electroforesis se detalla a continuación:

Gel separador (10%)

Volumen total (ml)	Acrilamida 30% (ml)	Buffer separador 4X (ml)	TEMED (μl)	APS (μl)	H ₂ O
12	4	3	16	30	completa vol.

Gel Concentrador (4,5 %)

Volumen total (ml)	Acrilamida 30% (ml)	Buffer concentrador 4X (ml)	TEMED (μl)	APS (μl)	H ₂ O
3,5	1,05	1,75	6	10	completa vol.

Para realizar el *Western Blot* se siguió el siguiente protocolo:

- Colocar el gel de poliacrilamida en buffer de transferencia durante 20 min.
- Colocar las membranas de nitrocelulosa en agua destilada durante 5 min.

- Colocar las membranas de nitrocelulosa en buffer de transferencia durante 10 min. Humedecer el papel de cromatografía (Whatman) en buffer de transferencia y transferir por electroforesis
- Colocar la membrana de nitrocelulosa en buffer de bloqueo durante dos horas con agitación suave a temperatura ambiente.
- Lavar 4 veces en agitación durante 5 min. a temperatura ambiente con 20 ml de buffer de lavado.
- Colocar el anticuerpo primario anti Hisx6 durante toda la noche a 4°C.
- Lavar la membrana 5 veces durante 10 min con 20 ml de buffer de lavado en agitación rotatoria a temperatura ambiente.
- Colocar el anticuerpo secundario durante una hora. Realizar 5 lavados con buffer de lavado.
- Para el revelado embeber la membrana en una solución 1ml A + 1 ml B, mezclados en el momento.

Para la transferencia de las proteínas del gel a las membranas se utilizó un equipo Amersham Biosciences TE 70. La transferencia se realizó durante 45 minutos a 45 mA. Para el revelado del *Western Blot* se utilizó el Equipo Fuji Photo Film LAS1000 Co., Ltd. La composición de los Buffers empleados para *Western Blot* se describe en el anexo al final de esta sección.

13. Anexo**Composición de medios de cultivo empleados (por litro)****Medio Luria-Bertani (LB)**

Extracto de levadura	5 g/l
Triptona	10g/l
NaCl	5g/l
Agar (para el medio sólido)	15 g/l

Medio para preparación de células de *E.coli* competentes de alta eficiencia**PSIB**

Extracto de levadura	5 g/l
Triptona	20 g/l
MgSO ₄	5 g/l

Medio 0,5NE2 empleado para la acumulación de PHB (Huisman et al., 1992)

NaH ₂ NH ₄ PO ₄ x 4 H ₂ O	1,75g
KHPO ₄ x 3 H ₂ O	7,5g
KH ₂ PO ₄	3,7g
Extracto de levadura	1g
Luego de autoclavar se agrega	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2mM
MT microelementos	1ml

Con el agregado de octanoato de sodio (0,25%): NEO

Con el agregado de casaminoácidos (0,30 %): NEOC

Caldo Nutritivo (Difco) empleado para ensayos de Biofilm en frío

Caldo nutritivo

Agar para medio sólido	15 g/l
------------------------	--------

Medio empleado en el estudio de la influencia de Anr en la formación de biofilms

0,5NE2

Se agregaron los siguientes suplementos

Casaminoácidos	0,3 %
----------------	-------

Glucosa	0,27%
KNO ₃	0,08%

Medio E2 para el estudio de movilidad (por litro) (Huisman et al., 1992)

NaH ₂ NH ₄ PO ₄ x 4 H ₂ O	1,75g
KHPO ₄ x 3 H ₂ O	7,5g
KH ₂ PO ₄	3,7g

Medio para el estudio de movilidad en el estudio del papel de Anr (por litro)

Medio E2

Swimming: agar 3 g

Swarming: agar 6 g

Twitching:

Twitching (por litro)

Tryptona	10g
Extracto de Levadura	5g
NaCl	10g
Agar	15g

Se agregaron los siguientes suplementos

Glucosa	0,2 %
Casaminoácidos	0,3 %

Medios empleados para el estudio de la movilidad en bajas temperaturas

Swarming

Caldo nutritivo	8 g
Agar	5g

Twitching

Tryptona	10g
Extracto de Levadura	5g
NaCl	10g
Agar	10g

Swimming

Tryptona	10g
NaCl	3g

Buffers empleados**Para la preparación de células competentes de *E.coli* de alta eficiencia****TFBI (pH 5,8)**

Acetato de K	30 mM pH=5.5
KCl	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM
Glicerol	15 %

TFBII (pH 6,5)

MOPS (o PIPES)	10 mM pH=7
CaCl ₂	75 mM
KCl	10 mM
Glicerol	15 %

Solución de Ringer (por Litro)

NaCl	9 g
KCl	0.3 g

Solución fisiológica (por Litro)

NaCl	9 g
------	-----

Para la realización de corrida electroforética**Buffer de corrida: (por Litro)**

- Tris base 3g
- Glicina 14,4 g
- SDS 1 g
- Completar volumen con agua destilada.

Buffer concentrador: (4X para 500 ml)

- Tris Base 30,23g
- SDS 2g
- Llevar a pH 6.8 con ácido clorhídrico

Buffer separador: (4X para 500ml)

- Tris Base 90,83g
- SDS 2g
- Llevar a pH 8 con ácido clorhídrico.

Solución de acrilamida 30% (para 500ml)

- Acrilamida 146g
- N,N'-metilen-bisacrilamida 4g

Para la realización de la técnica de Western Blot

Buffer PBS:

- 0,58 M Na₂HPO₄
- 0,17 M Na₂H₂PO₄
- 0,68 M NaCl
- Llevar a volumen con agua destilada.

Buffer de lavado:

- PBS
- Tween 20 al 0.05%

24

Buffer de bloqueo:

- PBS
- Leche descremada en polvo al 3%
- Tween 20 al 0.05%

Buffer de transferencia: (para 100 ml)

- Tris Base 0.303 g
- Glicina 1.44 g
- Metanol 15 ml
- Agua destilada hasta completar volumen

Soluciones de revelado para la detección por quimioluminiscencia:

Solución A:

- 0,1 ml Luminol
- 0,044 ml Ac. Cumárico
- 1 ml Tris 1 M pH 8.5
- Llevar a 10 ml con agua destilada

Solución B:

- 0,1 ml Tris 1 M pH8.5
- 0,9 ml de agua destilada
- H₂O₂ 0.064 ml (agregar en el momento de usar)

Resultados

CAPITULO 1:

- i) Clonado y Análisis del gen *anr* en *P. extremaustralis*.
- ii) Estudio de los fenotipos regulados por Anr: Fermentación de L-arginina y Desnitrificación.

i) Clonado y Análisis del gen *anr* en *P. extremaustralis*

Obtención del gen *anr* de *P. extremaustralis*

A partir de DNA genómico de *P. extremaustralis* y utilizando la técnica de PCR fue posible obtener un fragmento de 1100 pb (Figura 1.A). Este fragmento se clonó en el plásmido pGEM-T easy, obteniéndose el plásmido pGAN (Figura 1.B), el cual fue luego secuenciado. El análisis de la secuencia obtenida (Figura 1.C) con el programa BLAST permitió comprobar que dicho fragmento contenía la secuencia completa del gen *anr* (738 bp) y una porción del gen *apt* (adenina fosforibosiltransferasa), el cual se encuentra río abajo de *anr* en varias especies de *Pseudomonas* como *P.aeruginosa*, *P. fluorescens* Pf-5 y *P. entomophila*. La comparación de la secuencia aminoacídica de Anr deducida a partir de la secuencia nucleotídica, mostró un tamaño conservado respecto a otras especies de *Pseudomonas* (245 aminoácidos) y un alto porcentaje de identidad y de similitud tanto con proteínas pertenecientes a especies del género, siendo Anr de *P. fluorescens* Pf-5 aquella que mostró mayor similitud con *P. extremaustralis* (Tabla 1). Anr también presentó una alta similitud a otras proteínas consideradas homólogas, tales como Fnr en *Escherichia coli* y *CydR* en *Azotobacter vinelandii*. Tal como se describió anteriormente, para el funcionamiento de los factores de transcripción sensibles al oxígeno son necesarios ciertos aminoácidos claves. Estos aminoácidos fueron hallados en la secuencia de Anr de *P. extremaustralis*: 3 cisteínas en la región aminoterminal (posiciones 20, 23 y 29, numeración de *E.coli*) y una Cys en la posición 122 en la región interna. Estas cuatro cisteínas conforman un cluster $[4Fe-4S]^{+2}$ sensible al oxígeno capaz de presentarse en diferentes estados de oxidación influyendo en la conformación de la proteína, permitiendo la dimerización y activación. Además, se encontraron los dominios de unión al DNA hélice-vuelta-hélice típicos de factores de transcripción, en particular los aminoácidos Glu-209 y Ser-212, que son necesarios para la unión de Fnr al ADN (Figura 3).

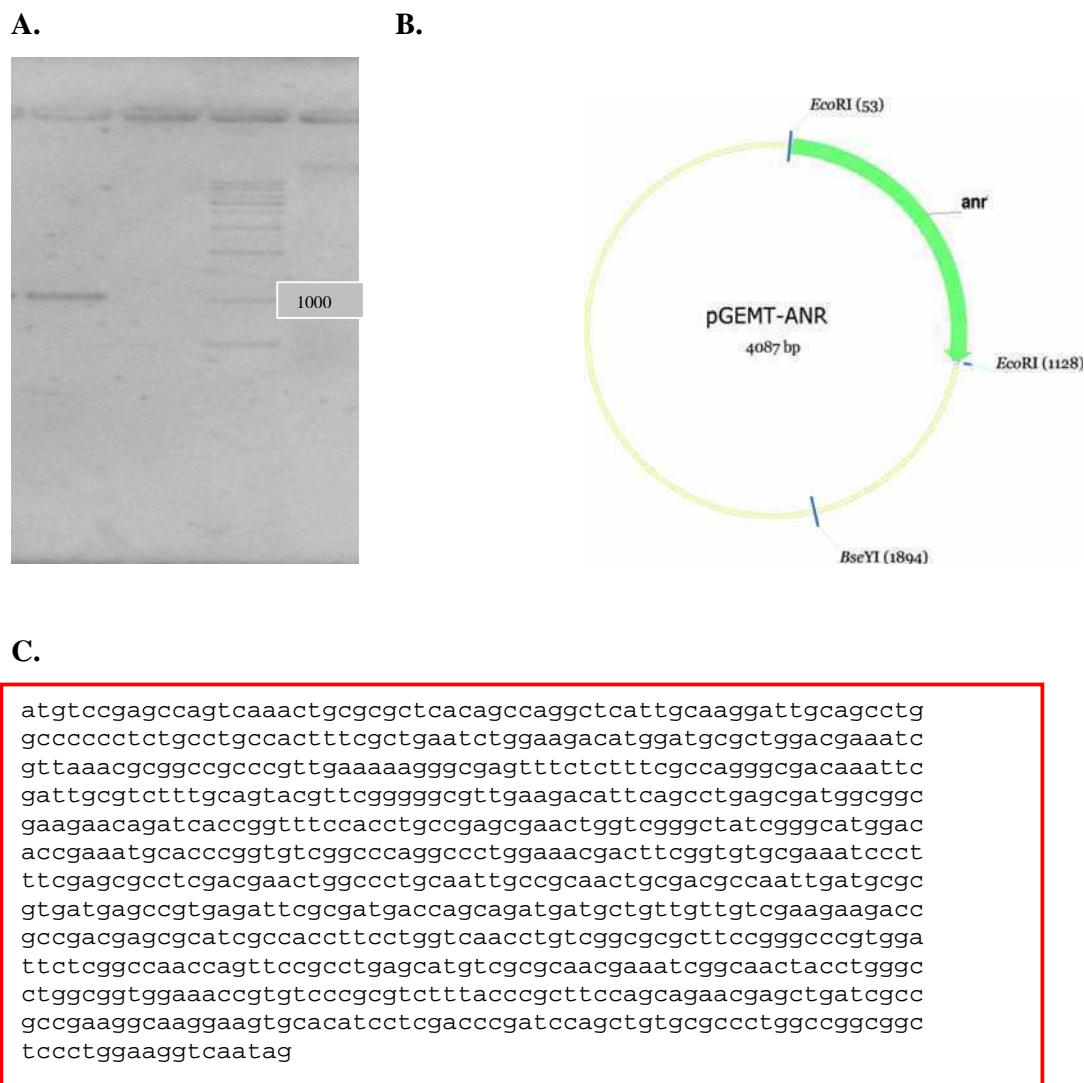


Figura 1: Clonado del gen *anr* **A.** Electroforesis en gel de agarosa mostrando un fragmento de amplificación conteniendo el gen *anr* y un fragmento del gen *apt* de *P. extremaustralis* (1100 pb) con el marcador de peso molecular 1 kb (Promega). **B.** Esquema del plásmido pGAN obtenido por el clonado del gen *anr* en el plásmido pGEMT-easy. **C.** Secuencia nucleotídica del gen *anr* obtenido de *P. extremaustralis* EMBL número de acceso: AM901400

Tabla 1: Comparación del producto del gen *anr* de *P. extremaustralis* con otros productos bacterianos.

Gen	Organismos	Similitud con otros productos génicos		
		Nº aminoácidos	Identidad	Similitud
<i>anr</i> (AF053611.1)	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	244	97	98
<i>anr</i> (YP_347543)	<i>P. fluorescens</i> PfO-1	244	95	97
<i>anr</i> (AAN69845)	<i>P. putida</i> KT2440	244	92	96
<i>anr</i> (AAA25713.1)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	244	87	94
<i>cydR</i> (YP_002799173)	<i>Azotobacter vinelandii</i>	244	86	98
<i>fnrA</i> (CAA81129)	<i>P. stutzeri</i> ATCC 1440	244	84	95
<i>fnr</i> (NP_415850.1)	<i>Escherichia coli</i> K12	250	47	72

Pe	-MSEPVKLRAHS---QAHCKDCSLAPLCLPLSLNLEDMDALDEIVKRGRPLKKGEFLFRQGDKF	60
Pa	-MAETIKVRALP---QAHCKDCSLAPLCLPLSLTVEDMDSLDEIVKRGRPLKKGEFLFRQGDPF	60
Av	-MSDKSKVRPVH---HIRCQECSLAALCLPISLNFEDIDALNEIVKRGRPKKGEFLFRQGDFAF	60
Ec	MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNHEHELDQLDNIIEKKKPIQKGQTLFKAGDEL	65
	:.: :* :*****: *****: .:.* *:*:*:*: *:*:*:*: **:	
Pe	DCVFAVRSGALKTFSLSDGGEEQITGFHLPSELVGLSGMDTEMHPVSAQALETTSVCEIIPFERLD	125
Pa	GSVFAVRSGALKTF SITDAGEEQITGFHLPSELVGLSGMDTETYPVSAQALETTSVCEIIPFERLD	125
Av	GSVFAVRSGSLKTFVSDNGEEQITGFHLPSELVGLSGMDSDCPVSAQALETTSVCEIIPFERLD	125
Ec	KSLYAIRSGTIKSYTITEQGDEQITGFHLAGDLVGFDAIGSGHHPVSAQALETSMVCEIIPFETLD	130
	.:*****:*****: :*****: .:***: .:.: * *****: ***** *	
Pe	ELALQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLSKKTADERIATFLVNLSARFRARGFSANQFRLS	190
Pa	ELSEQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLSKKTADERIATFLVNLSARFRARGFSAQQFRLA	190
Av	ELALQLPQLRRQLMRVMSREIRDDQQMMLLSKKTADERIATFLINLSSRFARGFSANHFRLA	190
Ec	DLSGKMPNLRQQMRLMSGEIKGDQMILLLSKKNABERLAAFIYNLSRRFAQRGFSPREFRLT	195
	:*: :*:***:***:***: **: .:*****:*****: *:*:*:*: *:* * * * * * .:***:	
Pe	MSRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQQNELIAAEGKEVHILDPIQLCALAGGSLEGQ	245
Pa	MSRNEIGNYLGLAVETVSRVFTRFQQNGLISAEGKEVHILDSIELCALAGGQLEG-	245
Av	MSRNEIGNYLGLAVETVSRVFSRFQQNELIAAEGKEVTILNPVELCSLAGGNMEA-	245
Ec	MTRGDIGNYLGLTVETISRLLGRFQKSGMLAVKGYITITENNDAQLAGHTRNVA	250
	:. :*****:*****:*****: *****: .:.:***: : * : * . * * * :	

Figura 2: Alineamiento de Anr de *P. extremaustralis* con otras proteínas relacionadas. *P. aeruginosa* PAO-1 (Pa), *CydR* de *Azotobacter vinelandii* (Av) y *Fnr* de *E. coli* K-12 (Ec). El motivo hélice-vuelta-

hélice se encuentra subrayado. Las cisteínas pertenecientes al *cluster* sensible al oxígeno se encuentran coloreadas así como los residuos Glu-209 (E) y Ser-212 (S). Asteriscos (*) denotan los residuos conservados en todas las secuencias. El alineamiento fue generado empleando el software CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Determinación de la funcionalidad de Anr de *P. extremaustralis*: Complementación en *E.coli* Δ *fnr*

Para estudiar la funcionalidad del gen *anr* de *P. extremaustralis* se transformaron células competentes de *E.coli* MG1655 Δ *fnr*. Fnr, homólogo a Anr, controla en *E.coli* diferentes funciones metabólicas relacionadas con el pasaje de aerobiosis a microaerobiosis, por ejemplo, es activador de las enzimas nitrato reductasa que reduce el nitrato (NO₃⁻) a nitrito (NO₂⁻) y la formiato liasa que produce H₂ y CO₂ durante la fermentación de la glucosa a bajas tensiones de oxígeno (Soupene et al., 2003). La cepa Δ *fnr* es defectuosa en la reducción del nitrato y en la formación de gas, por lo que se puede emplear para estudios de complementación con reguladores homólogos a Fnr. Luego de transformar esta cepa con el plásmido pGAN conteniendo el gen completo de *P. extremaustralis* se realizaron ensayos de crecimiento en tubos no agitados conteniendo glucosa y una campana de Durham para captar el gas que se generaría en caso de complementar la mutación en *fnr*. En la Figura 3.A se observa la restitución de la producción de gas (complementación positiva) en la cepa Δ *fnr* conteniendo pGAN. Otro ensayo que se realizó para la comprobación de la funcionalidad de *anr* fue el crecimiento de la misma cepa mutante de *E.coli* en medio agar Mac-Conkey Lactosa Nitrato en anaerobiosis. En este medio las colonias con fenotipo salvaje crecen empleando el nitrato presente, su tamaño es grande y rosado, en cambio las colonias cuyo fenotipo es Fnr-, al no poder emplear el nitrato como aceptor alternativo de electrones, presentan un menor tamaño (debido a que la fermentación aporta menor cantidad de energía que la respiración anaeróbica del nitrato) y color rojo debido a los productos ácidos típicos del metabolismo fermentativo. El plásmido pGAN conteniendo el *anr* de *P. extremaustralis* también fue capaz de restituir el fenotipo salvaje en *E. coli* (Figura 3.B). En ambos ensayos se empleó *E.coli* MG1655 como control del fenotipo salvaje y la cepa Δ *fnr* como control negativo.

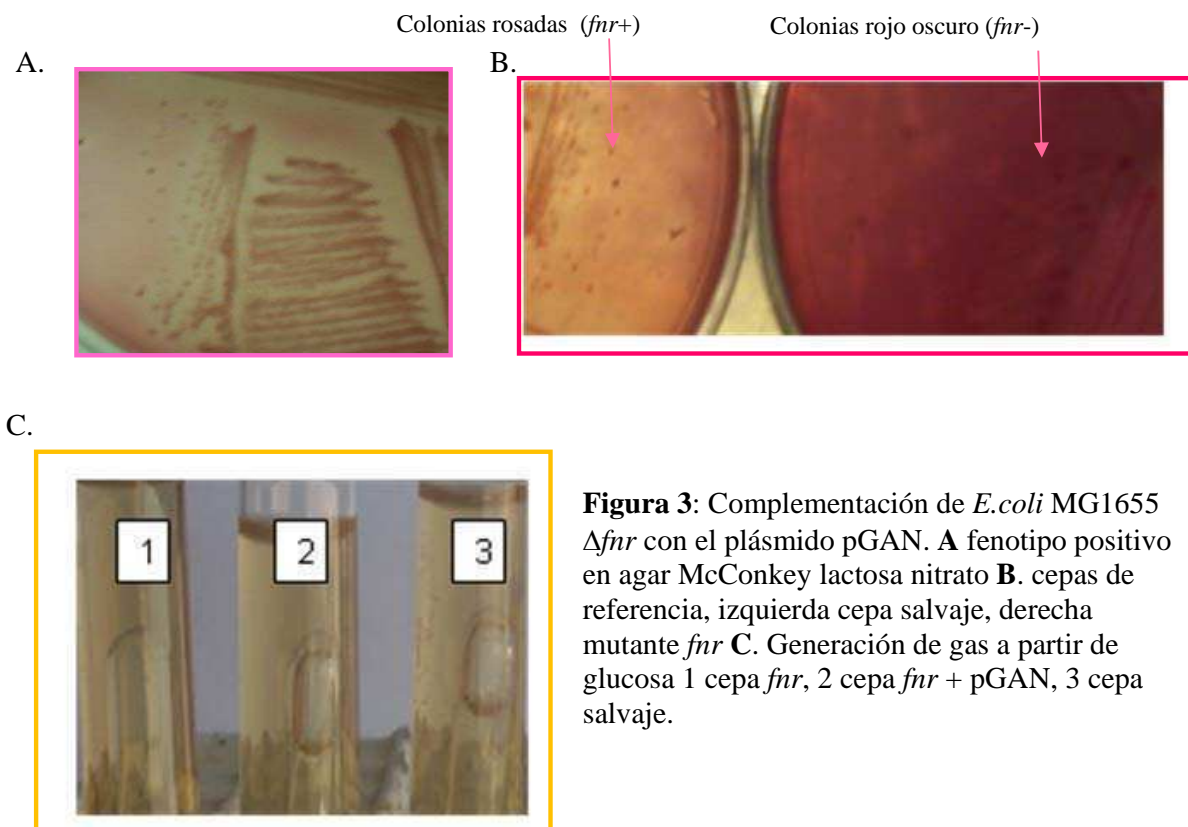


Figura 3: Complementación de *E. coli* MG1655 Δfnr con el plásmido pGAN. **A** fenotipo positivo en agar McConkey lactosa nitrato **B**. cepas de referencia, izquierda cepa salvaje, derecha mutante *fnr* **C**. Generación de gas a partir de glucosa 1 cepa *fnr*, 2 cepa *fnr* + pGAN, 3 cepa salvaje.

ii) Estudio del metabolismo microaeróbico de *P. extremaustralis*: Desnitrificación y Fermentación de L-Arginina

Desnitrificación en *P. extremaustralis*

Durante mi Tesis de Licenciatura se estudió la desnitrificación en *P. extremaustralis* detectando que, si bien es capaz de utilizar el nitrato (NO_3^-) como aceptor alternativo de electrones, no es capaz de llevar adelante una reacción de desnitrificación completa, razón por la cual los nitritos (NO_2^-) son acumulados en el medio de cultivo. Algunas especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, son capaces de desnitrificar transformando el nitrato en nitrógeno molecular, mientras que otras como *P. putida* KT2440 y *P. fluorescens* CHAO-1 presentan fenotipos similares a *P. extremaustralis*.

En la etapa final de esta Tesis, el Laboratorio obtuvo el genoma completo de esta especie mediante la plataforma genómica del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR), por lo que se pudieron analizar los genes involucrados en los procesos del metabolismo anaeróbico. Es importante destacar que todos estos análisis solo pudieron ser llevados adelante en la fase final de este trabajo. A través del análisis bioinformático se pudieron identificar los genes relacionados con el transporte de nitrato y de regulación de este proceso en el genoma de *P. extremaustralis* (Figura 4) junto con los

genes involucrados en la nitrato reducción (NO_3^- a NO_2^-) el primer paso de desnitrificación. Esta función es realizada por la enzima nitrato reductasa que consta de varias subunidades (Figura 4). Se analizaron también las secuencias aminoacídicas deducidas de las nucleotídicas para determinar la similitud con otras especies del género tanto para los genes de transporte de nitrato y reguladores (Tabla 2) así como los genes de la enzima nitrato reductasa. Los resultados muestran que para el primer grupo de genes las especies con mayor similitud aminoacídica son las especies de *Pseudomonas* del grupo de las llamadas fluorescentes. Sin embargo, es interesante destacar que en el caso del gen *narK*, el cual se encuentra duplicado (Figura 4), existe una alta similitud con especies de otros géneros como *Desulfurospirillum* o *Burkholderia*, la cual resultó más cercana aún que *P. aeruginosa*.

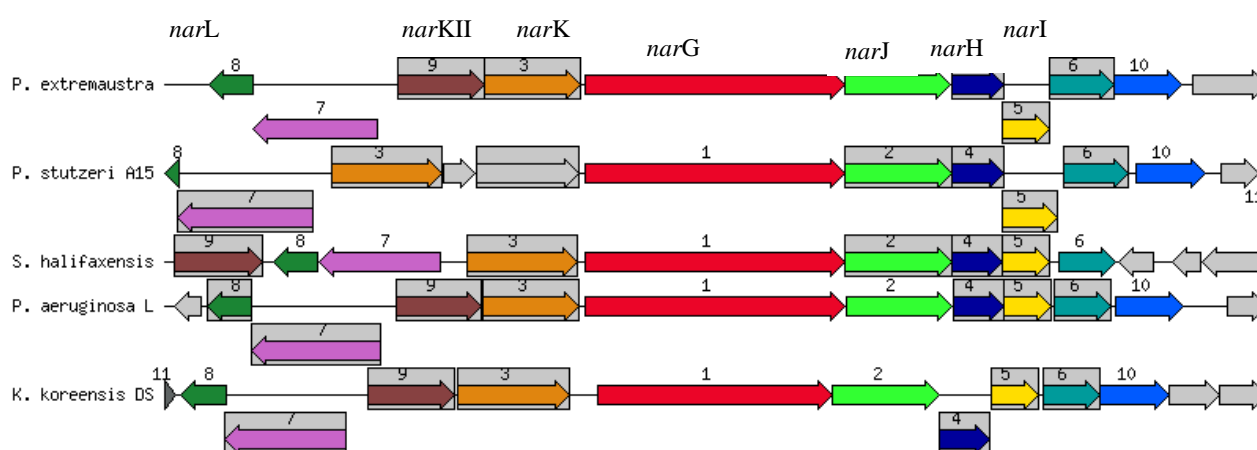


Figura 4: Región genómica de *P. extremaustralis* donde se encuentran los genes relacionados con la utilización del nitrato, incluyendo las subunidades del complejo enzimático nitrato reductasa. Se muestra el nombre de los genes en la zona superior. Además se muestra la comparación con cuatro organismos realizados con el programa Seedviewer. Los genes homólogos se indican con igual número y color.

Tabla 2: Análisis bioinformático de los productos de los genes relacionados con la utilización del nitrato en *P. extremaustralis*. Para el análisis se empleó tanto el programa BLAST como el ClustalW. El número de acceso en la base de datos se muestra para cada especie. El número de aminoácidos en *P. extremaustralis* se muestra entre paréntesis en la primera columna.

Proteína	Especie	Gen	N de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	N de acceso
NarL (215) Sensor de nitrato. Familia LuxR	<i>P.fluorescens</i>	<i>narL</i>	215	93,0	99,5	ZP_07776027.1
	WH6					
	<i>P.fluorescens</i>	<i>narL</i>	215	83,7	96,7	AF197465_1
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>narL</i>	219	57,1	81,4	NP_252568.1
	PAO1					
	<i>P.stutzeri</i>	<i>narL</i>	102	52,6	77,7	YP_001171430.1
	A1501					
NarK (418) Transportador de nitrato	<i>P.fluorescens</i>	<i>narK</i>	425	93,8	95,9	ZP_07776025.1
	WH6					
	<i>Burkholderia</i>	<i>narK</i>	426	62,9	86,8	YP_442387.1
	<i>thailandensis</i>					
	E264					
	<i>Methylibium</i>	<i>narK</i>	436	62,4	84,9	YP_001020906.1
	<i>petroleiphilum</i>					
PM1 157						
<i>Acidovorax</i> sp.	<i>narK</i>	435	61,1	84,9	YP_984761.1	
	JS42					
<i>P.aeruginosa</i>	<i>narK</i>	418	51,2	81,3	NP_252566.1	
PAO-1						
NarKIII(465)^(*) Transportador de nitrato	<i>P.fluorescens</i>	<i>narK</i>	465	99,4	97,2	ZP_07776024.1
	WH6					
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>narK</i>	468	70,8	90,9	NP_252565.1
	PAO1					
	<i>Desulfurispirillum</i>	<i>narK</i>	466	69,0	92,0	YP_004113709.1
	<i>um indicum</i> S5					
<i>Chromobacterium</i>	<i>narK</i>	459	62,2	90,1	NP_902214.1	
<i>um violaceum</i>						
ATCC 12472						
<i>Psychrobacter</i>	<i>narK</i>	459	61,0	89,5	YP_263898.1	
<i>arcticus</i>						

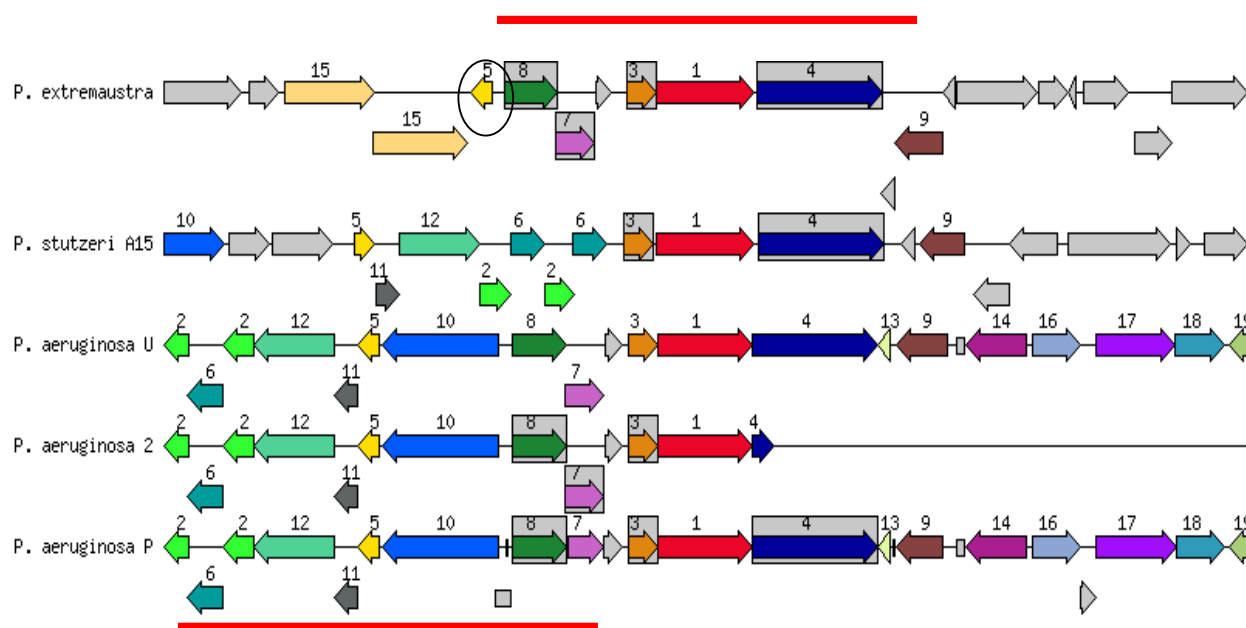
Tabla 3: Análisis bioinformático de productos génicos pertenecientes a las distintas subunidades de enzima nitrato reductasa (NAR) en *P. extremaustralis*. Para el análisis se empleó tanto el programa BLAST como el ClustalW. . El número de aminoácidos en *P.extremaustralis* se muestra entre paréntesis en la primera columna.

Proteína	Especie	Gen	N de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Nº de acceso
NarG (1257) Cadena alfa	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>narG</i>	1257	98,8	99,8	ZP_07776023.1
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>narG</i>	1252	86,7	95,8	YP_001171435.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>narG</i>	1257	77,4	92,0	NP_252564.1
	<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4	<i>narG</i>	1254	77,1	92,9	YP_001672412.1
NarH (512) Cadena beta	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>narH</i>	512	99,1	100	ZP_07776022.1
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>narH</i>	512	89,5	98,2	YP_001171436.1
	<i>Psychrobacter</i> sp. Prwf	<i>narH</i>	464	77,9	86,7	YP_001279571.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>narH</i>	561	86,7	95,7	
NarJ (251) Cadena delta	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>narJ</i>	251	96,8	99,5	ZP_07776021
	<i>P. stutzri</i> A1501	<i>narJ</i>	251	73,7	89,2	YP_001171437
	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	<i>narJ</i>	287	50,6	79,3	YP_001279572
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>narJ</i>	247	47,8	73,3	NP_252562.1
NarI (226) Cadena gama	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>narI</i>	225	95,8	98,6	ZP_07776020.1
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>narI</i>	263	76,9	95,8	YP_001171438.1
	<i>Psychrobacter arcticus</i> 237-4	<i>narI</i>	246	56,1	81,0	YP_263902.1
	<i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3	<i>narI</i>	226	53,7	90,7	YP_001473694.1

Las secuencias proteicas de las subunidades de la enzima nitrato reductasa (deducidas de la secuencia genómica) se encuentran relacionadas con otras especies de *Pseudomonas*, especialmente con el grupo de las fluorescentes (Tabla 3). Se encontraron todas las subunidades necesarias para la formación de la enzima tal como se describió en la sección introductoria de este trabajo, esto respalda los resultados obtenidos en el laboratorio que muestran que *P. extremaustralis* es capaz de reducir el del NO_3^- a NO_2^- .

Con respecto a las proteínas que componen la enzima nitrito reductasa que cataliza la reacción de reducción de NO_2^- a NO , sólo se halló la denominada *nirM* o citocromo c551 (Figura 5). La búsqueda involucró la aplicación de herramientas de comparación del genoma entero (disponibles en el servidor Seedviewer), utilizando a *P. aeruginosa* como genoma modelo. En base a esto, se logró determinar que las proteínas NirS, NirF, NirJ, NirG, NirL, NirN, NirH, todas involucradas en la reducción del nitrito, no están presentes en el genoma de *P. extremaustralis*. Estos resultados son concordantes con la alta acumulación de nitrito que se observa en el medio de cultivo cuando *P. extremaustralis* es cultivada a bajas tensiones de oxígeno en presencia de nitrato. En la zona en que se ubican los genes de reducción del nitrito (en aquellas especies de *Pseudomonas* en las que se encuentra presente esta batería de genes) también se encuentran los genes de necesarios para reducir el óxido nítrico (NO) generado por la reducción del nitrito, y los genes involucrados en la reducción del óxido nitroso (N_2O) y de este a N_2 (Figura 5). Estos genes se encuentran presentes en *P. extremaustralis* (Figura 5) y la mayor similitud fue hallada con proteínas pertenecientes a la cepa WH6 de *P. fluorescens*. (Tabla 4 y Tabla 5).

Genes de utilización del NO



Genes de la enzima nitrito reductasa
(No presentes en *P. extremaustralis*)

Figura 5: Región genómica de *P. extremaustralis* donde se encuentran los genes relacionados con la utilización del óxido nítrico (NO). Las zonas de interés se muestran en rojo. Con un círculo se marca el único gen involucrado en la reducción de nitrito presente en *P. extremaustralis*. Además se muestra la comparación con cuatro organismos realizados con el programa Seedviewer, donde se observaron genes relacionados con la nitrito reductasa que no están presentes en *P. extremaustralis*.

Tabla 4: Análisis bioinformático de las proteínas pertenecientes a la reducción de óxido nítrico a óxido nítrico en *P. extremaustralis*. Para el análisis se empleó tanto el programa BLAST como el ClustalW. El número de acceso en la base de datos se muestra para cada especie. . El número de aminoácidos en *P. extremaustralis* se muestra entre paréntesis en la primera columna.

Proteína	Especie	Gen	N de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	N de acceso
NorC (146) Subunidad C	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>norC</i>	146	96,6	100	ZP_07776042.1
	<i>P. brassicacearum</i> <i>subsp. brassicacearum</i> NFM421	<i>norC</i>	146	89,4	97,9	YP_004354481.1
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>norC</i>	146	85,6	97,9	YP_001173992.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>norC</i>	146	79,5	94,5	NP_249214.1
	<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	<i>norC</i>	146	78,1	95,2	YP_001632666.1
NorB (473) Subunidad B	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>norB</i>	473	94,7	98,5	ZP_07776041.1
	<i>P. brassicacearum</i> <i>subsp. brassicacearum</i> NFM421	<i>norB</i>	475	89,9	96,4	YP_004354480.1
	<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	<i>norB</i>	473	80,1	93,2	YP_001632665.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>norB</i>	466	76,9	92,6	NP_249215.1
NorD (614) proteína de activación	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>norD</i>	613	87,6	96,9	ZP_07776040.1
	<i>P. brassicacearum</i>	<i>norD</i>	612	76,7	93,3	YP_004354479.1

<i>subsp. brassicacearum</i>						
NFM421						
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>norD</i>	613	91,2	70,0	YP_001173990.1
	<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	<i>norD</i>	610	70,0	88,2	YP_001632664.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>norD</i>	612	59,4	84,0	NP_249216.1
NorE (190) Proteína de activación	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>norE</i>	190	82,6	91,1	ZP_07776044.1
	<i>P. brassicacearum subsp. brassicacearum</i> NFM421	<i>norE</i>	194	69,6	86,8	YP_004354483.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>norE</i>	175	92,1	79,5	NP_249212.1
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>norE</i>	175	63,7	83,2	YP_001174004.1
NorQ (258) Proteína de activación	<i>P. brassicacearum subsp. brassicacearum</i> NFM421	<i>norQ</i>	267	87,2	97,7	YP_004354484.1
	<i>P. fluorescens</i> WH6	<i>norQ</i>	258	87,2	97,7	ZP_07776045.1
	<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804P.	<i>norQ</i>	270	77,4	91,9	NP_252085.1
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>norQ</i>	235	81,0	90,3	YP_001174003.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>norQ</i>	260	75,4	93,5	NP_249211.1

Tabla 5: Análisis bioinformático de las proteínas pertenecientes a la reducción del óxido nítrico a nitrógeno molecular en *P. extremaustralis*. Para el análisis se empleó tanto el programa BLAST como el ClustalW. El número de acceso en la base de datos se muestra para cada especie.

Proteína	Especie	Gen	N de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	N de acceso
NosR (633) Óxido nítrico reductasa	<i>P. brassicacearum</i>	<i>nosR</i>	639	85,6	95,5	YP_004353940.1
	<i>subsp. brassicacearum</i> NFM421					

(NOS)						
	<i>P.fluorescens</i>	<i>nosR</i>	613	85,6	95,5	AF056319_2
	<i>P.stutzeri</i> A1501	<i>nosR</i>	102	52,6	77,7	YP_001174020.1
	<i>P.aeruginosa</i> PAO1	<i>nosR</i>	636	79,9	94,0	NP_252082.1
NosR (696)	<i>P. brassicacearum</i>	<i>nosR</i>	716	74,7	87,8	YP_004353939.1
Proteína de maduración	<i>subsp. brassicacearum</i> NFM421					
	<i>P.stutzeri</i> A1501	<i>nosR</i>	725	70,1	86,1	YP_001174021.1
	<i>P.aeruginosa</i> PAO1	<i>nosR</i>	725	68,2	85,3	NP_252081.1
NosD (400)	<i>P. brassicacearum</i>	<i>nosD</i>	439	88,4	98,1	YP_004353941.1
Proteína de maduración	<i>subsp. brassicacearum</i> NFM421					
	<i>P.stutzeri</i> A1501	<i>nosD</i>	396	70,0	89,5	YP_001174019.1
	<i>P.aeruginosa</i> PAO1	<i>nosD</i>	466	62,4	81,1	NP_252083.1
NosF (308)	<i>P. brassicacearum</i>	<i>nosF</i>	305	77,9	91,9	YP_004353942.1
ATPasa	<i>subsp. brassicacearum</i> NFM421					
Proteína de maduración						
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>nosF</i>	304	59,7	83,4	NP_252084.1
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>nosF</i>	307	29,7	67,3	YP_001173188.1
NosY (276)	<i>P. brassicacearum</i>	<i>nosY</i>	276	82,2	95,6	YP_004353943.1
Proteína de maduración	<i>subsp. brassicacearum</i> NFM421					
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>nosY</i>	275	71,0	92,0	NP_252085.1
NosL (171)	<i>P. brassicacearum</i>	<i>nosL</i>	175	63,4	86,3	YP_004353944.1
Proteína de Maduración	<i>subsp. brassicacearum</i> NFM421					
	<i>P. stutzeri</i> A1501	<i>nosL</i>	190	58,9	76,8	YP_001174016.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>nosL</i>	178	50,6	79,2	NP_252086.1

Fermentación del aminoácido L-arginina en *P. extremaustralis*

La utilización del aminoácido L-arginina en ausencia de otros aceptores de electrones se comprobó inicialmente analizando la capacidad de crecimiento de *P. extremaustralis* en condiciones microaeróbicas. Se utilizaron distintas concentraciones del aminoácido en botellas herméticamente cerradas. Luego de la incubación se realizó un recuento de células viables. Los resultados mostraron un mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) en presencia de arginina respecto al control (Figura 6). Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos y no significativas entre las concentraciones del aminoácido ($p > 0.05$). Se eligió entonces para los siguientes experimentos la concentración de 30mM. Se midió la actividad de la enzima arginina deiminasa. Esta enzima es clave en el camino de la utilización del aminoácido L-arginina (Figura 6I). Se realizaron cultivos microaeróbicos de *P. extremaustralis* y de *P. aeruginosa*, que fue utilizada como control. Se determinó la citrulina presente en estos cultivos, y se observó que *P. extremaustralis* presentó niveles de actividad enzimática que aumenta al disminuir la tensión de oxígeno y a tiempos de cultivo más largos (Figura 7). En comparación a *P. aeruginosa* la actividad arginina deiminasa fue menor. Sin embargo, dicha actividad fue mayor en presencia del aminoácido, en concordancia con datos previos que señalan que el operón *arcDABC* se activa no solo por la disminución de oxígeno (a través de Anr) sino también por la presencia del sustrato (a través de ArgR) (Mercernier et al., 1980; Lu et al., 1999).

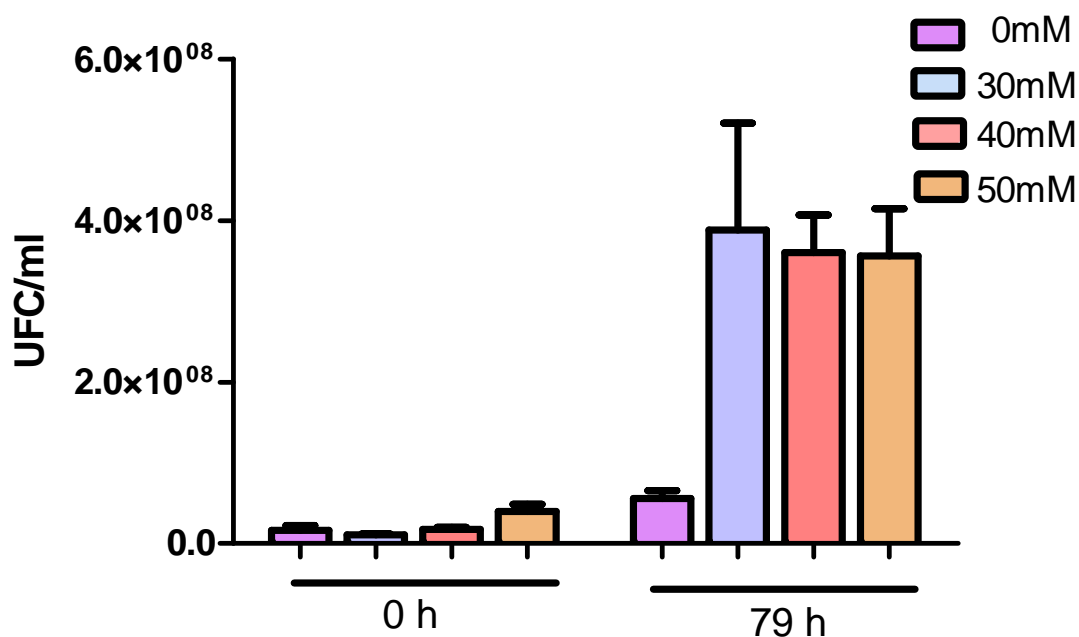
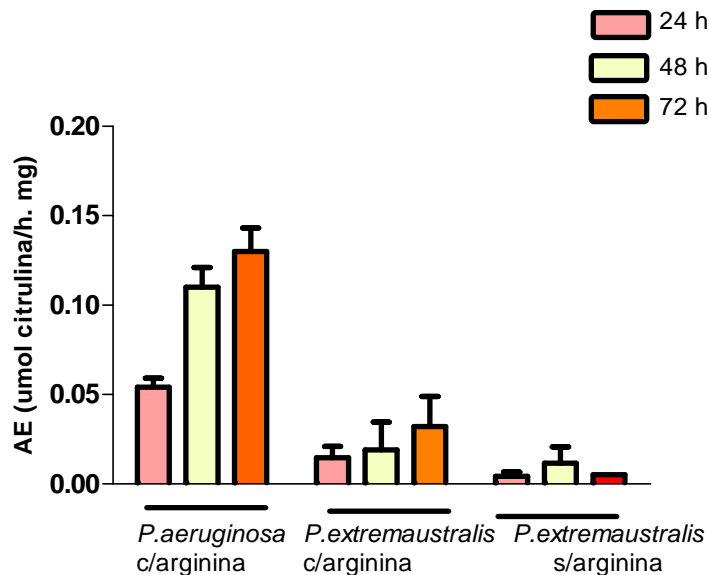


Figura 6: Recuento de bacterias (unidades formadoras de colonias por ml) en cultivos microaeróbicos empleando distintas concentraciones de L-arginina.

A.



B.

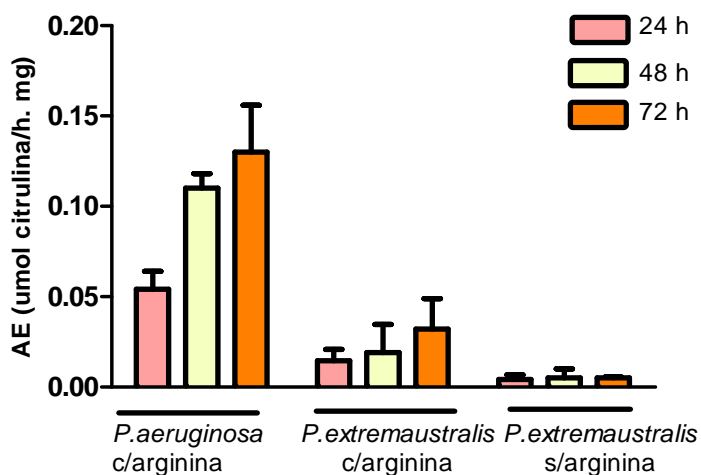


Figura 7. Actividad de Arginina deiminasa en botellas herméticas. **A.** Microaerobiosis moderada (relación volumen de medio de cultivo/volumen de la botella = 1/2) **B.** Microaerobiosis severa (relación volumen de medio de cultivo/volumen de la botella = 1/1). Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Los resultados obtenidos demuestran que *P. extremaustralis* es capaz de utilizar el camino de la arginina deiminasa, esto se comprobó además mediante el análisis bioinformático de la secuencia del genoma completo de esta especie. En la Tabla 6, se comparan los genes que componen el operon *arcDABC* con otras especies del género *Pseudomonas*. Esta comparación mostró que las secuencias

proteicas poseen altos porcentajes de identidad y similitud con las proteínas correspondientes a otras especies del género. También se pudo establecer que los genes poseen el orden esperado según lo señalado en la literatura (Luthi et al., 1986). Es interesante destacar que el gen *arcD*, que es controlado por Anr, se encuentra triplicado en el genoma de *P. extremaustralis*. El alineamiento de las tres secuencias de *arcD* halladas en el genoma mostró que dos de ellas, la que se ubica en el operon *arcDABC* y una ubicada río abajo de este (Figura 8) poseen secuencias aminoácidas que resultan idénticas entre sí. Sin embargo, la tercer secuencia se ubica en una región perteneciente a una isla genómica descrita anteriormente en el laboratorio (Ayub et al., 2007) y no resulta idéntica a las secuencias que pertenecen al operon *arcDABC*. Los resultados encontrados concuerdan con aquellos descritos en el laboratorio acerca de la similitud de la isla genómica de *P. extremaustralis* con *P. stutzeri* A1501 (Tabla 7). En resumen, los resultados del análisis informático de los genes relacionados con la utilización del aminoácido L-arginina muestran que *P. extremaustralis* posee toda la batería génica necesaria para llevar adelante estas reacciones metabólicas, y los resultados de mediciones enzimáticas y crecimiento lo apoyan.

Tabla 6: Comparación de los genes del operon *arginina deiminasa (arc)* de *P. extremaustralis* con otras especies del género *Pseudomonas*. El gen *arcA* corresponde a la enzima arginina deiminasa, *arcB* carbamato kinasa, *arcC* ornitina carbamoiltransferasa y *arcD* a la proteína transportadora arginina/ornitina

	Especie	Gen	N de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Nº de acceso
ArcA (418) Arginina deiminasa	<i>P.fluorescens</i> pf-5	<i>arcA</i>	418	95,7	100	YP_261719.1
	<i>P.fluorescens</i> SBW25	<i>arcA</i>	418	92,3	99,0	YP_002874397.1
	<i>P. syringae</i> pv. Syringae b728a	<i>arcA</i>	418	87,1	98,6	YP_235761.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>arcA</i>	418	82,5	96,4	NP_253858.1
	<i>P. putida</i> KT2440	<i>arcA</i>	418	80,4	95,7	NP_743162.1
	<i>P. stutzeri</i> FA015	<i>arcA</i>	418	80,1	94,5	YP_001174443.1
ArcB (309) Ornitol carbamoil tranferasa	<i>P.fluorescens</i> SBW25P.	<i>arcB</i>	309	95,5	99,4	YP_002874399.1
	<i>P.fluorescens</i> pf-5	<i>arcB</i>	309	93,9	98,4	YP_261721.1
	<i>P. syringae</i> pv. Syringae b728a	<i>arcB</i>	309	86,1	98,0	YP_235763.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>arcB</i>	310	80,9	95,8	NP_253860.1
	<i>P. stutzeri</i> FA015	<i>arcB</i>	209	62,7	84,7	YP_001174445.1
ArcC (336) Carbamato quinasa	<i>P. fluorescens</i> SBW25	<i>arcC</i>	336	97,9	99,7	YP_002874398.1
	<i>P. syringae</i> pv. Syringae B728a	<i>arcC</i>	336	94,3	97,3	YP_235762.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>arcC</i>	336	86,6	96,7	NP_253859.1
	<i>P. putida</i> KT2440	<i>arcC</i>	336	84,8	97,0	NP_743161.1
	<i>P.fluorescens</i> pf-5	<i>arcC</i>	336	84,8	96,1	YP_261720.1

	<i>P. stutzeri</i> FA015	<i>arcC</i>	336	83,6	96,4	YP_001171223.1
ArcD (477)	<i>P. fluorescens</i> pf-5	<i>arcD</i>	475	93,9	99,1	YP_261718.1
Transportador	<i>P. putida</i> KT2440	<i>arcD</i>	477	90,8	98,9	NP_743163.1
	<i>P. fluorescens</i> SBW25	<i>arcD</i>	486	93,5	96,9	YP_002874396.1
	<i>P. syringae</i> pv. syringae B728a	<i>arcD</i>	475	87,1	98,7	YP_235760.1
	<i>P. stutzeri</i> FA015	<i>arcD</i>	475	77,4	96,2	YP_001174442.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>arcD</i>	475	83,0	95,6	NP_253857.1

Tabla 7: Comparación de la secuencia aminoacídica codificada por el gen *arcD* que se encuentra ubicado en una isla de adaptabilidad y de otra copia del mismo ubicada en el sentido contrario al operon *arc*.

	Especie	N de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	N de acceso
ArcD (475)	<i>P. stutzeri</i> A015	475	99,8	100	YP_001171225.1
	<i>P. fluorescens</i> SBW25	486	79,4	93,7	YP_002874396.1
	<i>P. putida</i> KT2440	475	79,1	93,7	NP_743163.1
ArcD (478)	<i>P. fluorescens</i> pf-5	475	78,3	98,5	YP_261718.1
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae B728a	475	78,3	95,4	YP_235760.1
	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	482	76,2	95,6	NP_253857.1

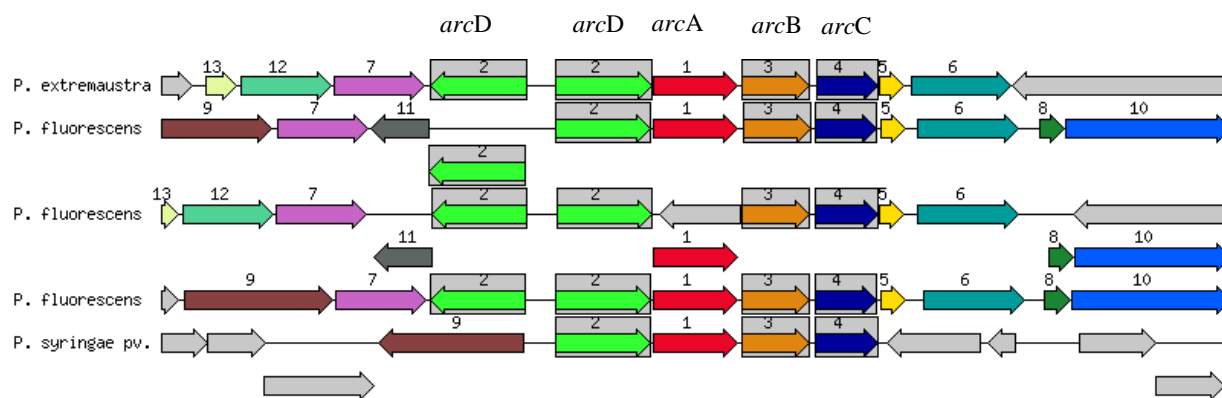


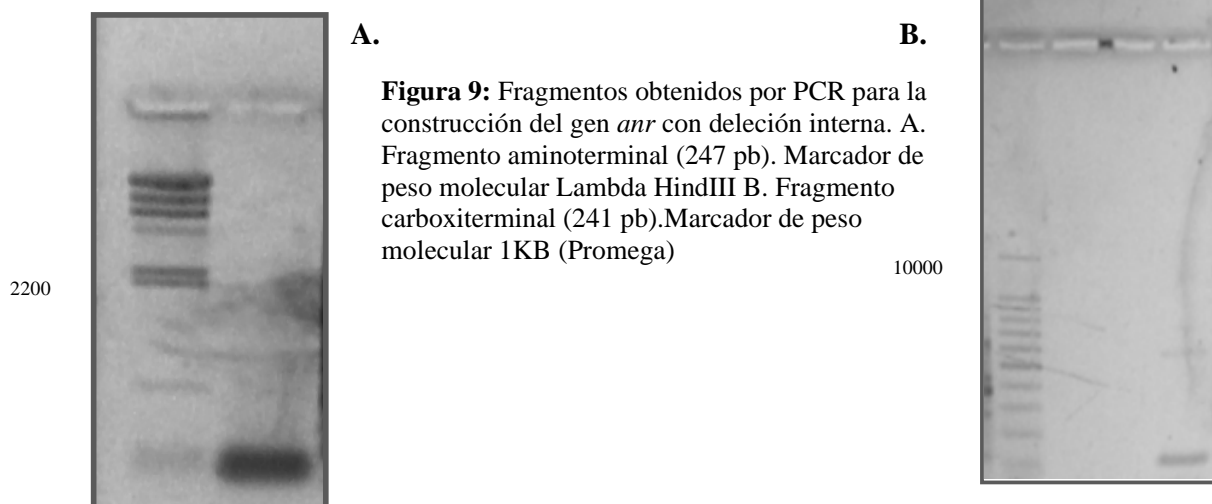
Figura 8: Región genómica de *P. extremaustralis* donde se encuentra el operon *arcDABC*. Se muestra la comparación con cuatro organismos realizados con el programa Seedviewer.

CAPITULO 2: Influencia de *anr* sobre la producción de PHB

- i) Construcción de una mutante *anr*
- ii) Cultivos controlados en Biorreactor
- iii) Producción de PHB
- iv) Expresión de los genes PHB

i) Construcción de *P. extremaustralis anr*

Para estudiar el papel del regulador Anr en distintas respuestas fisiológicas, en especial sobre la producción de PHB, se construyó una mutante del mismo. Se empleó para esto la técnica de delección por PCR que se realiza en tres etapas. En una primera reacción se amplificó un fragmento (de 247 pb) río arriba de la secuencia a deleccionar mientras que en una segunda reacción de PCR un fragmento de 241 pb perteneciente a la región río abajo de la región a deleccionar (Figura 9). Dichos fragmentos fueron usados en la etapa final para amplificar un solo fragmento de 850 pb, utilizando *primers* externos. Se obtuvo entonces una secuencia de *anr* que posee una delección de 250 pb (Figura MyM 2). Este fragmento fue interrumpido por la inserción de un casete de Km, posteriormente clonado en el plásmido pGEMT-easy (suicida en *Pseudomonas*) e introducido mediante transformación en *P. extremaustralis*. Para verificar la presencia de la mutación deseada, se analizó la producción de nitritos de las cepas transformantes, cultivando los clones candidatos en microaerobiosis en presencia de nitratos. Se seleccionó un clon en el cual la producción de nitritos fue negativa (Figura 10). Se comprobó también la pérdida del plásmido, observando que la cepa no fuera capaz de crecer en presencia de ampicilina. Por último, se realizó una verificación a través de técnicas de PCR, utilizando combinaciones de *primers* correspondientes a la región del gen *anr* ubicada por fuera de la construcción incluida en el plasmido y al *cassete* de Km y se confirmó la presencia del gen interrumpido por el antibiótico a través de la secuenciación del fragmento de amplificación. Es importante destacar que el gen *anr* contiene un terminador de la transcripción fuerte, esto provocaría que no existan efectos de tipo polares en los genes que se encuentran río abajo.



Caracterización inicial de una cepa *anr* de *P. extremaustralis*

Para la caracterización inicial del crecimiento de la cepa mutante se emplearon botellas herméticamente cerradas con una relación 1:1 y 1:2 de volumen de medio respecto al volumen total del recipiente. Se observó que en el medio 0.5NE₂, en el cual normalmente crece la cepa *P. extremaustralis* y acumula PHB, la cepa mutante no era capaz de crecer en microaerobiosis, tal como se esperaba, pero tampoco en aerobiosis. Para solucionar este inconveniente se probaron diferentes compuestos que fueron adicionados al medio de cultivo. En base a estos experimentos preliminares se pudo determinar que la mutante era capaz de crecer en medio 0.5NE₂ suplementado con casaminoácidos, por lo que se utilizó este medio para estudiar algunos de los fenotipos regulados por *anr* en la cepa mutante. El clon mutante elegido (cepa *anr*), fue incapaz de generar nitritos a partir de nitratos, mientras que la cepa salvaje en las mismas condiciones presenta una acumulación de $248,8 \pm 3$ mg/l, luego de 24 horas de cultivo (Figura 10). Además se estudió su capacidad de emplear L-arginina para la obtención de energía. Se realizaron cultivos en botellas herméticamente cerradas con una relación 1:2 de volumen de medio de cultivo respecto al volumen total de la botella. La cepa salvaje mostró un crecimiento leve desde $1,7 \cdot 10^7$ ufc/ml al tiempo inicial hasta $2,3 \cdot 10^7$ ufc/ml luego de 72 h de cultivo. Tal como ha sido señalado, la fermentación de la arginina es una estrategia de mantenimiento más que de crecimiento celular. Esto resulta evidente al comparar el comportamiento de la cepa salvaje en cultivos idénticos sin el agregado de arginina en los cuales se verificó una disminución de un orden de magnitud en el número de células con respecto al número inicial. En cambio la mutante *anr*, tal como se esperaba, no mostró crecimiento, y tampoco un mantenimiento de la biomasa inicial en presencia de arginina.

Si bien se intentaron diversos métodos de complementación de la mutación en *anr*, éstos no fueron exitosos. Las estrategias involucraron la utilización de plásmidos de expresión de bajo número de copias, transposición al azar en el genoma, entre otras, pero ninguna estrategia arrojó un resultado positivo. Si bien la mayoría de las mutaciones pueden complementarse, en el caso de los reguladores globales existen antecedentes de este tipo de dificultades. La expresión de las proteínas Fnr y Anr, en cepas de *E.coli*, requiere el empleo de una doble mutante $\Delta fnr \Delta crp$ (a.Lazzazera et al., 1993). Por otro lado, la expresión del gen en la cepa salvaje de *P.extremaustralis*, (en un plasmido de mediano número de copias) produjo severos defectos en distintos fenotipos, uno de los más curiosos fue la incapacidad de esta cepa de generar nitritos (Ibarra, 2011), por otro lado en el caso de *P.putida* KT2440 se analiza en un trabajo la actividad y contenido de citocromos en mutantes *anr*, las cuales tampoco pudieron ser complementadas (Ugidos et al., 2008) mostrando la dificultad para complementar este tipo de mutaciones.



Figura 10: Observación de la presencia de nitritos. De derecha a izquierda: salvaje, clon 1 (*anr* +) y clon 2 (*anr* -).

ii) Cultivos controlados en Biorreactor

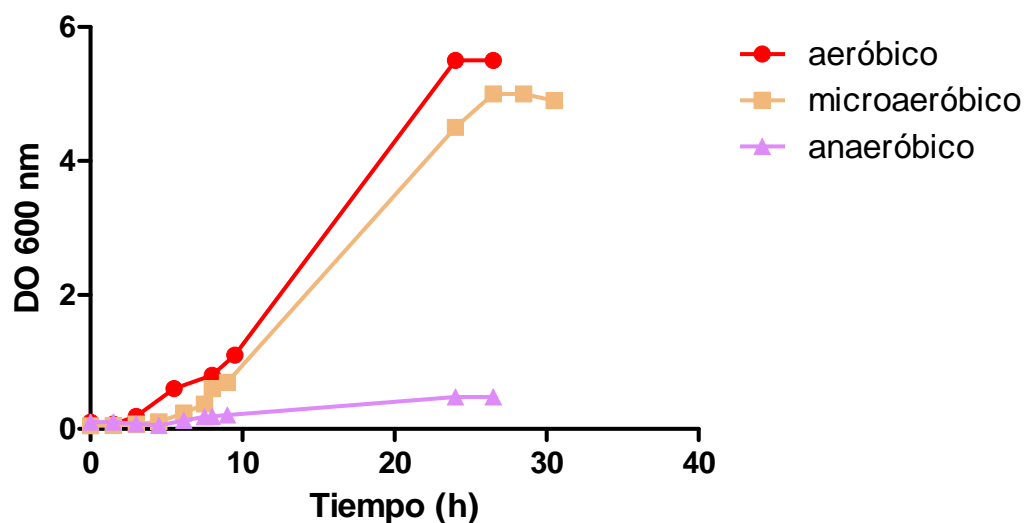
Crecimiento de *P.extremaustralis* y de su mutante *anr* en biorreactor

Para lograr condiciones de microaerobiosis en los estudios descritos anteriormente se emplearon botellas con cierre hermético, prácticamente llenas con medio de cultivo y baja agitación, de manera de lograr que la disponibilidad de oxígeno sea mucho menor que la de los cultivos realizados en Erlenmeyer con alta agitación. Sin embargo, en estas condiciones no es posible mantener la tensión de oxígeno en un valor deseado, ya sea alta o baja. Se utilizó entonces la tecnología de cultivos en biorreactor que permite el control de diferentes parámetros relevantes, en este caso del oxígeno. Se realizaron cultivos aeróbicos, microaeróbicos y anaeróbicos en los que las células bacterianas se exponen desde la inoculación al nivel de oxígeno prefijado, que es mantenido a lo largo del experimento.

En la Figura 11 se muestran las curvas de crecimiento correspondientes a la cepa salvaje utilizando el medio de acumulación de PHB. En condiciones aeróbicas se obtuvo una tasa de crecimiento de $\mu = 0,61 \text{ h}^{-1}$, llegando a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 5,5 luego de 30 horas de cultivo, mientras que en condiciones microaeróbicas se obtuvo una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 5 con un valor de velocidad de crecimiento de $\mu = 0,50 \text{ h}^{-1}$. En anaerobiosis total la biomasa fue baja alcanzándose una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 presentando una tasa de crecimiento de solo $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ (Figura 11.A).

La cepa mutante solo fue capaz de crecer en aerobiosis alcanzando una muy baja $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (0,6) al final de experimento. Este valor fue 9 veces más bajo en comparación con la cepa salvaje (Figura 11 B.)

A.



B.

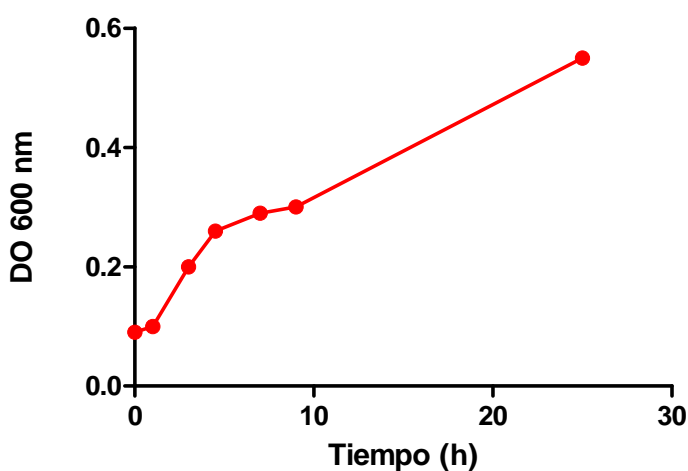


Figura 11: Crecimiento en biorreactor utilizando el medio 0.5NE₂ suplementado con caprilato de sodio **A.** *P. extremaustralis* salvaje **B.** *P. extremaustralis anr* mutante.

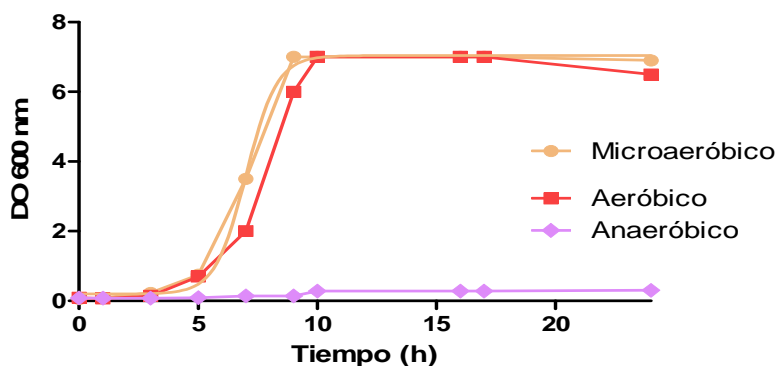
Se realizaron nuevamente los cultivos en biorreactor en las mismas condiciones de aireación pero con el medio 0.5NE₂ suplementado con casaminoácidos. Se observó un incremento en el crecimiento de la cepa mutante, aunque tal como se esperaba fue incapaz de crecer en condiciones completamente anaeróbicas (Figura 12). En este medio de cultivo, *P. extremaustralis* mostró valores levemente superiores en la tasa de crecimiento en microaerobiosis y aerobiosis, $\mu = 0,80$ y $\mu = 0,72 \text{ h}^{-1}$

respectivamente, alcanzando una DO_{600nm} final de 7 (Figura 12 A.) En condiciones de anaerobiosis, la cepa salvaje fue capaz de crecer lentamente alcanzando valores similares a los registrados sin el suplemento de casaminoácidos ($DO_{600nm} = 0,4$; Figura 12 A.).

Con el agregado de casaminoácidos al medio de cultivo la cepa mutante aumentó su capacidad de crecimiento, particularmente en aerobiosis, donde alcanzó una velocidad de crecimiento de $\mu = 0,32 \text{ h}^{-1}$ y una DO_{600nm} final de 3,5 (Figura 12 B.). En condiciones de microaerobiosis, tal como se esperaba para esta mutante, el crecimiento fue bajo con un valor máximo de 1,35 (DO_{600nm}) luego de 24 h de cultivo (Figura 12B).

En estos cultivos se realizó una medición de nitritos para monitorear la reducción del nitrato en todas las condiciones de oxigenación en ambas cepas. En el caso de la cepa salvaje la producción de nitritos al final del experimento fue de $11 \pm 0,82 \text{ mg/l}$ en microaerobiosis y de $137,8 \pm 20,0 \text{ mg/l}$ en anaerobiosis, en cambio en aerobiosis, tal como se esperaba la cantidad de nitritos fue solamente de $1,78 \pm 0,10 \text{ mg/l}$. En la cepa mutante en cambio, los nitritos detectados en condiciones microaeróbicas y aeróbicas fueron menores a $0,30 \pm 0,01 \text{ mg/l}$ solo de $0,28 \pm 0,01$ y $0,1 \text{ mg/l}$, respectivamente.

A.



B.

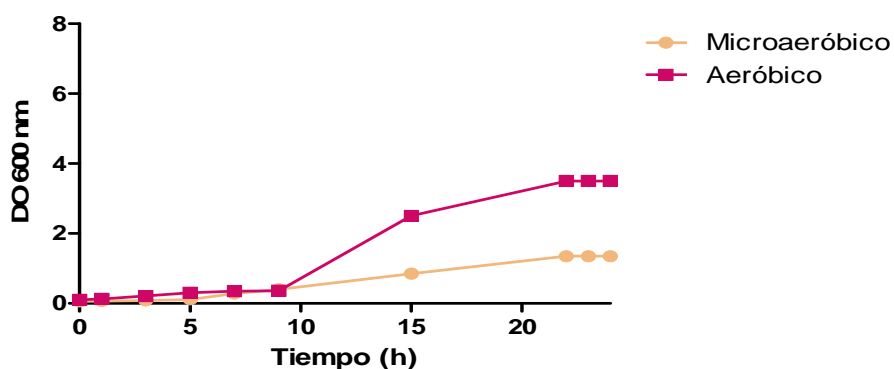


Figura 12: Curvas de crecimiento en biorreactor en medio de cultivo con casaminoácidos. **A:** Cepa salvaje. **B.** cepa *anr*.

iii) Efecto de la mutación de *anr* sobre la acumulación de PHB

Para estudiar el efecto de la mutación de *anr* sobre la producción de PHB se determinó el contenido del polímero en las distintas condiciones de aireación en medio de cultivo sin el agregado de casaminoácidos. El contenido de PHB fue analizado cualitativamente mediante observación microscópica luego de la tinción con Azul de Nilo (Figura 13) y cuantitativamente por cromatografía gaseosa (Tabla 8). Los valores más altos de acumulación se observaron en condiciones de aireación media como lo es la microaerobiosis (37,84%). Es muy interesante destacar que la acumulación del

polímero en la cepa salvaje en condiciones aeróbicas se encontró muy disminuida (2,57%). La cepa mutante no fue capaz de acumular PHB en este medio de cultivo.

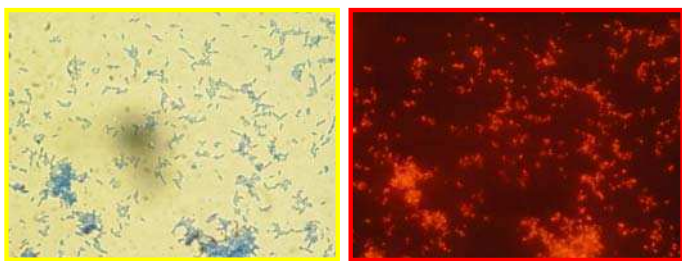


Figura 13: Células de *P. extremaustralis* provenientes de cultivos en biorreactor en condiciones microaeróbicas luego de la tinción con Azul de Nilo. Derecha: células iluminadas con luz blanca. Izquierda, células iluminadas con luz halógena. Aumento 1000X.

En cultivos realizados en las mismas condiciones pero con el agregado de casaminoácidos (Tabla 8), la cepa salvaje mostró la máxima acumulación de PHB a las 24 h de cultivo bajo condiciones de microaerobiosis en biorreactor (51,33%), mientras que en anaerobiosis el porcentaje fue menor 16%. La acumulación en aerobiosis fue sensiblemente menor llegando solo a $7,38 \pm 0,42$ luego de 24 h de cultivo. La cepa mutante presentó una acumulación menor en todas las condiciones de aireación (Tabla 8.A). En la etapa exponencial de crecimiento (6 horas) el contenido del polímero en la cepa salvaje es mayor en condiciones microaeróbicas, llegando al 15%, mientras que en condiciones aeróbicas solo llega al 2,7%, en cambio en la cepa mutante no alcanza al 1% (Tabla 8 B.). Estos resultados son los primeros en sugerir un papel de Anr sobre la síntesis de PHB.

Tabla 8: A. Contenido de PHB (% del peso seco celular) en cultivos de 24 horas en biorreactor.
NC: no hay crecimiento.

Condición	<i>P. extremaustralis</i>		<i>P. extremaustralis anr-</i>	
	Sin CAS	Con CAS	Sin CAS	Con CAS
Aerobica	2,57 ± 0,2	7,38 ± 0,42	0,00 ± 0,3	1,00 ± 0,2
Microaerobica	37,84 ± 0,4	51,33 ± 0,24	NC	21,66 ± 0,82
Anaerobica	18,42 ± 1,8	16,69 ± 0,23	NC	NC

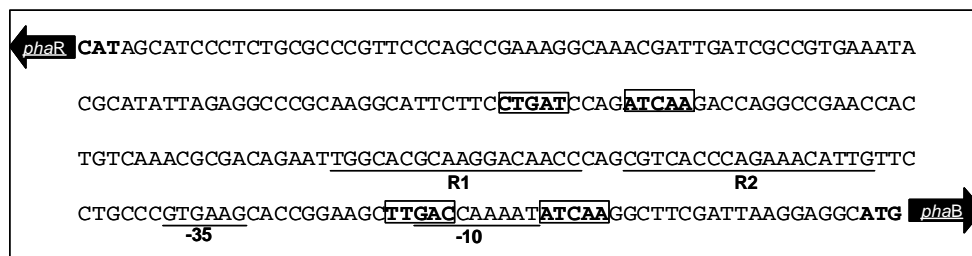
B. Contenido de PHB (% del peso seco celular) en cultivos de 6 horas en Biorreactor.

Condición	<i>P.extremaustralis</i>	<i>P.extremaustralis anr</i>
Aeróbica	2,70±0,31	0,5±0,03
Microaeróbica	15,0±1,50	0,5±0,03

iv) Estudios de la regulación de Anr sobre la síntesis de PHB en *P. extremaustralis*

Los resultados obtenidos en cuanto a la acumulación de PHB en distintas condiciones de aireación y en particular, las diferencias observadas en la cepa *anr* mutante, muestran que Anr podría estar involucrado en la regulación de la síntesis del polímero en *P. extremaustralis* y que el oxígeno es un factor clave en su metabolismo. Trabajos previos del laboratorio, en los que se caracterizaron los genes PHB, señalaron la presencia de un sitio de unión de Anr (Anr box) ubicado en la zona promotora de los genes PHB. En base a esa evidencia preliminar, en este trabajo se analizó en profundidad dicha zona encontrando un segundo Anr-box en otra posición (Figura 14 A.). Las secuencias de los probables Anr-box se compararon con sitios de unión de este regulador localizados río arriba de otros genes en otras *Pseudomonas* y con los encontrados río arriba de genes regulados por CydR (CydR-box) y por Fnr (Fnr-box) en *Azotobacter vinelandii* y *Escherichia coli*, respectivamente (Figura 14 B.). En el caso de CydR el box está relacionado con el cluster de genes PHB. En estas secuencias se observó que las bases, que son importantes para el reconocimiento del box por el regulador, se encuentran conservadas en las secuencias de los Anr-boxes encontrados en la zona promotora de los genes que participan en la biosíntesis de PHB (Figura 14 B.). Por lo tanto, es posible que Anr pueda estar regulando de manera directa dichos genes.

A



B

TTGAC.....ATCAA	ANR-box 1 (<i>phaB</i>) <i>P. extremaustralis</i>
CTGAT.... ATCAA	ANR-box2 (<i>phaB</i>) <i>P. extremaustralis</i>
GTGAC.... ATCGA	CydR-box (<i>phaB</i>) <i>Azotobacter vinelandii</i>
TTGAC.... ATCAG	ANR-box (<i>arcD</i>) <i>P. aeruginosa</i>
TTGAT.... ATCAA	FNR-box (consensus) <i>Escherichia coli</i>

Figura 14. A. Organización de la zona intergénica *phaR-phaB* de *P. extremaustralis* mostrando dos probables Anr-box enmarcados en cuadrados. También se señalan las probables secuencias promotoras –35 y –10 de un posible promotor $\sigma 70$. Además se marcan dos probables sitios de unión del regulador *phaR* como R1 y R2. Los codones de inicio de la traducción de *phaC* y *phaR* se marcan en flechas llenas. **B.** Alineamiento de los Anr-box encontrados con otros sitios de unión de reguladores similares a Fnr de *E. coli*, encontrados en la región promotora de distintos genes.

Debido al hallazgo de los probables sitios de unión al DNA de Anr se realizaron estudios de expresión génica en la cepa salvaje en comparación con la cepa *anr*. Estos análisis se realizaron en condiciones microaeróbicas utilizando botellas herméticamente cerradas. En estas condiciones, la acumulación de PHB en la cepa salvaje alcanzó el 14,7 % mientras que la cepa mutante sólo acumuló un 1,6%. Los valores de producción del polímero fueron menores pero consistentes con los registrados en experimentos en biorreactor. Por lo tanto, los cultivos en botellas fueron utilizados, en primera instancia, para realizar estudios de PCR cuantitativa en tiempo real (Real Time PCR) de los genes *phaR* y *phaC*, utilizando como gen de referencia al gen rRNA 16S. La expresión de los genes analizados se vio altamente disminuida en el contexto *anr* mutante (Figura 15) por lo que la mutación en este gen influiría en la transcripción de los genes PHB.

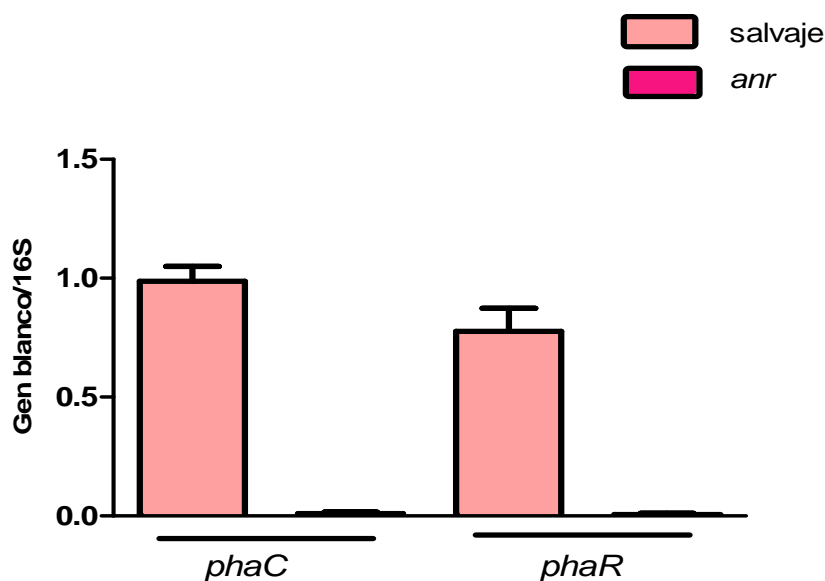


Figura 15: PCR cuantitativa en Tiempo Real de cultivos de 24 horas en botellas herméticamente cerradas. Los valores fueron expresados como el cociente en la expresión de los genes de interés respecto al gen de referencia rRNA 16S. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales fue realizado por triplicado.

Estudios de expresión de los genes PHB en cultivos controlados en biorreactor

Para profundizar el estudio de la influencia de Anr sobre la expresión de los genes de síntesis de PHB, se llevaron adelante nuevos experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real a diferentes tensiones de oxígeno en la cepa salvaje y en su mutante, en fase exponencial (6h) y estacionaria (24 h), para los genes *phaR*, *phaB* y *phaC*. La cantidad de RNA obtenido fue similar tanto en distintas condiciones analizadas como para las distintas cepas (Figura 16).

La expresión de los tres genes en la cepa salvaje fue mayor en condiciones de baja tensión de oxígeno que en aerobiosis (Figura 17.A). El mayor valor se obtuvo a las 24 h llegando a ser 10 veces más alto que su contraparte aeróbica. Este resultado es consistente en el marco de la condición en la que Anr es activo, es decir que en la cepa salvaje la expresión de los genes de síntesis del polímero se encuentran aumentados en microaerobiosis, en la cual tradicionalmente Anr cumple sus funciones de regulador.

Apoyando estas observaciones, en la cepa mutante la expresión de todos los genes estudiados fue claramente menor (Figura 17 B. Notar que la escala en el gráfico es 10 veces menor que la de la cepa salvaje). Si bien la expresión de los genes en la cepa mutante es drásticamente menor, en comparación a la cepa salvaje, la diferencia es aún mayor en condiciones microaeróbicas (Figura 17 B.). Es interesante destacar que el gen *phaC*, que codifica una polimerasa de clase I es el que más diferencias presentó tanto en las distintas tensiones de oxígeno como entre cepas. Estos resultados apoyan fuertemente la influencia de Anr sobre la síntesis de PHB en *P. extremaustralis*, tanto por el contenido del polímero discutido en la sección anterior como por los resultados de la expresión de los genes involucrados en su biosíntesis. En la Figura 18, a modo ilustrativo, se muestra un gel de agarosa donde pueden observarse los productos de amplificación de cada gen estudiado en las distintas cepas.

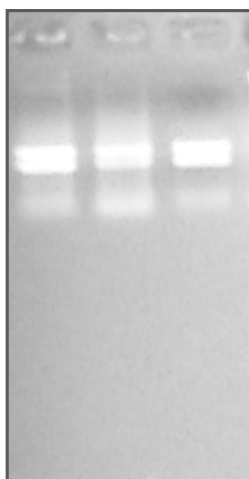
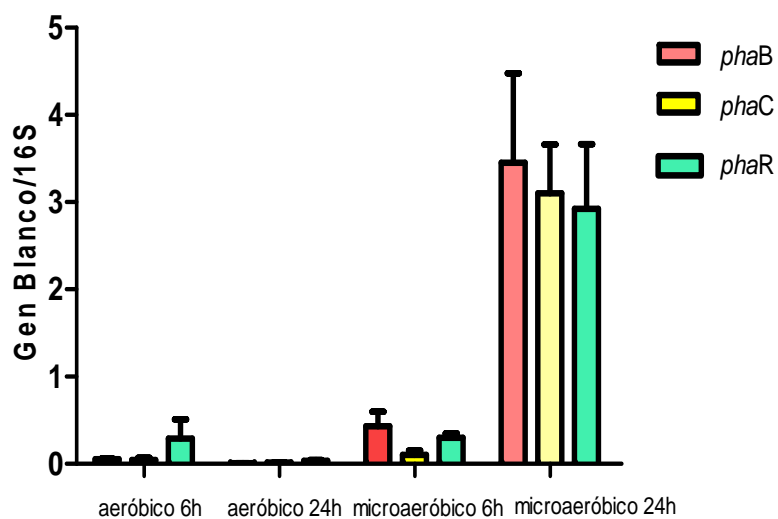


Figura 16: Extracción del RNA procedente de cultivos en fermentador. De derecha a izquierda: cepa salvaje aerobiosis 24h, cepa salvaje microaerobiosis 24 h, *anr*- aerobiosis 24h. Este gel es representativo de varias extracciones realizadas.

A.



B.

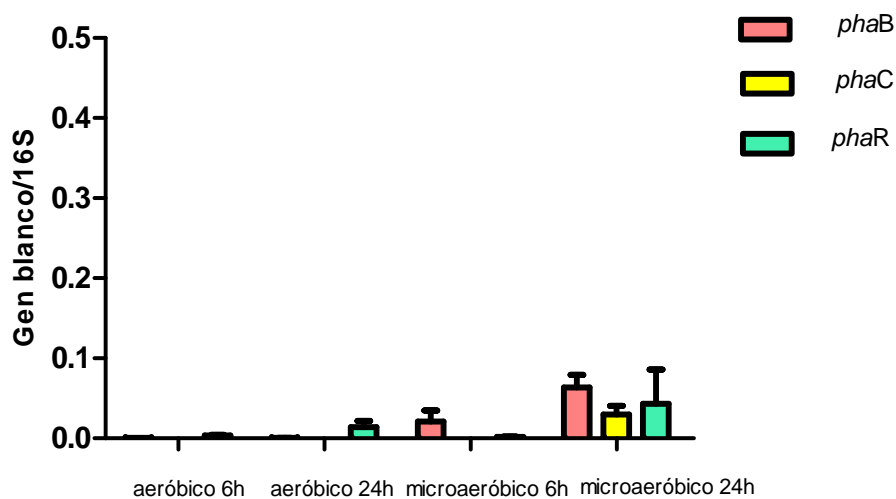


Figura 17: PCR cuantitativa en tiempo Real (Real Time PCR) de cultivos en biorreactor. **A:** *P. extremaustralis* salvaje. **B:** cepa *anr*. Los datos presentados corresponden a tres experimentos independientes.

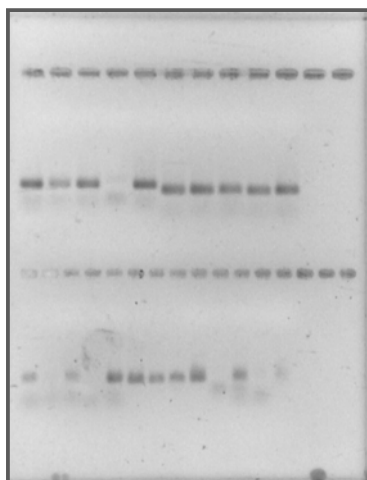


Figura 18: Gel representativo de los productos obtenidos por reacción de PCR en Tiempo Real para cultivos de 24 horas. **Gel superior: *phaB*.** 1 cepa salvaje microaeróbica, 2 cepa *anr* aeróbica, 3 cepa *anr* microaeróbica, 4 blanco de reacción, 5 cepa salvaje aeróbica. **16S:** 6 cepa salvaje microaeróbica, 7 cepa *anr* aeróbica, 8 cepa *anr* microaeróbica, 9 y 10 cepa salvaje aeróbica 11 blanco de reacción. **Gel inferior: *phaC*:** 1 cepa salvaje aeróbica, 2 cepa mutante aeróbica, 3 cepa mutante microaeróbica, 4 blanco de reacción, 5 y 6 salvaje microaeróbica: ***phaR*** 7 cepa salvaje microaeróbica, 8 cepa *anr* microaeróbica, 9 cepa salvaje aeróbica, 10 blanco de reacción, 11 *anr* aeróbica. Si bien no se observa en este grafico se corrieron las muestras junto con un marcador de peso molecular para comprobar el tamaño del producto

Para determinar si las diferencias en la expresión de los genes se debían a la acción directa del regulador es necesario realizar ensayos de unión al DNA. La proteína Anr como ya se ha descrito es activa principalmente en condiciones de baja oxigenación, por lo que su manipulación es realmente muy complicada. Se construyó entonces, una mutante Anr* capaz de dimerizar en condiciones atmosféricas normales y se expresó en una cepa de *E.coli*, apta para la sobreexpresión de proteínas (Ibarra, 2011). Esto fue muy complejo ya que la expresión de esta proteína no resultó suficiente para la purificación (Figura 19). Debido a estas dificultades aún se está trabajando en dilucidar si la acción de *anr* sobre el promotor de PHB es directa o no.

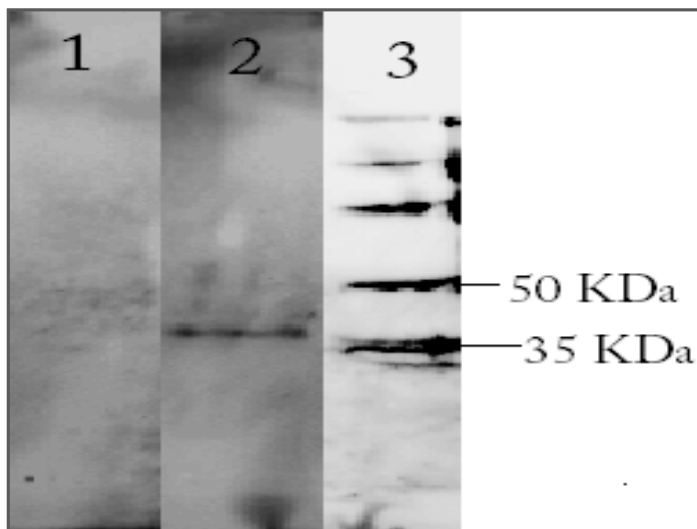


Figura 19: Western Blot empleando un anticuerpo anti-His. Calle 1: extracto de cultivos sin inducción. Calle 2: extracto de cultivos inducidos. Calle 3: marcador de peso molecular.

CAPITULO 3: Influencia de *anr* sobre diversos parámetros celulares en *P. extremaustralis*

Se investigó el efecto del regulador Anr sobre las siguientes características fisiológicas:

- i) Estado redox celular
- ii) Resistencia a estrés oxidativo
- iii) Capacidad de consumo de oxígeno
- iv) Utilización de diversas fuentes de carbono.
- v) Determinación de los aminoácidos claves para el crecimiento.
- vi) Producción de exopolisacáridos.
- vii) Producción de proteínas extracelulares.
- viii) Morfología celular.

i) Estudio del estado redox celular: Determinación del cociente redox

El contenido de dinucleótidos, como indicadores del estado redox celular, de la cepa salvaje y la mutante *anr* se analizó en cultivos realizados bajo distintas tensiones de oxígeno en biorreactor. Se determinó el contenido de NADH, NAD⁺, NADPH y NADP⁺ a lo largo del tiempo.

En la cepa salvaje, el cociente redox (NADH+NADPH/NAD⁺+NADP⁺) aumenta en forma lineal durante las primeras 10 horas de cultivo (Figura 20), manteniéndose luego aproximadamente constante. Esto ocurre tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. Como es esperado, el cociente redox a bajas tensiones de oxígeno es marcadamente mayor que en aerobiosis, ya que la célula normalmente se encuentra más reducida; siendo los valores obtenidos, a las 24 h de cultivo 0,68 y 0,94 para aerobiosis y microaerobiosis, respectivamente (Figura 20).

La mutación en el regulador *anr* tuvo influencia en el cociente redox, que resultó menor que el de la cepa salvaje en todos los tiempos medidos en ambas condiciones (Figura 20), alcanzando valores de 0,41 y 0,51 luego de 24 h de cultivo en aerobiosis y microaerobiosis, respectivamente. Existe un retardo (lag) en el aumento del valor del cociente al compararse con la cepa salvaje, que podría estar relacionado con el retardo en el crecimiento.

Estos resultados constituyen los primeros que analizan el contenido de dinucleótidos en el género *Pseudomonas* y en una mutante *anr* en biorreactor.

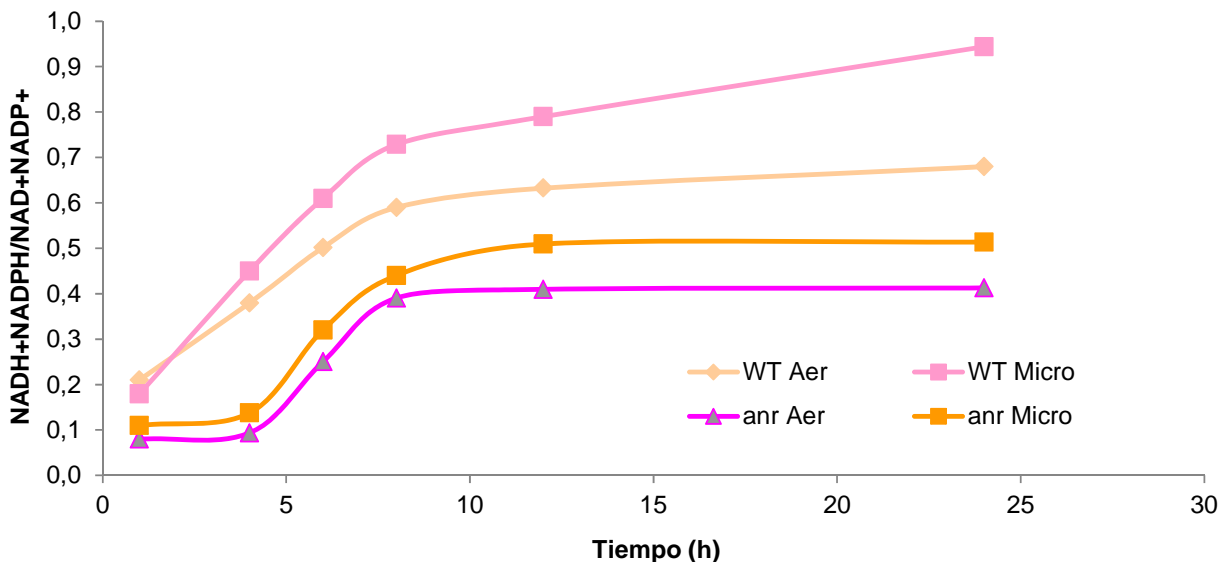


Figura 20: Contenido de dinucleótidos en función del tiempo. Se grafica la relación $\frac{\text{NADH} + \text{NADPH}}{\text{NAD}^+ + \text{NADP}^+}$ como cociente redox.

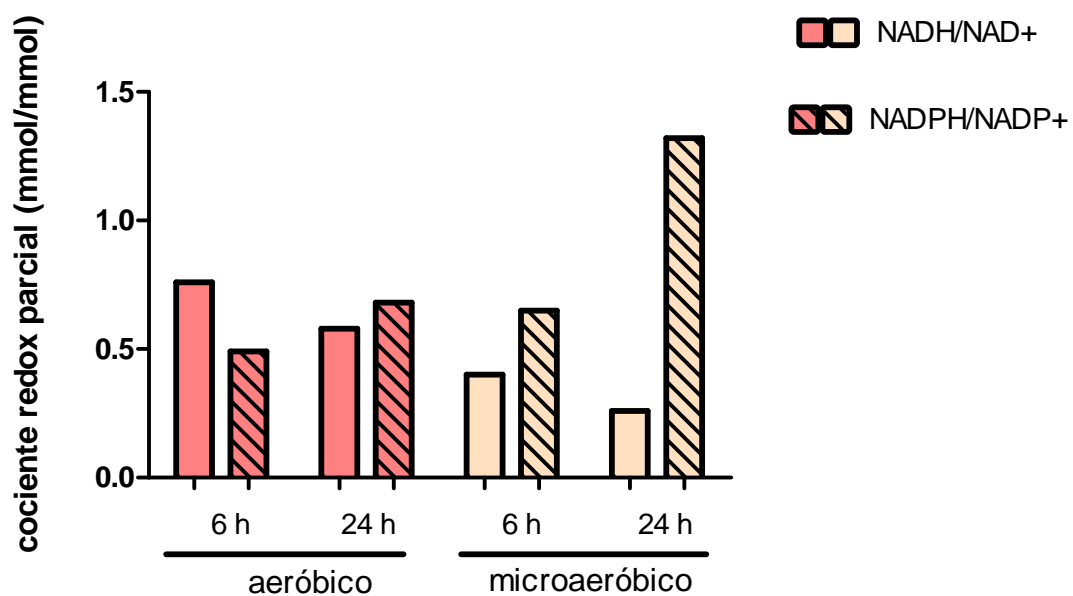
Para analizar con mayor profundidad los datos obtenidos, se han seleccionado dos puntos en la curva de crecimiento (6 y 24 horas), como representativos de dos fases de crecimiento del cultivo: exponencial y estacionaria. Se calcularon separadamente los cocientes pertenecientes a NADH/NAD^+ y $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ que se los denominará “cociente redox parcial”, debido a que normalmente se considera al primero más relacionado con la obtención de energía y al segundo con los procesos biosintéticos y la resistencia al estrés.

En la cepa salvaje tanto en condiciones aeróbicas así como microaeróbicas, el cociente parcial NADH/NAD^+ fue mayor en fase exponencial de crecimiento (6h). En cambio, el cociente parcial $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ aumentó a las 24h (fase estacionaria) y este aumento fue más marcado en condiciones microaeróbicas (Figura 21.A).

Al analizar el cociente parcial NADH/NAD^+ en la cepa mutante se observa una tendencia similar. Sin embargo, a las 6h se registraron valores más altos que los obtenidos para la cepa salvaje en ambas condiciones de aireación (Figura 21.B). El cociente parcial $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ se incrementó, al igual que en la cepa salvaje, en fase estacionaria tanto en aerobiosis como en microaerobiosis pero los valores alcanzados fueron menores en comparación con la cepa parental.

Es interesante destacar que existe una asociación entre los valores máximos del cociente parcial $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ obtenidos y la producción máxima de PHB.

A.



B.

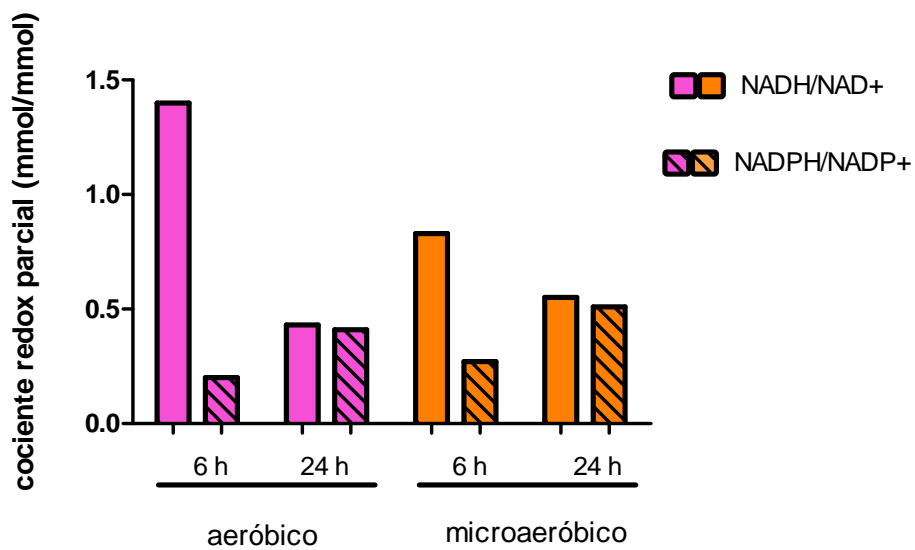


Figura 21: Cociente parcial redox de cultivos en biorreactor. **A.** Cepa salvaje. **B.** Cepa mutante *anr*.

ii) Efecto de la mutación *anr* sobre la resistencia a estrés oxidativo

Los sistemas que intervienen en la detoxificación de las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) poseen regulación a nivel génico, pero además dependen de la presencia de NADPH en muchos casos como cofactor para su correcto funcionamiento. Debido a las diferencias encontradas en el estado redox celular podría existir una diferencia en la resistencia al estrés oxidativo. Para comprobar esta hipótesis se llevaron adelante varios ensayos de crecimiento y resistencia a peróxido de hidrógeno, así como del nivel de ROS por citometría de flujo.

Sensibilidad a peróxido de hidrógeno en medio sólido

Se realizaron estudios de sensibilidad al peróxido de hidrógeno tanto en condiciones de aerobiosis, en Erlenmeyers con alta agitación, y en cultivos microaeróbicos, en botellas herméticamente cerradas y con baja agitación. Estos cultivos fueron desafiados con H₂O₂ en placas de Petri, y se determinó la zona de inhibición del crecimiento.

En condiciones aeróbicas ambas cepas poseen similar resistencia al peróxido de hidrógeno (Figura 22). En cambio, en condiciones de baja tensión de oxígeno se observó una mayor sensibilidad respecto a los cultivos aeróbicos. La cepa *anr* mostró una menor tolerancia al agua oxigenada en comparación con la cepa salvaje (Figura 22) en condiciones de bajo oxígeno. Estos resultados concuerdan con datos previos, obtenidos en base al estudio de microarreglos de DNA en *P. aeruginosa*, que señalan una menor expresión del gen que codifica la enzima catalasa, que participa en la detoxificación de H₂O₂, en una mutante *anr* (Trunk et al., 2010).

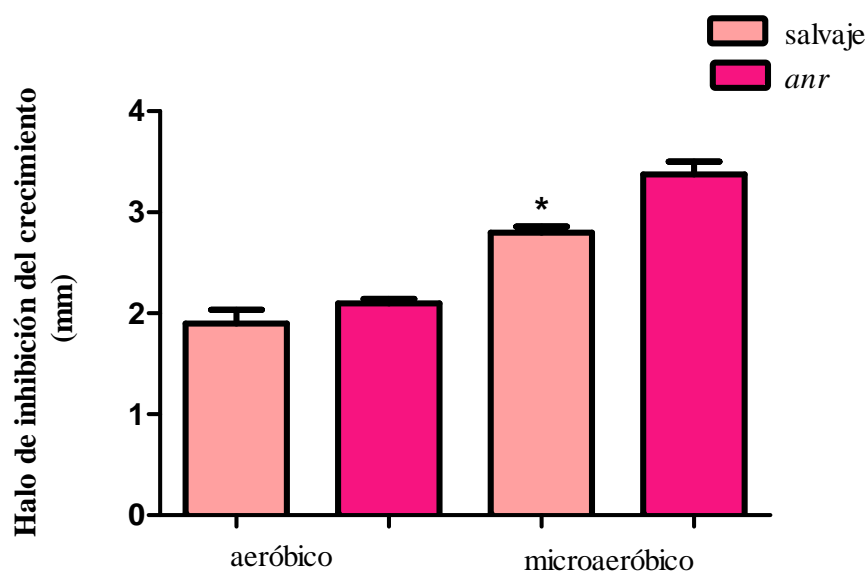


Figura 22: Ensayo de sensibilidad al H₂O₂ en las cepas salvaje y *anr* en cultivos aeróbicos y microaeróbicos. *: muestra diferencias significativas.

Crecimiento en presencia de peróxido de hidrógeno

Con el objetivo de investigar si la cepa mutante *anr* presentaba distinta sensibilidad frente a factores de estrés oxidativo que pudieran desencadenar distintas respuestas celulares, se analizaron varios compuestos. Los cultivos se realizaron en placas multipocillos con agitación y agregado de nitrato, debido a las características microaeróbicas del experimento. Se adicionaron distintas concentraciones de menadiona, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), paraquat y ácido nalidixico. Para todos los agentes ensayados se observó un descenso en el crecimiento a medida que se incrementaba la concentración del compuesto (datos no mostrados), sin embargo, la disminución en la velocidad de crecimiento frente al control fue similar en ambas cepas (datos no mostrados). Sólo en el caso del peróxido de hidrógeno se observaron diferencias en las curvas de crecimiento entre ambas cepas (Figura 23).

En la Tabla 9 se observa la inhibición en el crecimiento presentado por ambas cepas en presencia de peróxido de hidrógeno, en el caso de la cepa mutante se observó una alta inhibición (más del 90%) para las concentraciones más altas del compuesto, mientras que en la cepa salvaje dicha inhibición fue menor al 75%. Los resultados obtenidos indican que el crecimiento de la cepa *anr* se ve afectado en mayor medida en comparación a la cepa salvaje y son consistentes con el ensayo anterior en el cual la cepa *anr* presentó una menor resistencia al agente oxidante.

Tabla 9: Inhibición en la velocidad de crecimiento en presencia de H_2O_2

Concentración de H_2O_2	Inhibición de la velocidad de crecimiento (% de inhibición respecto al control)	
	<i>anr</i>	Salvaje
1700 mM	98,2	73
850 μM	92,2	57,85
425 μM	15,05	0
212 μM	14,05	0

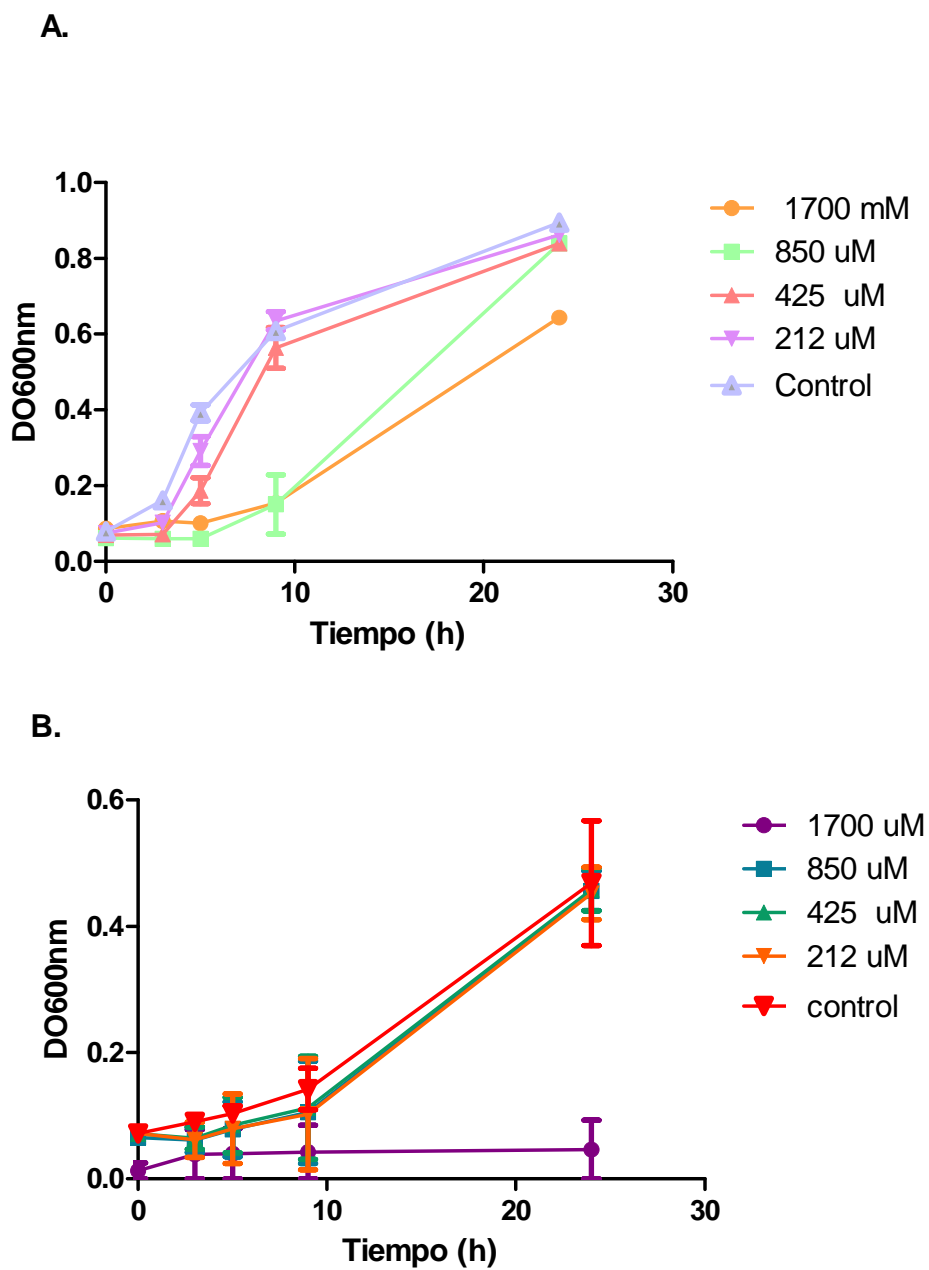


Figura 23: Crecimiento en presencia de distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno. **A.** Cepa salvaje. **B.** Cepa mutante *anr*.

Presencia de especies reactivas de oxígeno

En base a los resultados obtenidos en los distintos experimentos, relacionados con el estado redox celular y la resistencia al estrés oxidativo, fue de interés analizar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior de las células, ya sea aquellas especies generadas durante el metabolismo celular así como aquellas que se generan al agregar un agente oxidante. Para llevar adelante este objetivo se empleó la tecnología de citometría de flujo en asociación con el empleo de una sonda que emite fluorescencia en presencia de ROS.

Las células fueron incubadas en condiciones aeróbicas o microaeróbicas y se las sometió también a estrés oxidativo. En la Figura 24 se puede observar el perfil que presentan las células respecto a su tamaño y complejidad, si bien no se muestra el esquema para todas las condiciones y cepas es importante destacar que no existieron diferencias entre los perfiles.

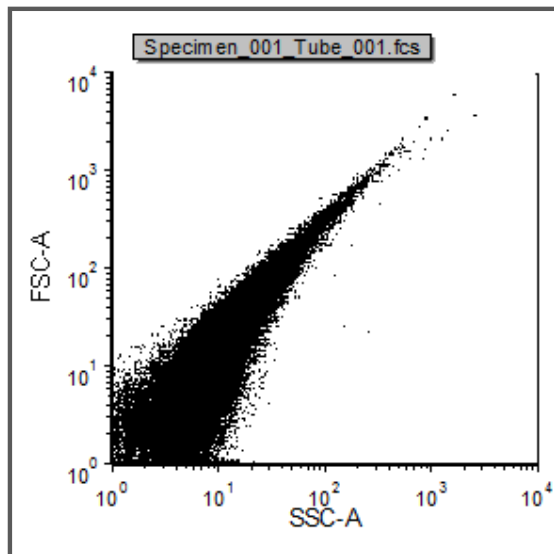


Figura 24: Esquema representativo de una muestra de la cepa salvaje cultivada en Erlenmeyer analizada por citometría de flujo. FSC-A: *forward scattering*, relacionado con el volumen celular. SSC-A: *side scattering*, relacionado con la complejidad celular.

Aproximadamente un 6% del número total de células analizadas presentó autofluorescencia, probablemente relacionada con la presencia de distintos compuestos como por ejemplo los pigmentos (Figura 25). La autofluorescencia se tuvo en cuenta al considerar luego la posición inicial del marcador (flecha, Figura 25) que determinará la zona que se considerará positiva para la fluorescencia debida la presencia de ROS en las muestras con sonda.

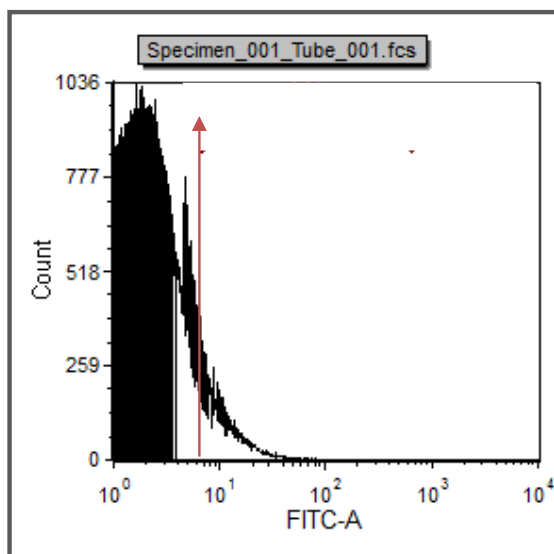
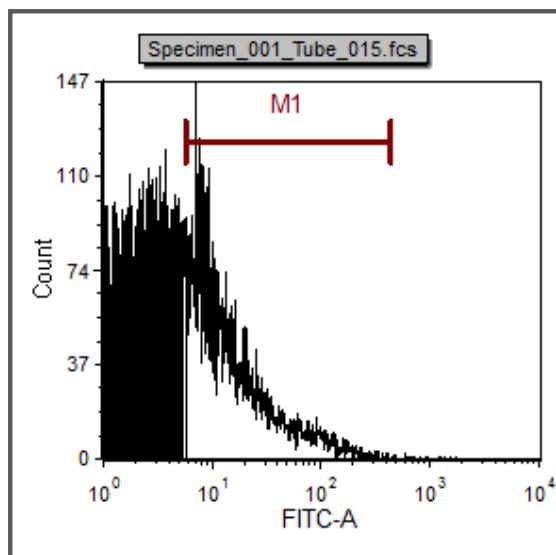


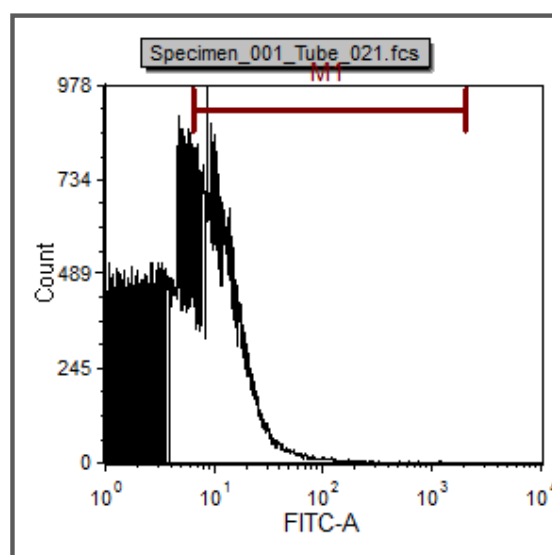
Figura 25: Eventos celulares positivos en el filtro FITC de células incubadas sin DCFH-DA, correspondería a autofluorescencia.

En condiciones aeróbicas ambas cepas presentaron niveles similares de ROS en ausencia de peróxido de hidrógeno (Figura 26 A. y B y Figura 27). En presencia de H_2O_2 en ambos casos se dio un aumento en el porcentaje de células positivas, tal como se esperaba. Sin embargo, las diferencias observadas entre ambas cepas no fueron importantes (Figura 26 C y D, y Figura 27).

A.



B.



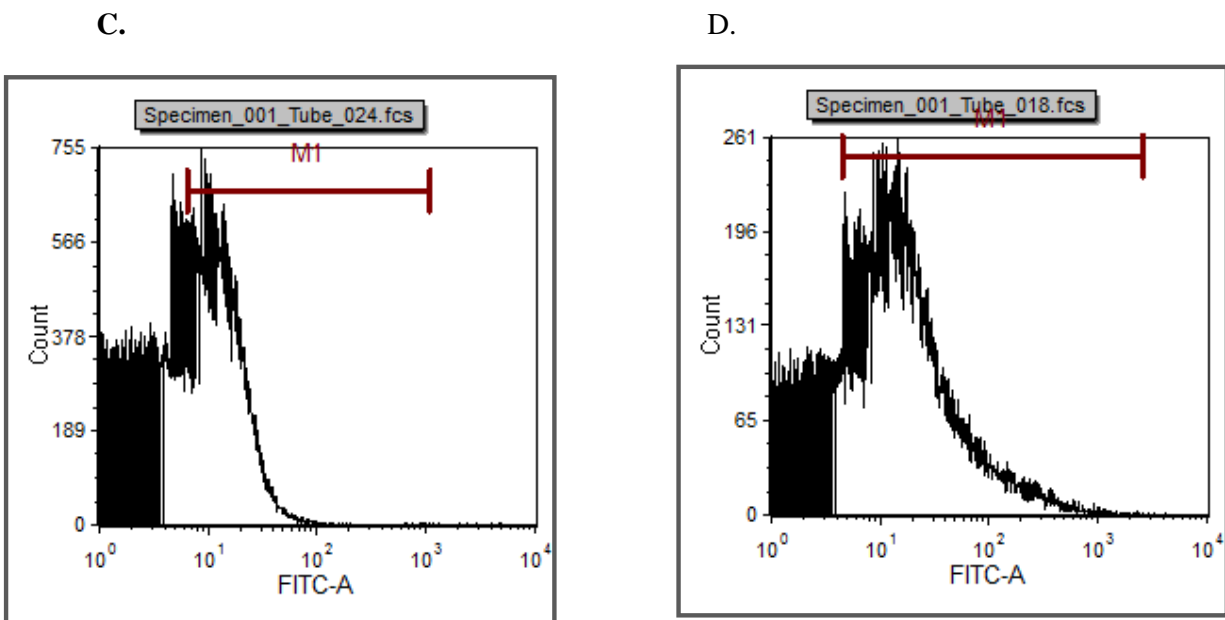


Figura 26: Esquema representativo de los datos obtenidos mediante citometría de flujo. Células en cultivos aeróbicos. **A.** cepa salvaje. **B.** cepa *anr*. **C.** cepa salvaje con H_2O_2 **D.** cepa *anr* con H_2O_2 . El marcador M1 se empleó para determinar el porcentaje de células positivas, es importante destacar que para el programa empleado la altura en el eje Y a la cual se grafica el marcador no incide en los datos obtenidos.

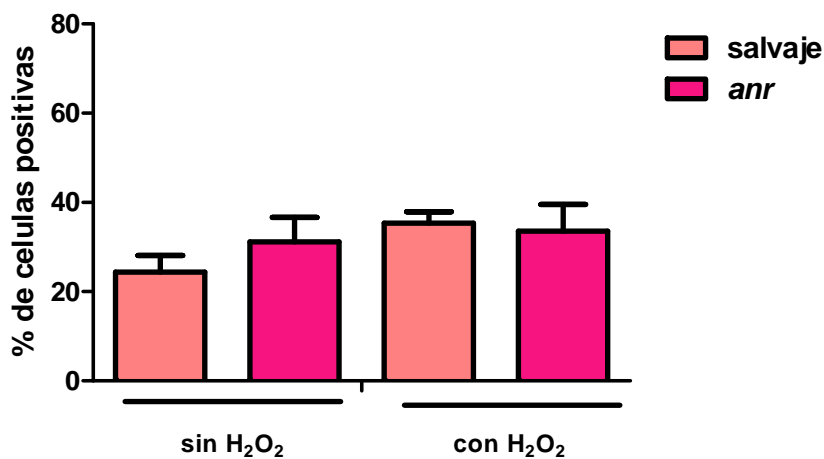
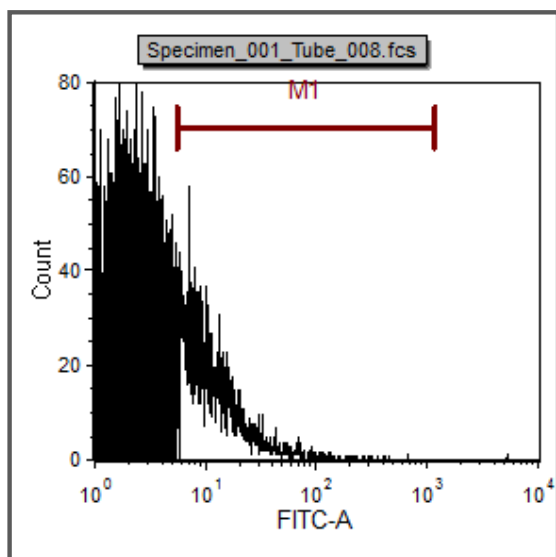


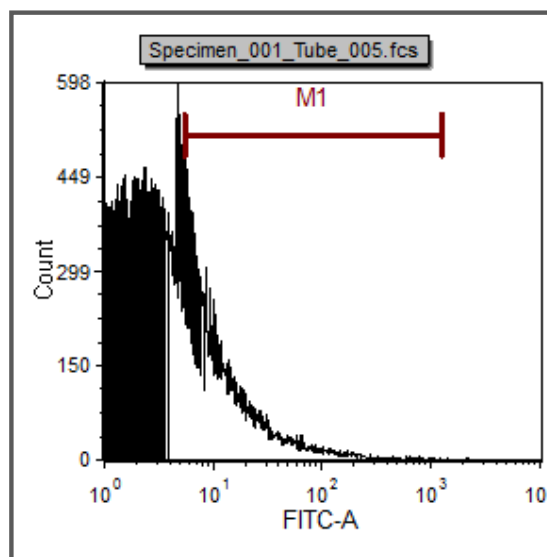
Figura 27: Cuantificación de células positivas para el filtro FITC crecidas en condiciones aeróbicas.

En el caso de los cultivos microaeróbicos se observó un mayor porcentaje de células positivas en el caso de la cepa mutante aun en aquellos cultivos en el que no se agregó H_2O_2 (Figura 28 A y B).

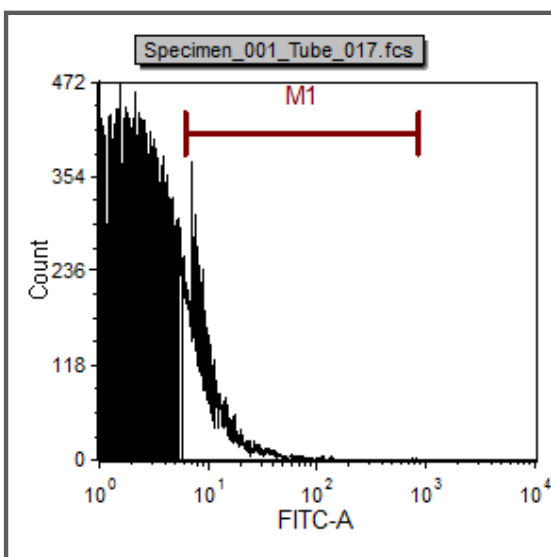
A.



B.



C.



D.

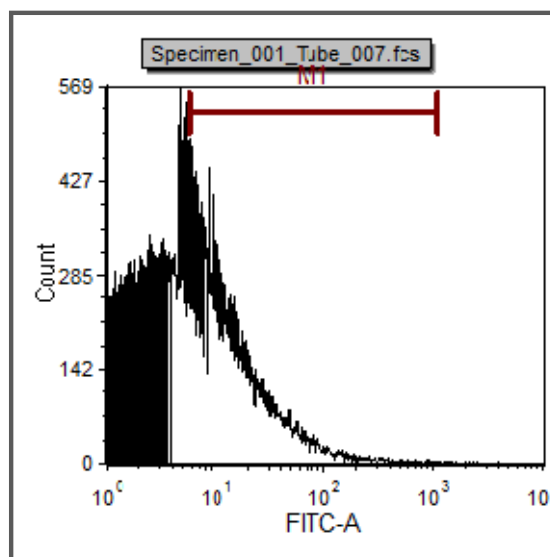


Figura 28: Esquema representativo de los datos obtenidos mediante citometría de flujo de células de cultivos microaeróbicos. **A.** cepa salvaje. **B.** cepa *anr*. **C.** cepa salvaje con H_2O_2 **D.** cepa *anr* con H_2O_2 . El marcador M1 se empleó para determinar el porcentaje de células positivas, es importante destacar que para el programa empleado la altura en el eje Y a la cual se grafica el marcador no incide en los datos obtenidos.

En el caso de aquellos cultivos en los que se agregó H_2O_2 se observó nuevamente un aumento en el porcentaje de células positivas para ROS mucho mayor que en el caso de los cultivos aeróbicos. La cuantificación mostró que aproximadamente el 28 % y el 62% de las células de la cepa salvaje y mutante,

respectivamente, presentaron señal positiva en presencia del agente oxidante (Figura 28 C y D, y Figura 29).

En condiciones microaeróbicas, aun en ausencia del agente oxidante, la cepa mutante presentó un mayor porcentaje de células positivas (25%) en comparación con la cepa salvaje (13 %), indicando que existe un nivel mayor de ROS generados durante el metabolismo celular aun sin el agregado de agentes externos. Además es muy importante el hecho que en condiciones microaeróbicas sería esperable que exista un menor nivel de ROS, debido a que existe una menor tensión de oxígeno disuelto, esto se cumple para la cepa salvaje (13% y 24,5 % en microaerobiosis y aerobiosis, respectivamente) sin embargo, para la cepa mutante la microaerobiosis no alivia la presencia de ROS (25% y el 31% microaerobiosis y aerobiosis, respectivamente).

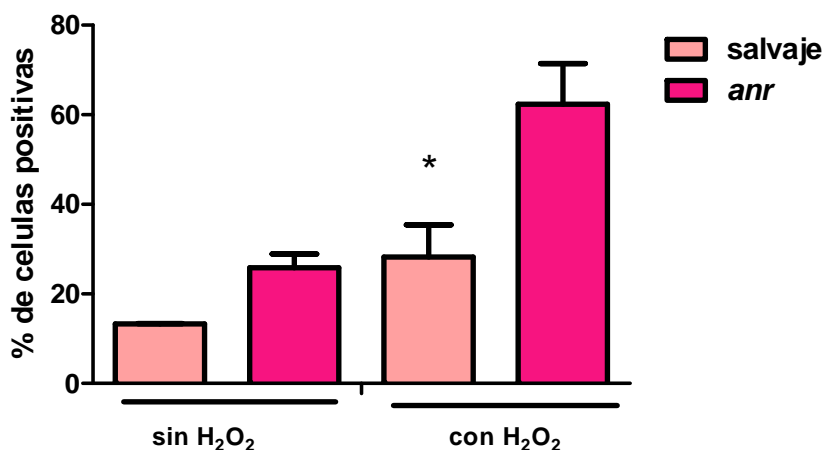


Figura 29: Cuantificación de células positivas para el filtro FITC cultivadas en condiciones microaeróbicas. Las diferencias significativas entre la cepa mutante y la cepa salvaje se señalan con *

iii) Estudios del consumo de oxígeno

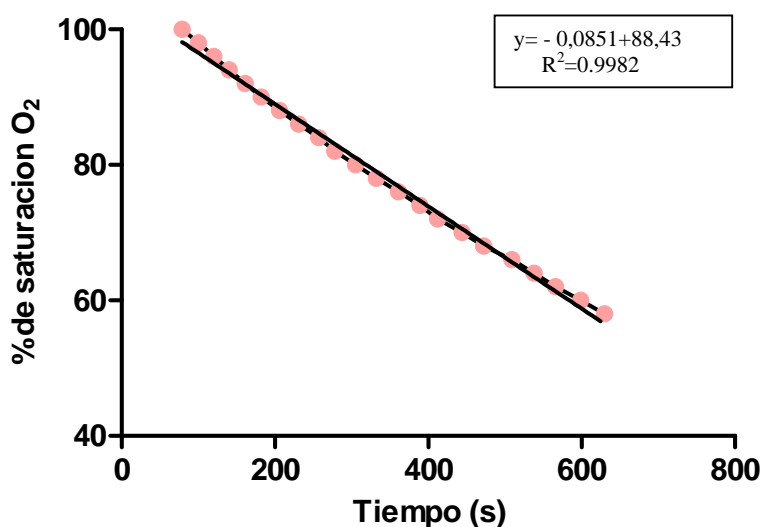
Los resultados anteriores muestran que la cepa mutante presenta un estado de mayor oxidación (reflejado por el cociente redox), menor resistencia al estrés oxidativo en microaerobiosis y un mayor nivel de especies reactivas de oxígeno aún en ausencia de agente oxidante (en el caso de microaerobiosis). Una posible causa de estas observaciones podría estar relacionada con una alteración en la cadena respiratoria, dada por la ausencia de regulación de Anr sobre algunas proteínas de importancia, que conlleve a una mayor cantidad de dinucleótidos oxidados y una mayor generación de ROS. En *P.aeruginosa* PAO1 y *P.putida* KT2440 ha sido señalado que Anr regula genes pertenecientes a citocromos, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Ray y Willams, 1997; Ugidos et al., 2008). Debido a que los citocromos tienen influencia, no solo en la obtención de energía sino también en el

consumo de oxígeno, podría hipotetizarse que existe una diferencia en la tasa de consumo de oxígeno entre la cepa salvaje y la mutante.

En condiciones microaeróbicas se puede observar que la disminución de la tensión de oxígeno ocurre de manera más rápida para la cepa mutante que para la cepa salvaje (Figura 30), mientras que en aerobiosis se observó que el consumo de oxígeno por ambas cepas fue similar (Figura 31).

Al ser cuantificado se obtuvo que el valor de consumo de oxígeno, para la cepa mutante en microaerobiosis, al menos duplica al calculado para la cepa salvaje, siendo estas diferencias significativas (Figura 32).

A.



B.

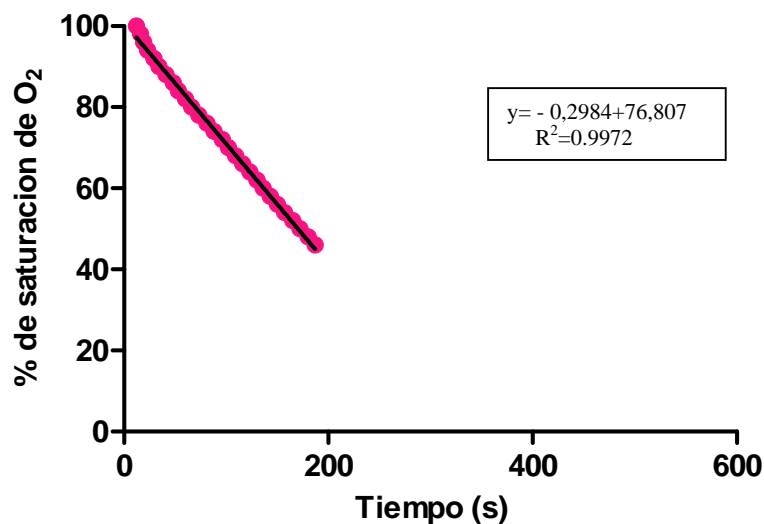
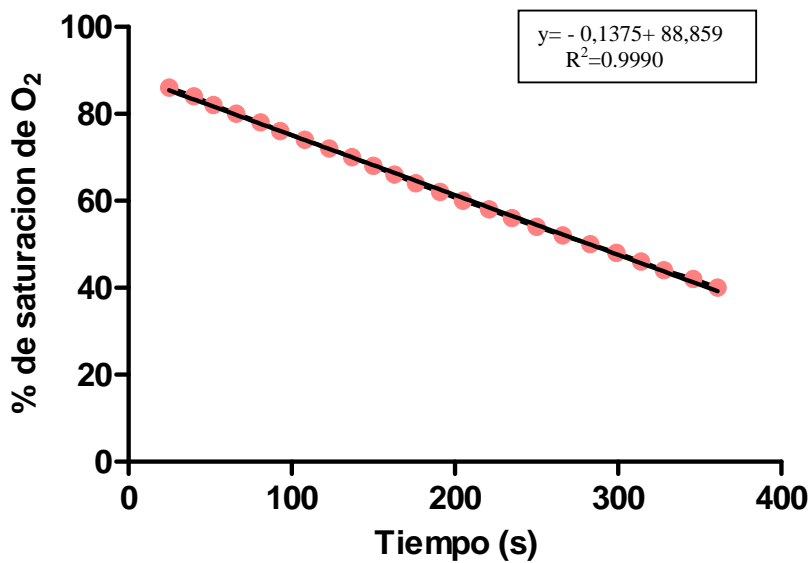


Figura 30: Curvas representativas del consumo de oxígeno en función del tiempo para condiciones microaerobicas. **A.** Cepa salvaje DO=0,508 **B.** Cepa *anr* DO=0,504

En condiciones aeróbicas se observó que el consumo fue mayor en el caso de la cepa salvaje aunque las diferencias en la cuantificación resultaron no significativas (Figura 31, Figura 32).

A.



B.

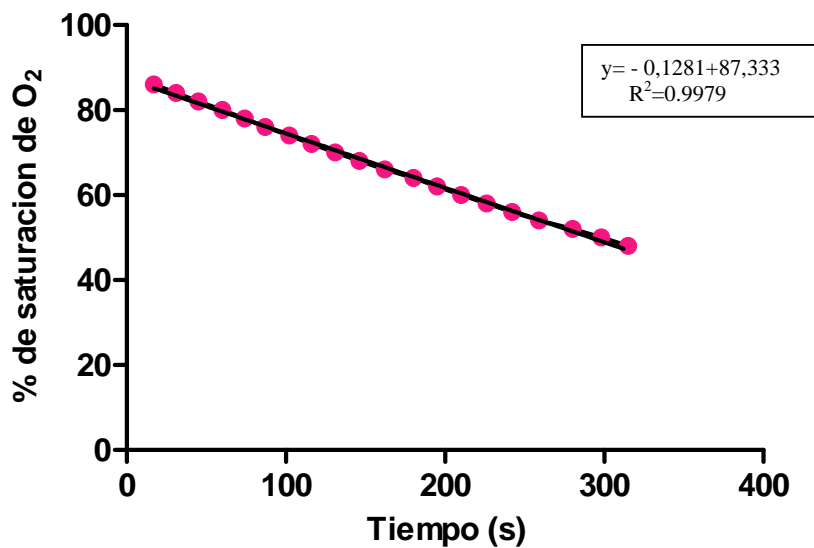


Figura 31: Curvas representativas del consumo de oxígeno en función del tiempo para condiciones aeróbicas. **A.** Cepa salvaje DO=0,423 **B.** Cepa *anr* DO=0,458.

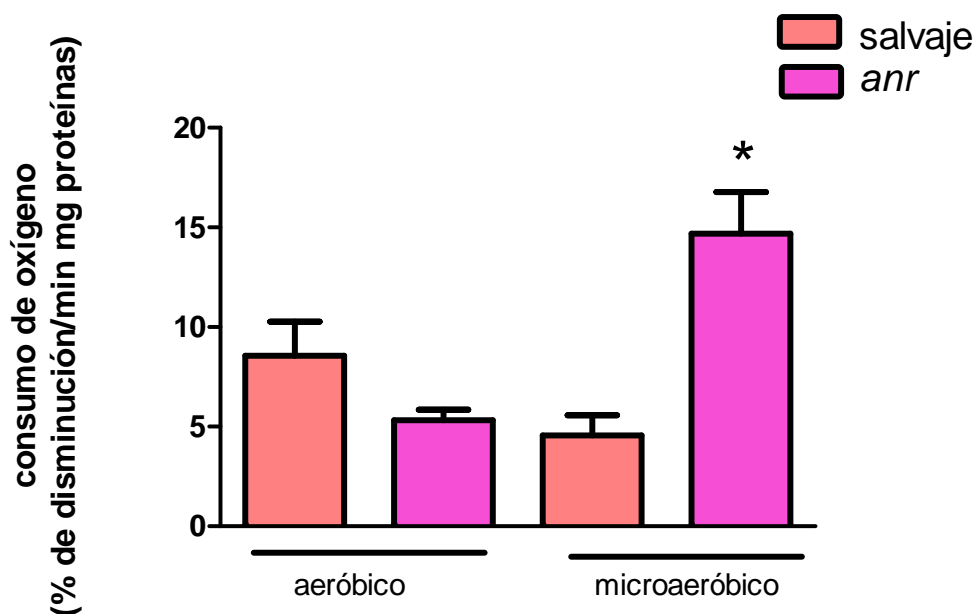


Figura 32: Cuantificación del consumo de oxígeno medido por método polarográfico con células provenientes de cultivos aeróbicos y microaeróbicos. Las diferencias significativas entre la cepa mutante y la cepa salvaje se señalan con un *.

Cada cepa mostró diferencias significativas en el consumo de oxígeno en distintas condiciones de aireación. En la cepa mutante el consumo de oxígeno es mayor en microaerobiosis en comparación con las condiciones aeróbicas, en contraste, en la cepa salvaje la capacidad de consumo fue significativamente mayor en condiciones aeróbicas que en microaeróbicas.

iv) Influencia de Anr sobre la utilización de diversas fuentes de carbono

Debido a que diversos procesos celulares que se vieron afectados por la mutación en este regulador global, estudiamos también la utilización de diversas fuentes de carbono comparando el crecimiento de la cepa salvaje y la cepa mutante. Para realizar estos experimentos, se utilizó el sistema Microlog (Microlog^R Biolog) en el cual se detecta la utilización de los compuestos mediante el viraje del color de un colorante redox, del incoloro al azulado. La ventaja de este sistema es su alta sensibilidad que permite obtener resultados a partir de las 4 horas de incubación. Se utilizaron los paneles GP y GN, los esquemas con los distintos compuestos se pueden observar en la sección MyM, monitoreando la DO a 600nm durante 24 horas de incubación para ambas cepas. Durante las primeras 8 horas no se observaron diferencias entre la cepa salvaje y la cepa mutante, mientras que a las 24 horas, ocho de las

fuentes de carbono fueron empleadas por la cepa salvaje y no por la cepa *anr*, mientras que dos fueron empleadas preferentemente por la cepa mutante y en menor medida por la cepa salvaje (en el Panel GN, Figura 33). En el caso del panel GP sólo se observaron diferencias para la utilización de L-asparagina y ácido L-glutámico para los cuales la utilización por parte de la cepa salvaje fue mayor. Se obtuvieron valores de DO_{600nm} de 1,37 para la cepa salvaje y 0,209 para la cepa mutante para el caso de la L-asparagina y 1,62 y 0,238 en el caso del ácido L-glutámico.

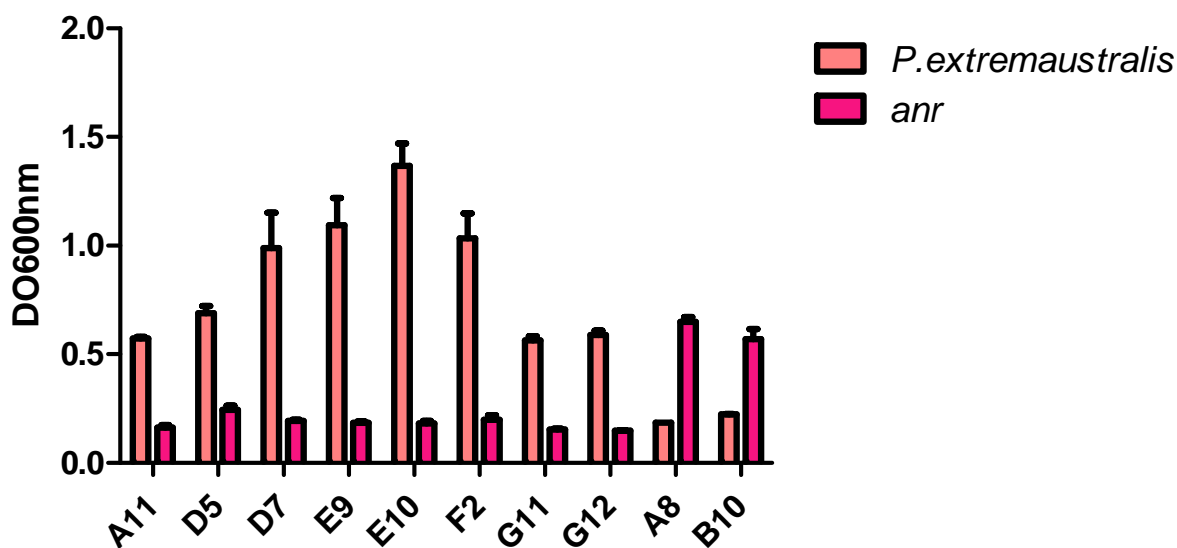


Figura 33: Utilización de fuentes de carbono por *P. extremaustralis* y la cepa mutante *anr*. A11:D-arabitol, D5: ácido D-Galactónico lactona, D7: ácido D-gluconico ,E9: ácido quianico, E10: ácido D-glucarico, F2:Ácido D-lactico (metil ester), G11 ácido Succinico, G12: ácido γ -aminobutirico (GABA), A8:N-acetil glucosamina B10: maltosa

Los resultados obtenidos muestran diferencias en la utilización de ciertas fuentes de carbono entre ambas cepas. Para las causas de estas diferencias en principio se investigó en la literatura la posibilidad de que Anr regule el catabolismo de diferentes fuentes de carbono en otras especies. En el caso de *P. aeruginosa* un solo trabajo establece los posibles genes blanco de Anr mediante estudios de *arrays* y proteómica con tecnología *High Throughput* (Trunk et al., 2010) donde se señala, por ejemplo, que el gen *gabP*, que codifica la enzima GABA permeasa y *gabT*, ambos involucrados en el metabolismo de GABA, se encuentran alterados en la cepa *anr* de *P. aeruginosa*. Esto coincide con nuestros resultados que señalan la imposibilidad de utilizar esta fuente de carbono en la cepa *anr*.

v) Determinación de los aminoácidos claves para el crecimiento

Tal como se describió anteriormente, la cepa *anr* no presenta un crecimiento importante (sin importar la condición de aireación) si el cultivo no es suplementado con casaminoácidos, por lo que se investigó cuáles eran los aminoácidos necesarios para lograr un aumento en el crecimiento de esta cepa. Para esto se realizaron agrupamientos de diferentes aminoácidos que fueron agregados al medio de cultivo (como se describe en MyM), eliminando algunos de la mezcla hasta lograr individualizarlos. Se observó que en el grupo en el cual estaban presentes treonina, isoleucina y arginina el crecimiento fue restaurado, aunque no totalmente cuando se retiraron alguno de estos el crecimiento fue nuevamente similar al medio mínimo (Tabla 9). Con el agregado de histidina y cisteína el crecimiento fue ligeramente mayor (datos no mostrados).

Tabla 9: Crecimiento en medio mínimo con distintos suplementos aminoácidos.

Condición	DO _{600nm}
<i>anr</i> Grupo A'	0,061±0,002
<i>anr</i> grupo B'	0,205±0,031
<i>anr</i> grupo A'+B'	0,283±0,007
<i>anr</i> casaminoácidos	0,788±0,121
<i>anr</i> medio mínimo	0,059±0,006
Salvaje medio mínimo	0,434±0,065
<i>anr</i> B' sin treonina (B3')	0,068 ±0,019
<i>anr</i> B' sin arginina (B'5)	0,058±0,004
<i>anr</i> sin isoleucina (B6')	0,059±0,008

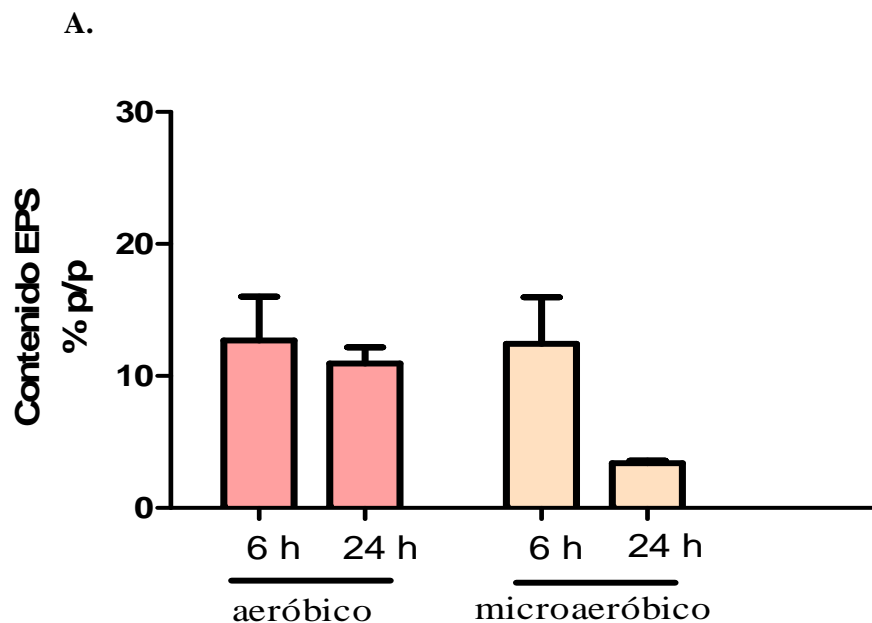
vi) Estudio del efecto de la tensión de oxígeno y de la mutación *anr* sobre la producción de exopolisacáridos y su relación con el PHB en *P. extremaustralis*

Los polímeros extracelulares y capsulares son importantes en la fisiología de las especies de *Pseudomonas*, si bien son de naturaleza variada, es posible determinar el contenido de exopolisacáridos totales mediante una determinación de azúcares reductores con el reactivo de antrona. En este caso se midieron aquellos presentes en el sobrenadante de cultivos microaeróbicos y aeróbicos en la cepa salvaje y mutante *anr*. Este ensayo se realizó teniendo en cuenta que el contenido de PHB variaba en las

distintas condiciones, y en las dos cepas analizadas, por lo que el carbono excedente podría re-direccionarse a la producción de otros polímeros, tales como los exopolisacáridos.

En la cepa salvaje en aerobiosis se observaron valores similares en el contenido de EPS a las 6 y a las 24 h, en cambio, en condiciones microaeróbicas el porcentaje de EPS disminuyó hacia la fase estacionaria, registrándose el mínimo valor para esta cepa. Esto contrasta con el máximo de acumulación de PHB a las 24 horas en bajas tensiones de oxígeno, lo que podría entonces sugerir una asociación negativa entre la producción de ambos compuestos (Figura 34 A.).

La cepa mutante mostró una mayor producción de EPS con respecto a la cepa salvaje para todas las condiciones de cultivo. Esto podría estar relacionado con su menor contenido de PHB (Figura 34 B). En particular, el contenido de EPS en condiciones aeróbicas en fase exponencial fue el más alto, pudiendo estar relacionado con el alto grado de oxidación en el que se encuentra esta cepa en dichas condiciones (ver cociente redox total) ya que se relaciona a la producción de exopolisacáridos con la protección frente a distintos tipos de estrés, entre ellos el oxidativo (Sabra et al., 2002).



B.

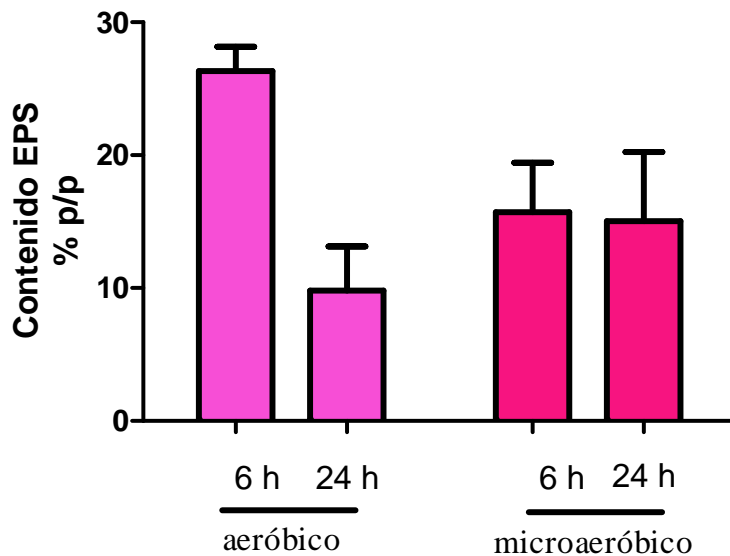


Figura 34: Contenido de EPS totales en el sobrenadante de cultivos en biorreactor (% p/p). **A.** Cepa salvaje. **B.** Cepa *anr*.

vi) Influencia de la tensión de oxígeno y de Anr sobre la producción de proteínas extracelulares en *P. extremaustralis*

La secreción de diferentes productos, entre ellos proteínas, sideróforos, enzimas, etc. varían según el estado fisiológico, siendo uno de los factores importantes el oxígeno (Sabra et al., 2002). Para analizar la posible influencia de Anr sobre los productos de secreción se utilizaron sobrenadantes de cultivos en biorreactor en diferentes tensiones de oxígeno, tanto de la cepa salvaje como de la mutante en fase de crecimiento exponencial (6 horas) como estacionaria (24 horas). Se observó un patrón diferente en las dos cepas, mientras que en la cepa salvaje el contenido de proteínas en el sobrenadante fue mayor en microaerobiosis, en la cepa mutante la cantidad de proteínas luego de 24 horas de cultivo se incrementó en aerobiosis, presentando el mayor valor de la serie analizada (Figura 35).

Debido a los resultados obtenidos, fue de interés estudiar si las proteínas halladas en el sobrenadante de los cultivos en biorreactor presentaban actividades enzimáticas. Para esto se realizaron ensayos para determinar la presencia de proteasas, amilasas y lipasas. Se detectaron halos de degradación en placas de agar-leche correspondientes a la presencia de proteasas en el caso de la cepa mutante, especialmente en microaerobiosis. En la cepa salvaje no se encontró actividad proteasa

importante pero sí actividad amilasa en placas de agar-almidón. Este resultado fue poco esperado debido a que normalmente esta actividad enzimática no es encontrada en especies del género *Pseudomonas* y se asocia principalmente con otros géneros bacterianos, como por ejemplo *Bacillus*. Sin embargo, se han encontrado datos bibliográficos acerca de actividad de una novedosa enzima amilasa en *P. stutzeri*.

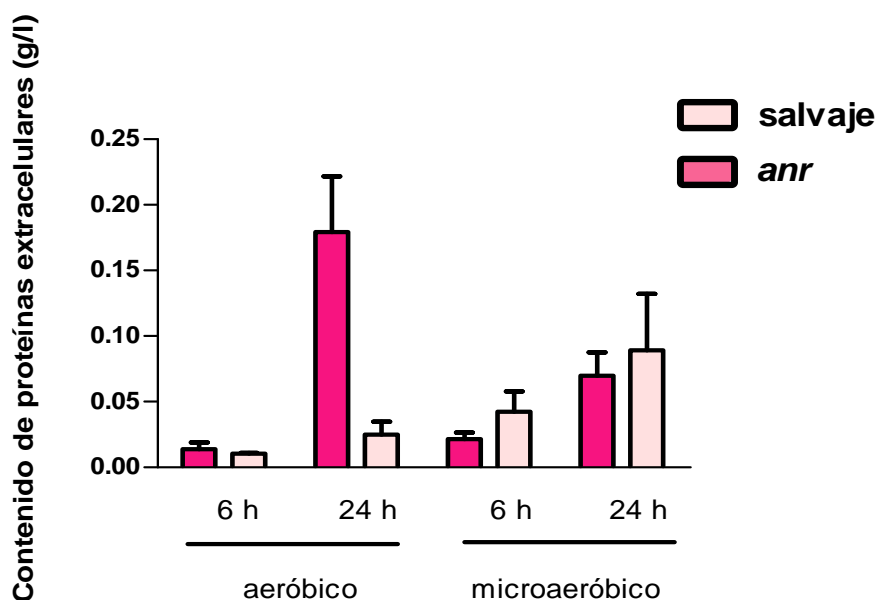


Figura 35: Contenido extracelular de proteínas en cultivos controlados en biorreactor.

vii) Efecto de la tensión de oxígeno y de la mutación en *anr* en la morfología celular en *P.extremaustralis*

Debido a que gran cantidad de parámetros celulares se vieron afectados por la mutación de *anr*, estudiamos la morfología celular en distintas tensiones de oxígeno en la cepa salvaje y mutante por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Al microscopio óptico las células de la cepa salvaje mostraron la típica morfología bacilar característica del género *Pseudomonas*. Por el contrario, las células de la cepa *anr* presentaron una morfología de tipo cocoide. En un ensayo preliminar se observaron por SEM cultivos en botellas herméticamente cerradas (condición microaeróbica) y en Erlenmeyer (condición aeróbica). La morfología de la cepa salvaje fue contundentemente distinta en aerobiosis respecto a microaerobiosis (Figura 36 A y C). En microaerobiosis, las células mostraron una morfología claramente más alargada que en aerobiosis, donde se distingue la típica forma bacilar de *Pseudomonas*. En la cepa mutante también se detectan células alargadas respecto a la condición aeróbica. En relación a este llamativo cambio de morfología asociado al cambio en la tensión de oxígeno, recientemente se ha descrito un

fenómeno similar en *P. aeruginosa* (Yoon et al., 2011) donde el efecto observado fue atribuido a la producción de óxido nítrico por la enzima nitrito reductasa. Como ha sido señalado, *P. extremaustralis* no es capaz de reducir el nitrito a óxido nítrico, por lo que el motivo de este cambio no podría ser atribuido a la producción de óxido nítrico.

También se realizaron observaciones SEM en células cultivadas en biorreactor, que permite controlar la tensión de oxígeno en forma más precisa. Tanto en aerobiosis como en microaerobiosis, las células presentaron morfología tipo bacilar en la cepa salvaje y no se observó el fenómeno de elongación. Es interesante mencionar la detección de células en proceso de división celular en microaerobiosis (Figura 37). En los cultivos aeróbicos se detectó menor cantidad de células en división en el campo visual. En la cepa mutante las células tuvieron forma bacilar, sin presencia de células en proceso de división.

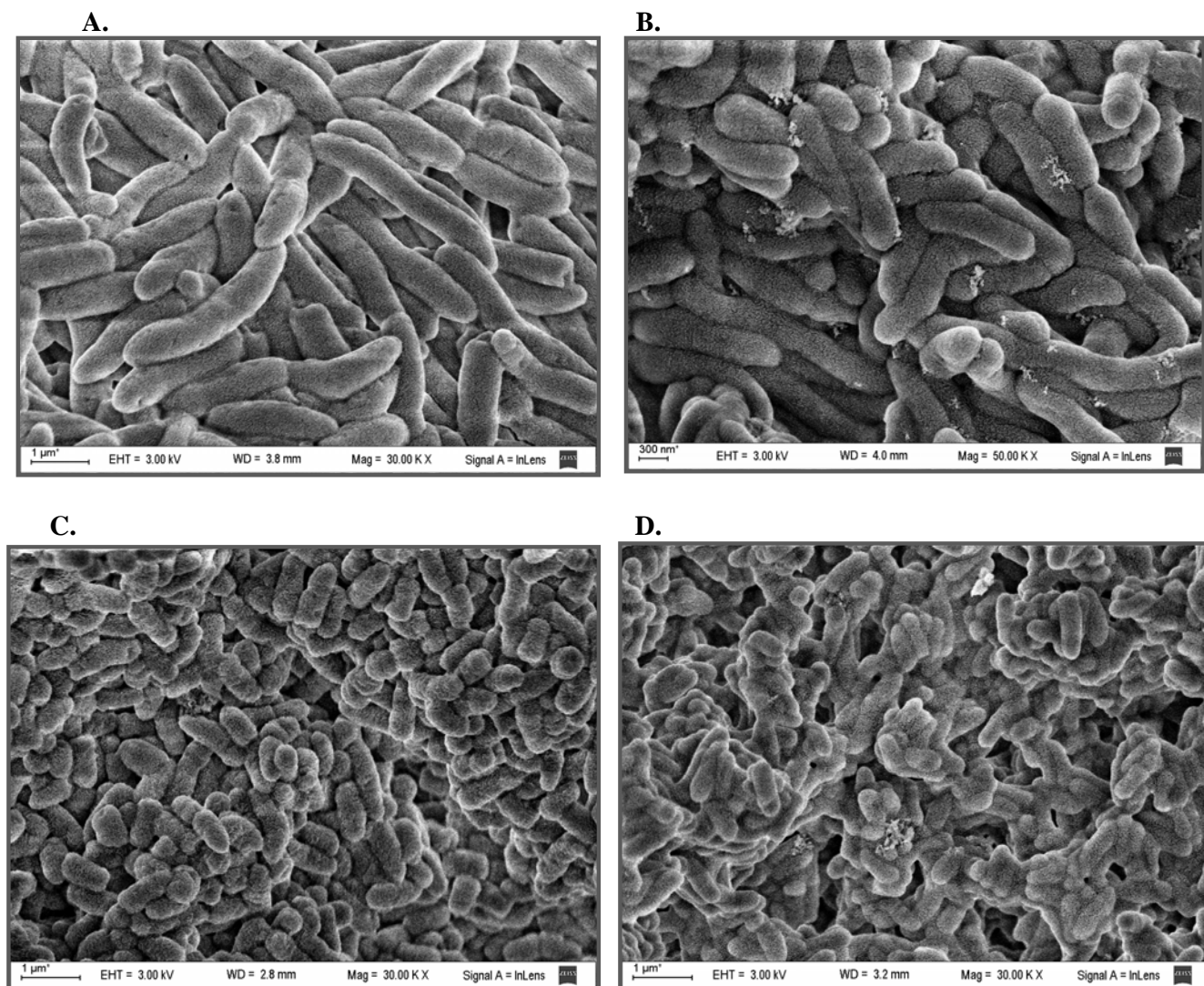


Figura 36: Microscopia de barrido SEM. **A.** Botella herméticamente cerrada cepa salvaje **B.** Botella herméticamente cerrada cepa *anr*. **C.** Erlenmeyer agitado cepa salvaje. **D.** Erlenmeyer agitado cepa *anr*.

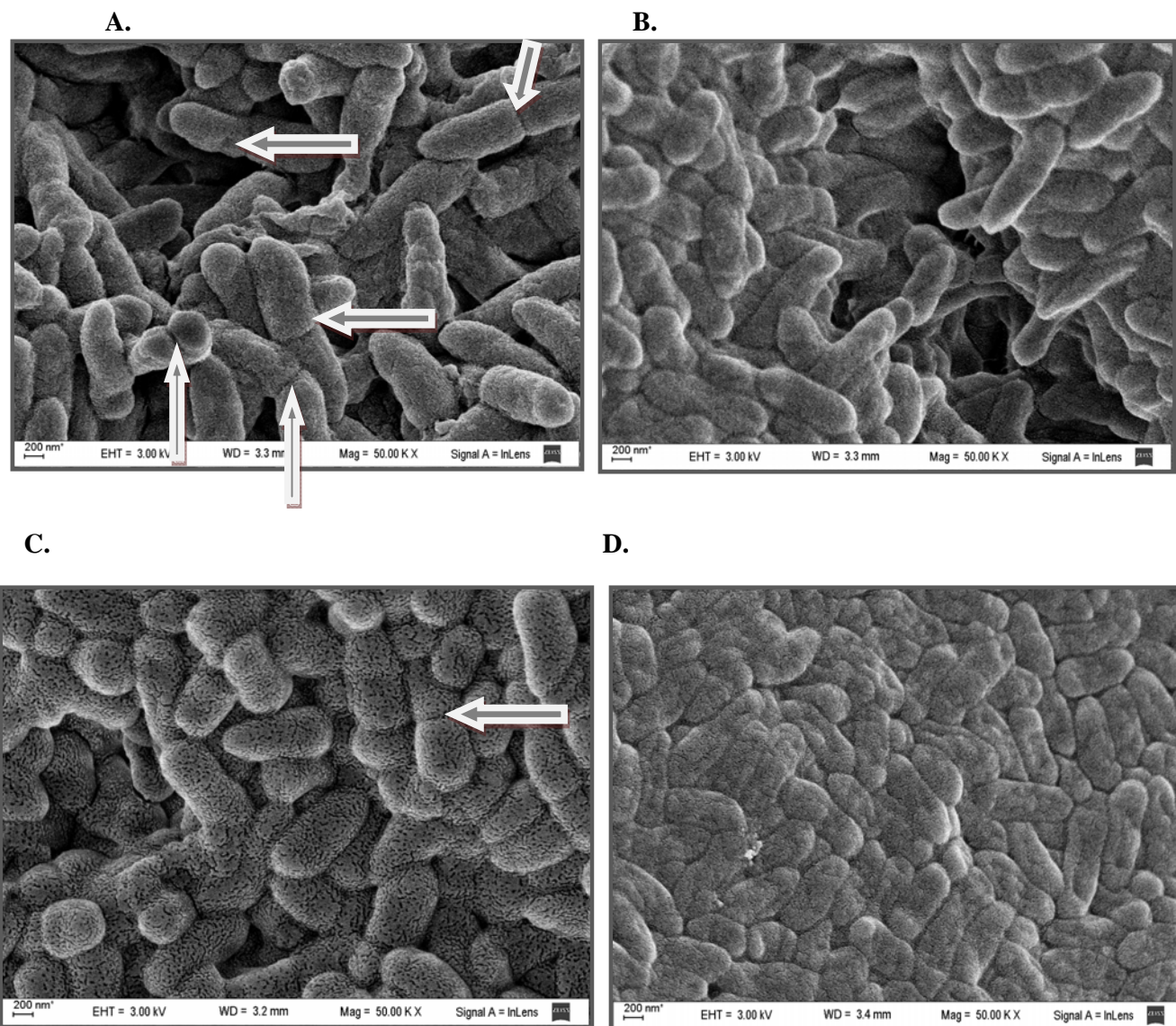


Figura 37: Fotografías de microscopía de barrido. **A** Fermentación microaeróbica cepa salvaje **B.** Fermentación microaeróbica cepa *anr*. **C.** Fermentación aeróbica cepa salvaje **D.** Fermentación aeróbica en biorreactor cepa *anr*

CAPITULO 4: Biofilms en *Pseudomonas extremaustralis*

- i) Influencia del polihidroxi butirato en la formación de biofilms en condiciones de frío.
- ii) Influencia de Anr sobre la formación de biofilms en *P. extremaustralis*

Los biofilms son la forma de vida preferida en la naturaleza (Dolan, 2002), sus características y los factores que afectan su desarrollo son de importancia, no solo desde el punto de vista del entendimiento de esta forma de vida bacteriana, sino también debido a que afectan positiva y negativamente diversas actividades humanas. El objetivo de este capítulo fue estudiar la formación de biofilms desde dos perspectivas: por un lado su importancia en condiciones de estrés, en particular en condiciones de baja temperatura, en relación con la producción de PHB y por otro lado analizar la influencia del regulador global Anr. En el primer caso, se empleó un modelo de biofilms estáticos en placas multipocillo y tinción con cristal violeta, mientras que para el segundo se emplearon además las denominadas “Glass Bottom Petri dishes”.

i) **Biofilms en frío: Rol del polihidroxi butirato**

En el laboratorio previamente demostramos que bajo condiciones de frío, una mutante incapaz de sintetizar PHB (*P. extremaustralis phaC*) presenta defectos graves de crecimiento en aerobiosis así como daño oxidativo en lípidos, estado redox celular más oxidado y otros parámetros alterados (Ayub et al., 2009). Debido a estos resultados nos planteamos dos hipótesis:

- a) En condiciones microaeróbicas se observaría una reversión de este fenotipo en la cepa mutante *phaC*.
- b) La presencia de PHB en condiciones de frío permitiría a la cepa salvaje sobrevivir en forma planctónica (estado no adherido) y esto representaría una ventaja para la colonización de nuevos nichos ecológicos en condiciones de estrés.

Para comprobar la primera hipótesis se utilizaron botellas herméticamente cerradas con baja agitación y con diferente relación volumen de medio/volumen total del recipiente para crear dos condiciones de microaerobiosis: leve (1/4) y moderada (1/2); mientras que las condiciones aeróbicas se lograron en Erlenmeyers con alta agitación y 1/10 de volumen de llenado. Los experimentos se realizaron a las temperaturas de incubación de 10°C (frío) y 28°C.

A 28°C, ambas cepas presentaron una tasa de crecimiento similar ($p > 0,05$), que disminuyó a medida que aumentó la microaerobiosis (Tabla 10).

Por el contrario, a 10°C sólo la cepa salvaje fue capaz de crecer en todas las condiciones de aireación con tasas de crecimiento similares, mientras que la cepa mutante sólo fue capaz de crecer en condiciones de microaerobiosis, con tasas de crecimiento significativamente menores en comparación con la cepa salvaje (Tabla 10, $p=0,008$ para microaerobiosis leve y $p=0,027$ para microaerobiosis moderada). Los resultados muestran que la microaerobiosis permitió el crecimiento en frío de la cepa *phaC*.

Tabla 10: Tasa de crecimiento en distintas condiciones de aireación y temperatura de las cepas *P. extremaustralis* y *phaC*. NG: no hay crecimiento.

T (°C)	Condición	Tasa de crecimiento (ln DO/h)	
		<i>P.extremaustralis</i>	<i>phaC</i>
10	Aeróbica	0,054 ± 0,006	NC
	Microaeróbica leve	0,056 ± 0,001	0,031 ± 0,003
	Microaeróbica moderada	0,055 ± 0,004	0,034 ± 0,003
28	Aeróbica	0,33 ± 0,010	0,33 ± 0,020
	Microaeróbica leve	0,19 ± 0,020	0,16 ± 0,020
	Microaeróbica moderada	0,15 ± 0,020	0,17 ± 0,020

En base a estos resultados y considerando que los biofilms constituyen ambientes heterogéneos que presentan gradientes de nutrientes y también de oxígeno, hipotetizamos que la cepa mutante *phaC* sería capaz de crecer en estas condiciones a bajas temperaturas y que la proporción de células en el biofilm debería ser mayor a las células libres en comparación a la cepa salvaje, la que gracias a la presencia de PHB no requeriría un estado tan protegido para su supervivencia como su contraparte mutante.

Se realizaron entonces experimentos en biofilms estáticos, determinando luego de 72 horas el número de células viables totales, el de células adheridas y el de las células planctónicas en el pocillo (Figura 38.A). Se observó que el número de UFC/ml totales fue similar para ambas cepas cuando los biofilms se desarrollaban a 28°C (Figura 38 A. $p>0,05$), mientras que a 10°C se observó una disminución significativa en la cepa mutante en comparación con la cepa salvaje ($p<0,05$, Figura 38.B). También se analizó la cepa salvaje cultivada en condiciones de no acumulación de PHB, utilizando glucosa como fuente de carbono en lugar de octanoato de sodio. En este medio esta especie no es capaz de acumular PHB debido a que posee una mutación en el gen *phaA* (Ayub et al., 2006). Encontramos que los resultados obtenidos con glucosa fueron similares al encontrado para la cepa *phaC* (Figura 38.B).

Se estudió luego la viabilidad de las células de ambas cepas tanto en su forma adherida (A) como planctónica (P), calculando con estos datos un cociente CA/P. A 28°C el cociente fue similar para todas las cepas ($p > 0,05$), mientras que a 10°C se observó un incremento significativo de este cociente para la cepa mutante *phaC* ($p = 0,001$) y para la cepa salvaje sin PHB (con glucosa), lo que estaría indicando que la mayor proporción de células vivas para la cepa mutante se encuentra en forma adherida (Figura 38.C).

La supervivencia de las células planctónicas (pertenecientes al medio de cultivo en el pocillo de las microplacas) a 28°C fue similar para todas las cepas ($p > 0,05$), mientras que a 10°C el número de células planctónicas de la cepa *phaC* disminuyó con respecto a los 28°C ($1,2 \cdot 10^6 \pm 5,2 \cdot 10^5$ y $1,9 \cdot 10^8 \pm 7,3 \cdot 10^7$ UFC/ml, respectivamente). En contraste, la cepa salvaje mostró valores similares en ambas temperaturas ($p > 0,05$, $4,4 \cdot 10^8 \pm 9,9 \cdot 10^7$ y $2,6 \cdot 10^8 \pm 8,9 \cdot 10^7$ UFC/ml para 28°C y 10°C, respectivamente). Asimismo, se observó una disminución significativa ($p = 0,001$) en el número de UFC/ml para la cepa salvaje en cultivos con glucosa, con valores de $1,3 \cdot 10^8 \pm 2,1 \cdot 10^7$ UFC/ml a 28 °C y $8,7 \cdot 10^5 \pm 9,8 \cdot 10^4$ UFC/ml a 10 °C. La complementación con el gen *phaC* restauró significativamente la supervivencia a 10°C llegando a valores de $1,9 \cdot 10^7 \pm 6,2 \cdot 10^5$ UFC/ml ($p = 0,038$ respecto a la cepa *phaC*).

Por otro lado, se estimó la biomasa total adherida por tinción con cristal violeta y medición de la DO_{550} , éstos valores representan no sólo las células vivas, sino también las muertas y la matriz extracelular (Peeters al., 2008). En este caso se observó que todas las cepas presentaron similares valores de CV (Figura 38, D.) a 28°C, sin embargo a 10°C la cepa mutante presentó una biomasa total adherida significativamente mayor tanto respecto a la registrada a 28°C ($p = 0,038$) como con respecto a los valores correspondientes a la cepa salvaje a 10°C ($p = 0,002$).

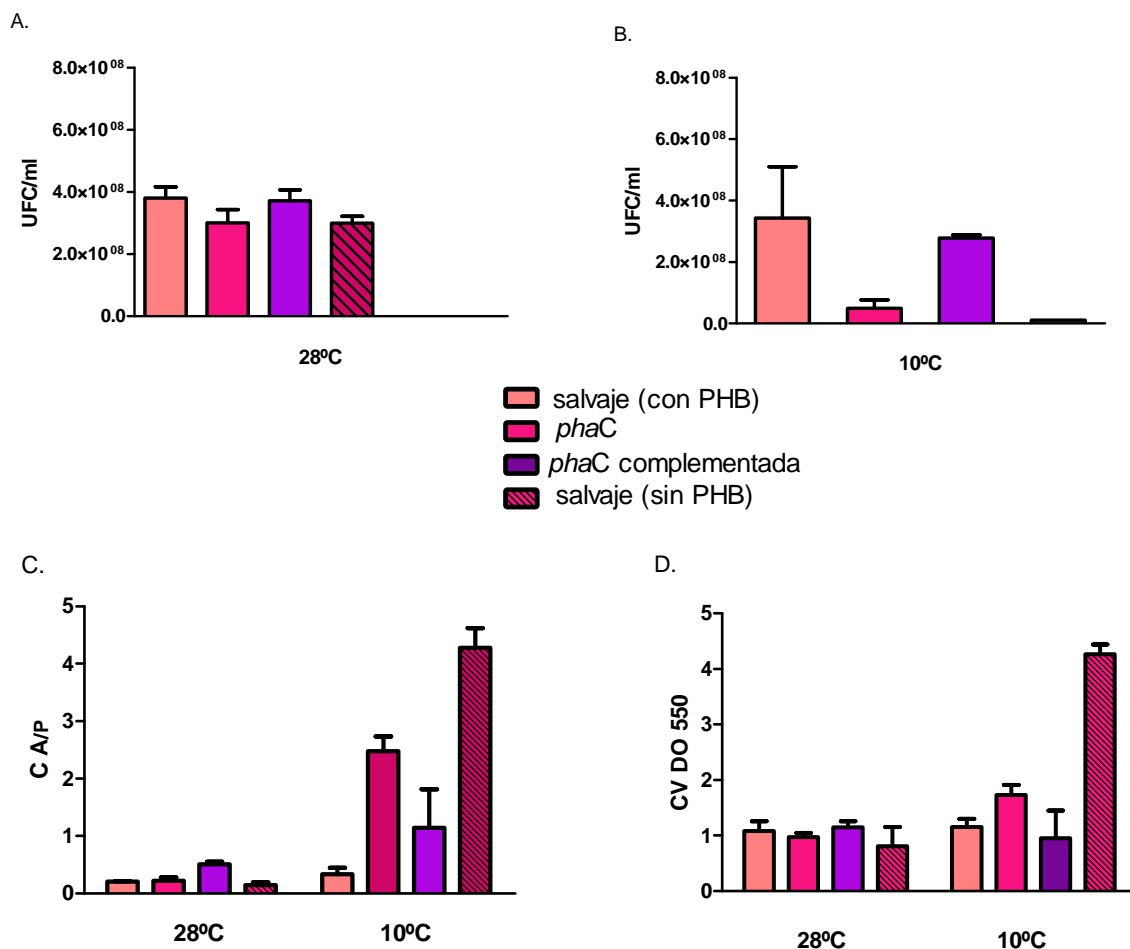


Figura 38: Biofilms a diferentes temperaturas. **A.** Recuento total de células 28°C. **B.** Recuento total a 10 °C. **C.** Cociente de células adheridas (A) y planctónicas (P). **D.** Biomasa total adherida, DO550 (CV).

También se realizaron mediciones de exopolisacáridos totales (EPS) a ambas temperaturas, debido a que se postula que estos compuestos pueden secuestrar diversos compuestos tóxicos entre ellos las especies reactivas de oxígeno (ROS). Se observó que a 28°C los valores fueron similares entre las cepas ($p > 0,05$). En cambio, a 10°C la cepa mutante presentó un aumento significativo del valor de EPS respecto a los 28°C ($p = 0,002$) y también fue mayor que el valor obtenido para la cepa salvaje a 10°C ($p = 0,001$). Una tendencia similar fue observada para la cepa salvaje en condiciones de no acumulación de PHB entre el contenido a 28°C y 10°C ($p = 0,001$) (Figura 39). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para biofilms (Figura 36).

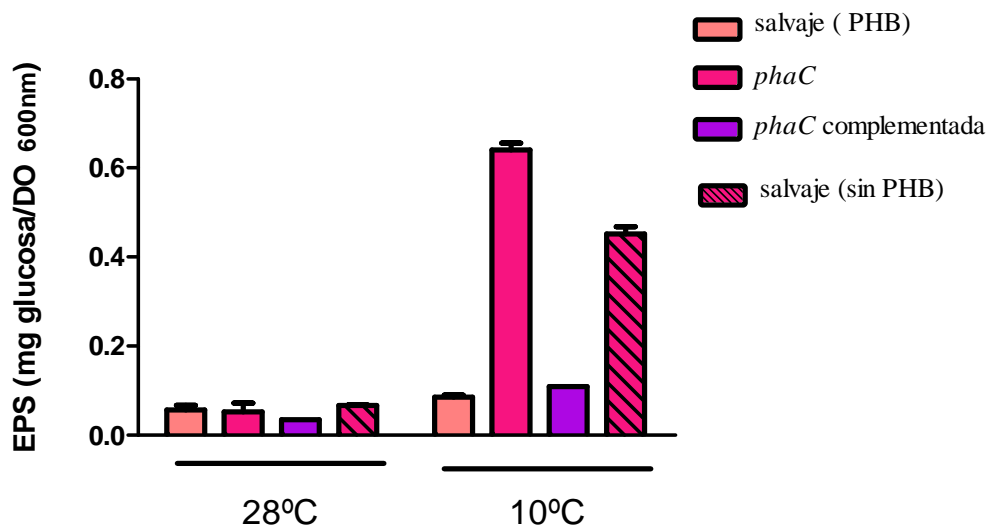


Figura 39: Contenido de EPS totales del biofilm a 10°C y 28°C

Los resultados sostienen la idea que el PHB acumulado permite a la cepa salvaje de *P. extremaustralis* sobrevivir en un estado planctónico en condiciones de estrés por frío, lo que probablemente posibilitaría la colonización de nuevos ambientes. Otro factor importante en la colonización de hábitats es la movilidad bacteriana, por lo que se analizó la relevancia de tres tipos de movimientos tanto a 28°C como a 10°C: *swarming*, *swimming* y *twitching*. En este caso no se empleó la cepa mutante debido a que el crecimiento en placas no es óptimo en condiciones de frío, por lo que se confundiría un crecimiento subóptimo con baja movilidad. Para estudiar el efecto de la acumulación de PHB sobre la movilidad de la cepa salvaje a distintas temperaturas se utilizaron inóculos procedentes de cultivos realizados en condiciones de acumulación y de no acumulación de PHB (con PHB o sin PHB).

Luego de 7 días se observó que a 28°C la cepa salvaje no mostró diferencias significativas en la movilidad tanto si el inóculo inicial había acumulado previamente PHB o no. En cambio, a 10°C la movilidad de la cepa salvaje se incrementó significativamente cuando se partía de un inóculo que había sido cultivado en condiciones de acumulación de PHB. Es interesante destacar que a los 3 días solo la cepa que previamente había acumulado PHB mostró movilidad a 10°C (datos no mostrados). Otro efecto que se observa es que la movilidad a 10°C es menor que a 28°C (Figura 40).

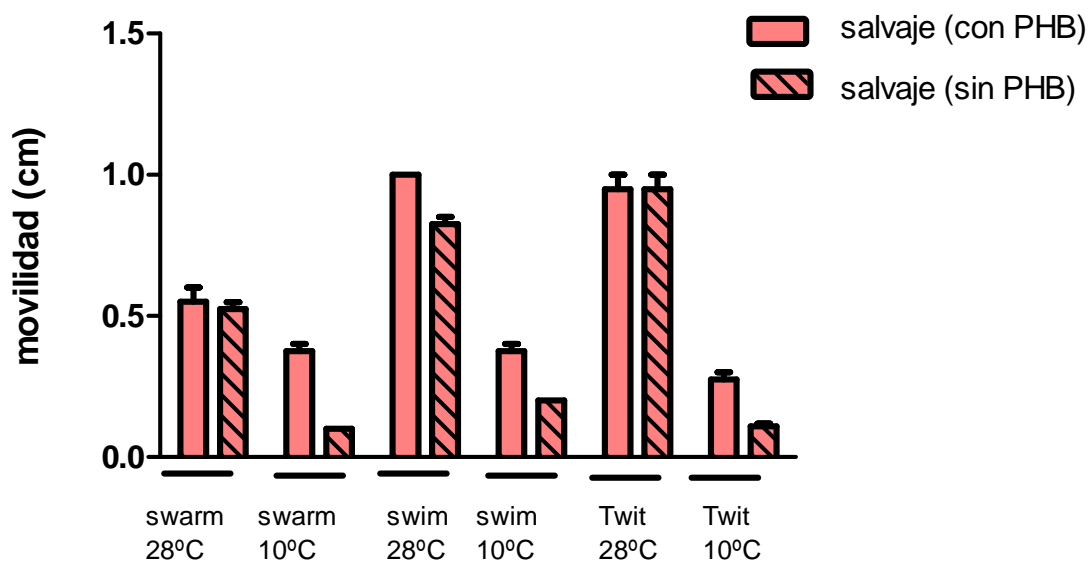


Figura 40: Movilidad de *P. extremaustralis* a 10°C y a 28°C.

Los resultados obtenidos señalan la importancia del PHB en el mantenimiento de la sobrevivencia en estado planctónico y a su vez en el incremento de la movilidad. A su vez, el estilo de vida de biofilm y las condiciones de microaerobiosis permitieron el crecimiento de la cepa *phaC* en condiciones de bajas temperaturas que generan, como ya se ha descrito, especies reactivas de oxígeno produciendo luego daño a compuestos celulares si estos no son detoxificados.

ii) Influencia de Anr sobre la formación de biofilms en *P. extremaustralis*

Como una primera aproximación al estudio de la influencia de *anr* en la formación de biofilms en *P. extremaustralis* se analizó la capacidad de adherencia en condiciones estáticas en placas de 96 pocillos por la técnica de tinción con cristal violeta (CV). La cepa salvaje mostró un índice de adherencia (absorbancia del CV/DO600nm de células planctónicas) mayor que la cepa mutante en estos experimentos (Figura 41), que resultó ser significativa ($p=0,002$).

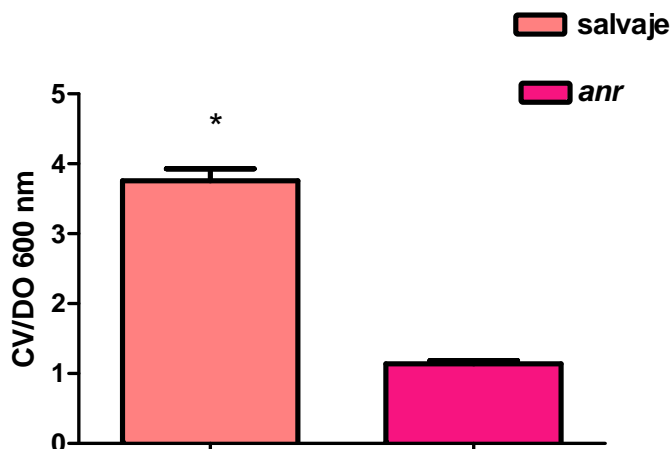


Figura 41: Biofilms estáticos en placas de poliestireno de 96 wells. Se muestra el cociente entre la absorbancia del Cristal Violeta (CV) CV_{550} y las células planctónicas (DO_{600nm}).*: muestra diferencias significativas.

Biofilms en “Glass Bottom Petri Dishes”

Para estudiar con mayor profundidad la formación de biofilms se utilizaron las denominadas “Glass Botom Petri dishes” debido a que son sencillas de emplear, se pueden observar las macrocolonias y las diferentes estructuras directamente al microscopio, lo que además permite realización de varias réplicas y diferentes condiciones. Se realizaron en primera instancia biofilms de 24 horas utilizando las cepas *P. extremaustralis*-GFP y la cepa *anr*-GFP y visualizando los mismos en el microscopio de epifluorescencia, (OlimpusBX56), empleando además una tinción con DAPI.

Los biofilms de ambas cepas, fueron observados a las 24, 48, 72 y 96 horas (Figura 42, 43, 44 y 45), mostrando diferencias cualitativas en el patrón de formación del biofilm. La cepa salvaje presentó formación de macrocolonias con un patrón similar en todos los campos observados. En cambio, la cepa mutante mostró una mayor heterogeneidad respecto a la presencia de estructuras características. En ciertos campos se observó una sola estructura similar a una macrocolonia, mientras que otros mostraron una mayor biomasa aunque en forma menos estructurada que en la cepa salvaje. Esta tendencia fue mayor en el caso de la visualización con GFP.

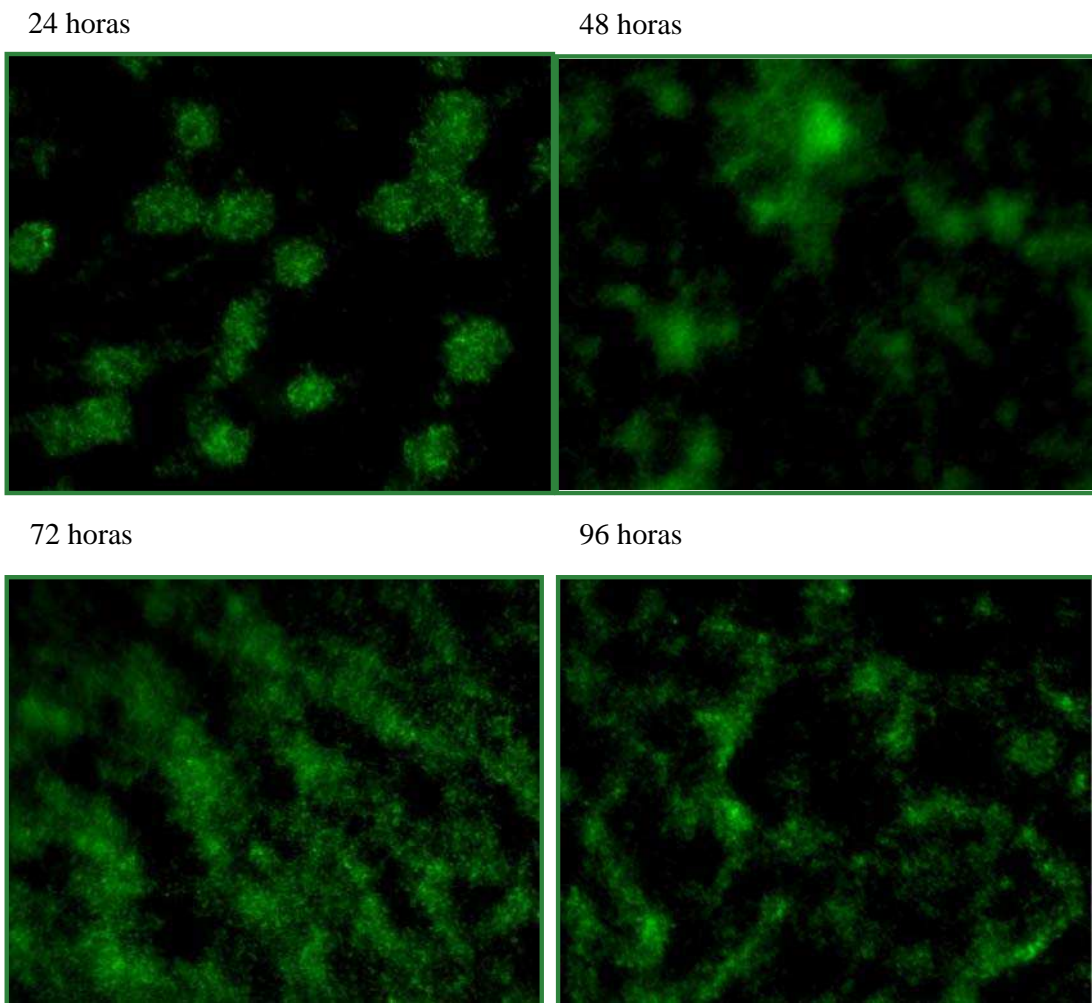
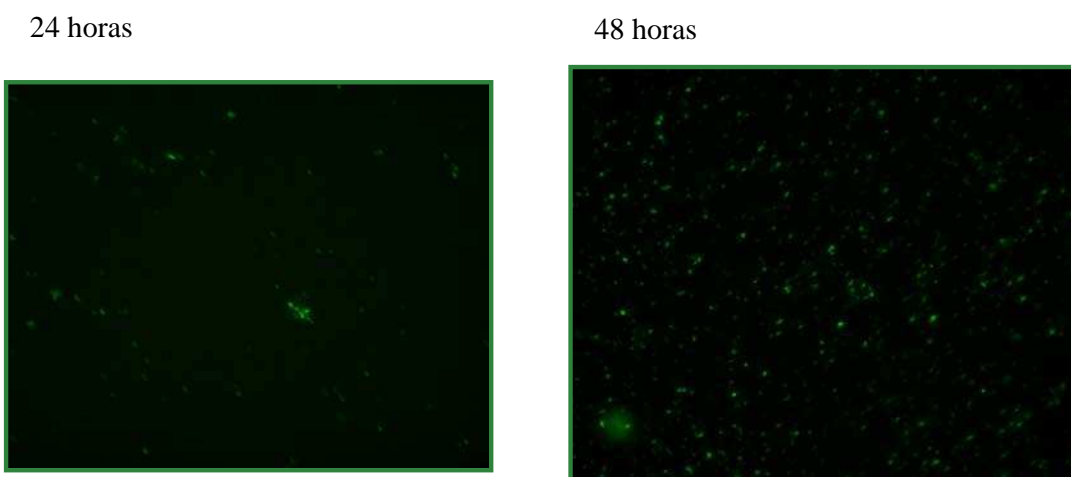


Figura 42: Imágenes de biofilms de *P. extremaustralis* para distintos tiempos de incubación.



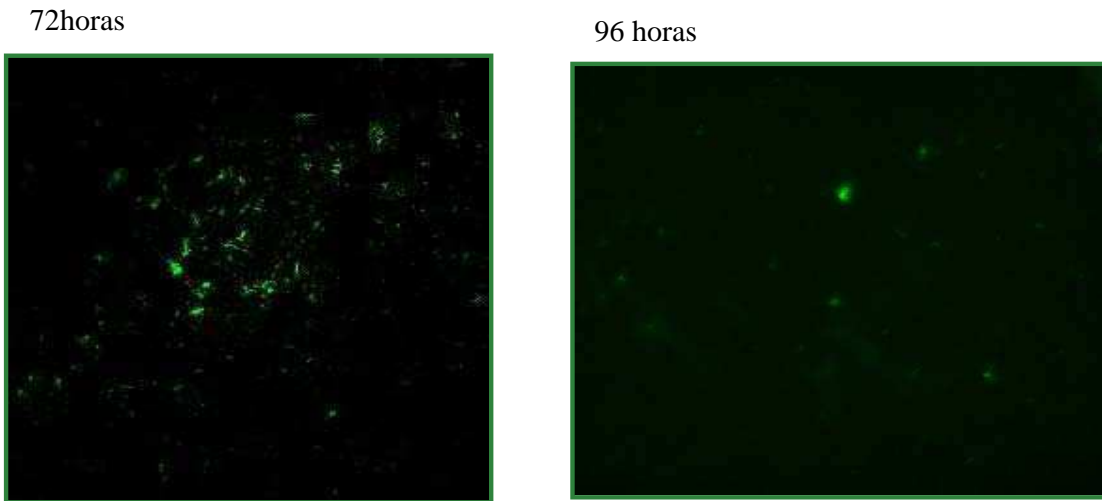
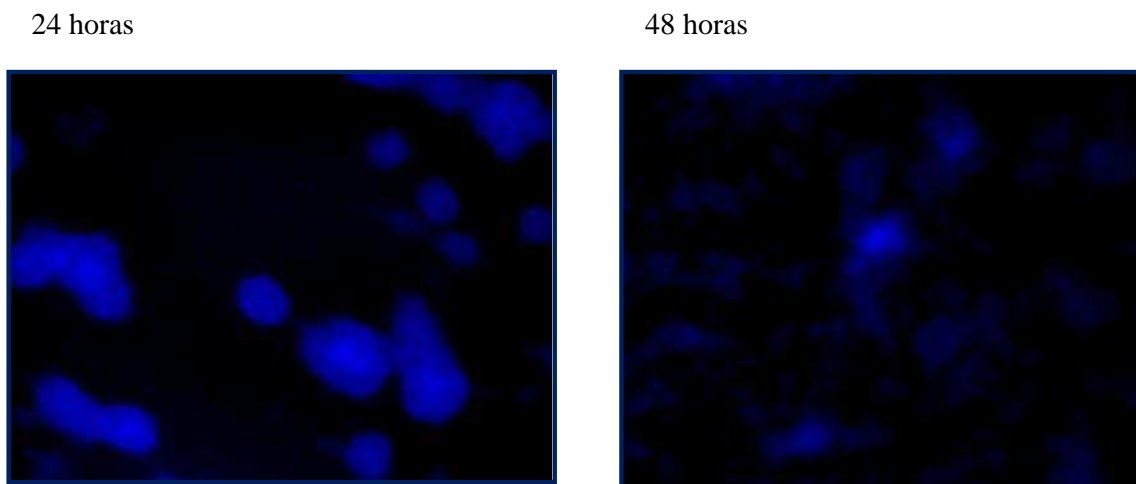
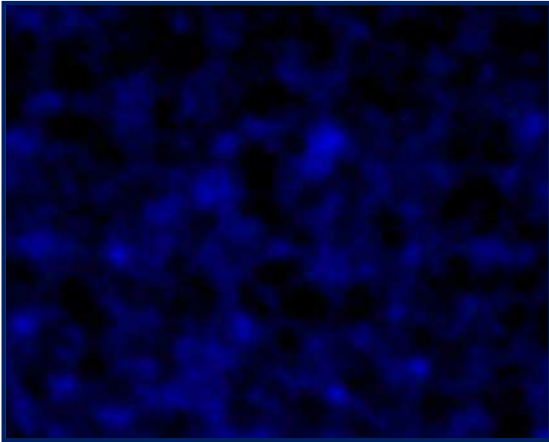


Figura 43: Imágenes de biofilms visualizando GFP en distintos tiempos de la cepa *anr*.



72 horas



96 horas

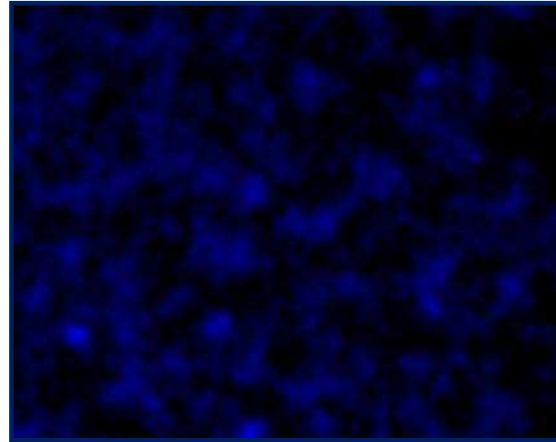
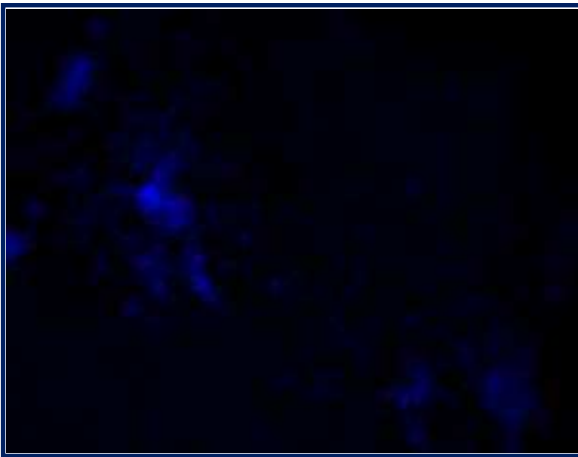
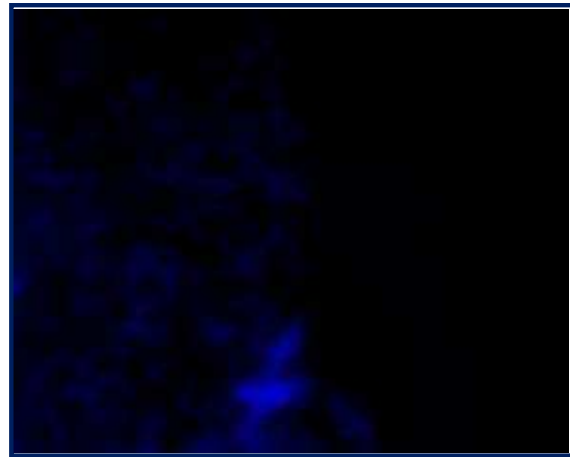


Figura 44: Imágenes de biofilms de teñidos con DAPI *P.extremaustralis* desarrollados durante distintos tiempos.

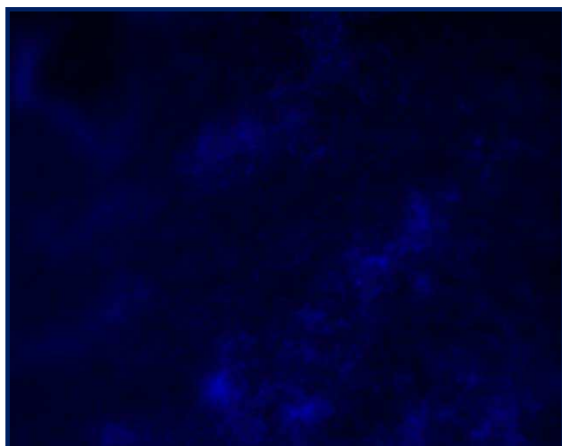
24 horas



48 horas



72 horas



96 horas

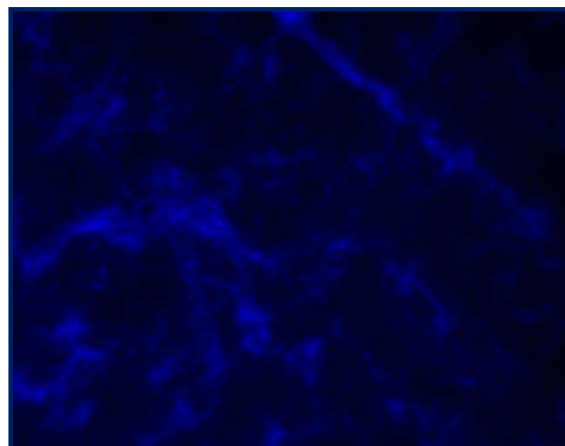


Figura 45: Imágenes de biofilms visualizando DAPI en distintos tiempos de desarrollo *P.extremaustralis anr.*

Utilizando el programa COMSTAT2 se calcularon los parámetros asociados a esta estructura de manera de comparar ambas cepas. Los parámetros estudiados fueron biomasa, grosor promedio, grosor máximo e índice de rugosidad R (Figura 46, 47, 48 y 49). En el caso de la tinción con DAPI en todos los tiempos se observaron diferencias significativas en la biomasa (Figura 46), siendo en todos los casos mayores en la cepa salvaje que en la cepa mutante. También ocurre lo mismo para la biomasa en el caso de la visualización con GFP para todos los tiempos analizados. Para el caso del grosor promedio se observaron diferencias significativas durante las primeras 72 horas para DAPI y para la visualización con GFP las diferencias se observaron a las 24, 72 y 96 horas, en todos los casos el grosor promedio de los biofilms fue mayor para la cepa salvaje (Figura 47). El grosor máximo también mostró una tendencia a incrementarse en la cepa salvaje con diferencias significativas con respecto a la mutante a las 24 y 48 h para GFP y para el caso de la visualización con DAPI las diferencias significativas se encontraron para 24,48 y 96 horas (Figura 48). Por otro lado, el coeficiente de rugosidad (R), que no posee dimensiones, presentó un valor mayor en todos los tiempos en la cepa mutante (siendo significativa la diferencia en todos los puntos, $p < 0.05$) lo que confirma cuantitativamente el mayor grado de heterogeneidad observado cualitativamente. Esto no fue así en el caso de la cepa salvaje que presentó mayor homogeneidad en los campos observados. El índice disminuyó hasta las 72 horas luego de lo cual volvió a incrementarse, probablemente debido a la dispersión del biofilm (Figura 49).

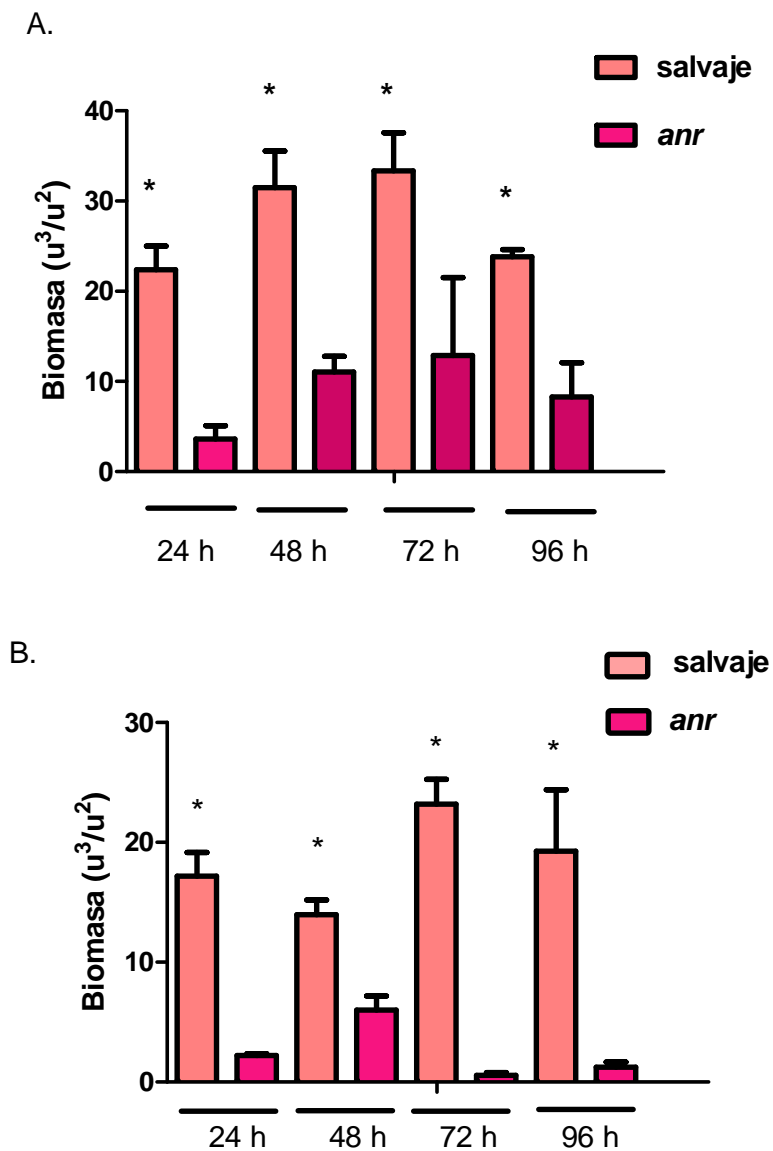
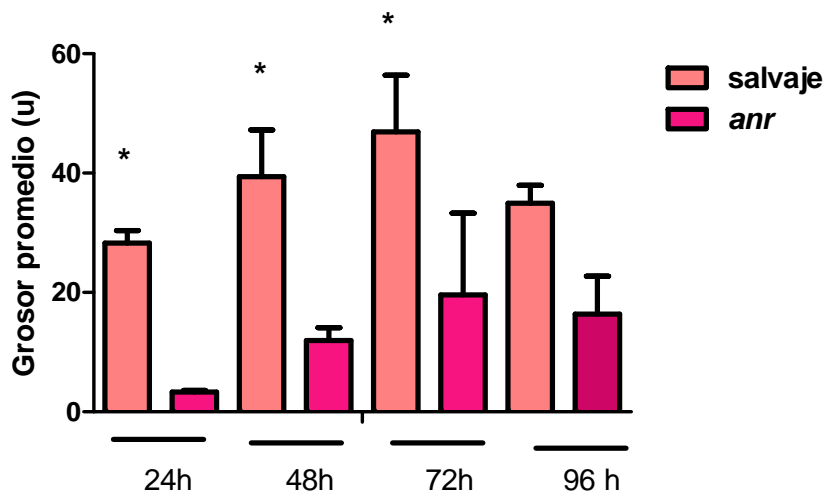


Figura 46: Biomasa (en μ^3/μ^2) **A.** Visualización con DAPI. **B.** Visualización con GFP. Los valores con diferencias significativas para cada tiempo entre salvaje y mutante se señalan con un *.

A.



B.

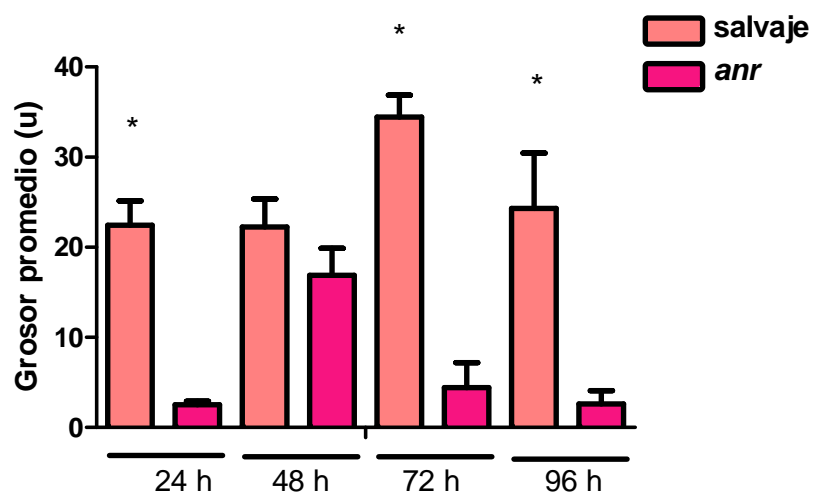


Figura 47: Grosor promedio (en μ) de **A.** Visualización con DAPI. **B.** Visualización con GFP. Los valores con diferencias significativas para los distintos tiempos entre salvaje y mutante se señalan con un *.

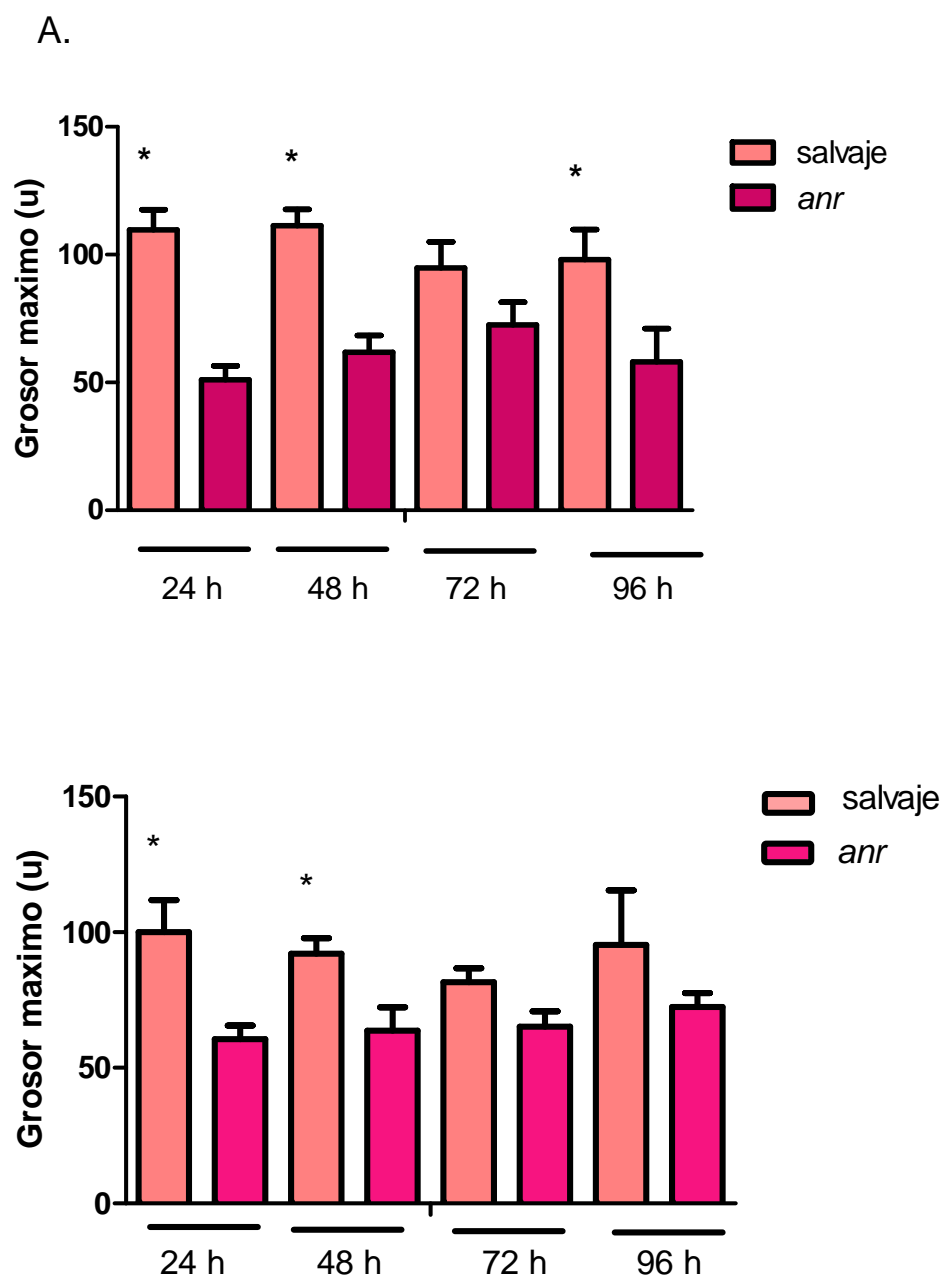


Figura 48: Grosor máximo (en μ) de **A.** Visualización con DAPI. **B.** Visualización con GFP. Los valores con diferencias significativas para los distintos tiempos entre salvaje y mutante se señalan con un *.

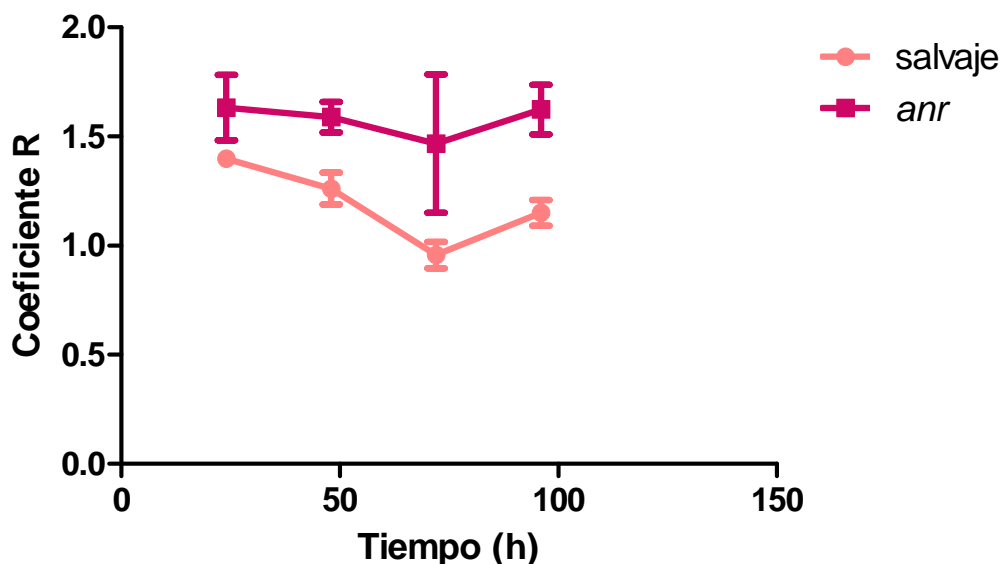


Figura 49: Coeficiente de rugosidad (R) sin dimensiones.

A partir de los resultados obtenidos se plantearon las siguientes hipótesis:

- La deficiencia en el metabolismo microaeróbico produce un menor crecimiento y formación de biofilms.
- Las células de la cepa mutante se adhieren y luego mueren.
- Existe una regulación de Anr directa o indirectamente sobre genes importantes para la formación del biofilm como fimbrias, flagelos, adherencia, etc.

Se llevaron a cabo entonces experimentos para dilucidar si alguna de estas hipótesis puede explicar el fenotipo observado.

Crecimiento planctónico en microaerobiosis

La cepa mutante *anr* posee deficiencias en el crecimiento en bajas tensiones de oxígeno, el biofilm es considerado una estructura microaeróbica, por lo que se realizaron ensayos en los cuales los biofilms se desarrollaban empleando una agitación muy suave de manera de mejorar la disolución del oxígeno. El crecimiento de las células planctónicas de cepa mutante fue menor que el de la cepa salvaje pero similar al valor obtenido en otros experimentos realizados en microaerobiosis (Figura 50.A). Además, al microscopio de fluorescencia, las células de la mutante presentaron señal positiva de GFP (Figura 50. B),

y movilidad bajo el microscopio, indicando viabilidad de las células. Estas muestras fueron tomadas a las 48 horas de formación del biofilm.

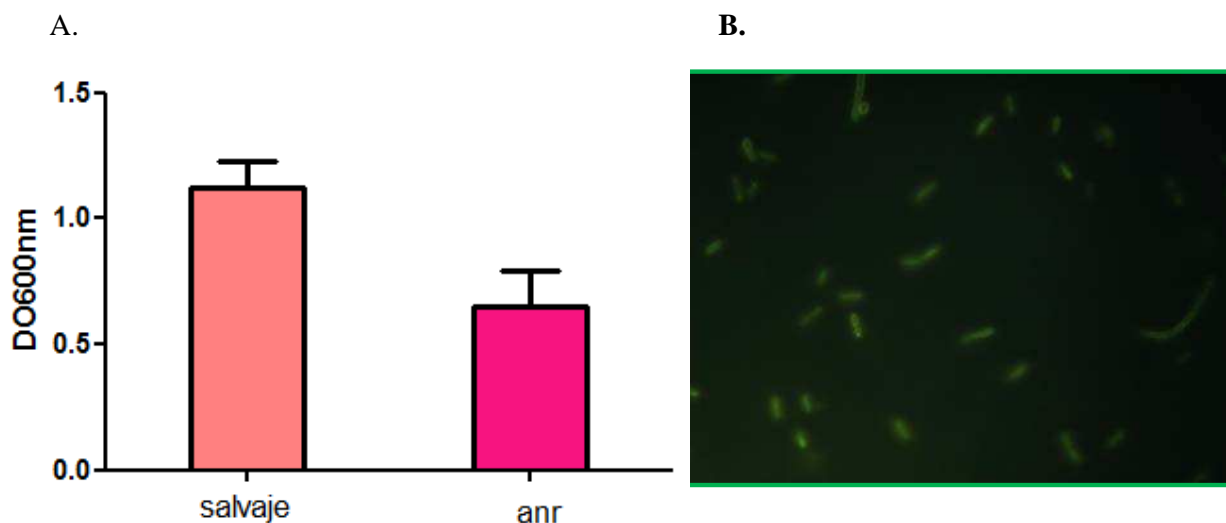


Figura 50: A. Crecimiento planctónico asociado a biofilms. B. Células *anr*- planctónicas

Para determinar si las células presentes en el biofilm se encontraban viables se empleó el colorante yoduro de propidio (IP). Este compuesto ha sido empleado históricamente para discriminar células viables y no viables debido a su imposibilidad de penetrar las membranas de las células vivas. En este caso, observamos que las células de *P. extremaustralis* a las 24 horas se tiñeron en forma similar empleando GFP, DAPI e IP (Figura 51) por lo que esta estrategia no fue adecuada para observar las células muertas en el biofilm.

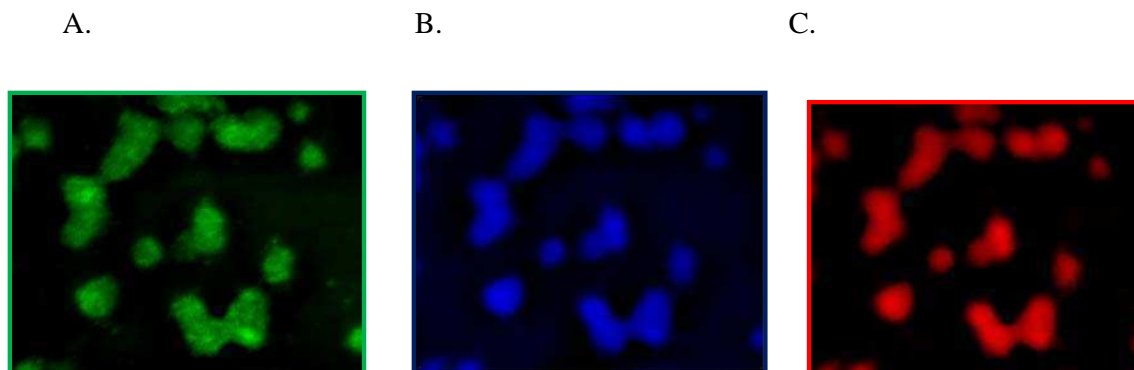


Figura 51: Biofilm de *P.extremaustralis* de 24 horas. A. Observación de GFP. B. Tinción con DAPI. C. Tinción con IP.

Experimentos de adhesión y agregación

La agregación celular puede ser un factor de importancia durante la formación de biofilms, por este motivo se comparó la capacidad de formar agregados entre ambas cepas (Figura 52.A). Se observó una clara deficiencia de la cepa mutante para agregarse en comparación a la cepa salvaje (Figura 52.B, C y D), al menos en el tiempo observado (2h). Estos experimentos coinciden con la deficiencia en la formación de biofilms.

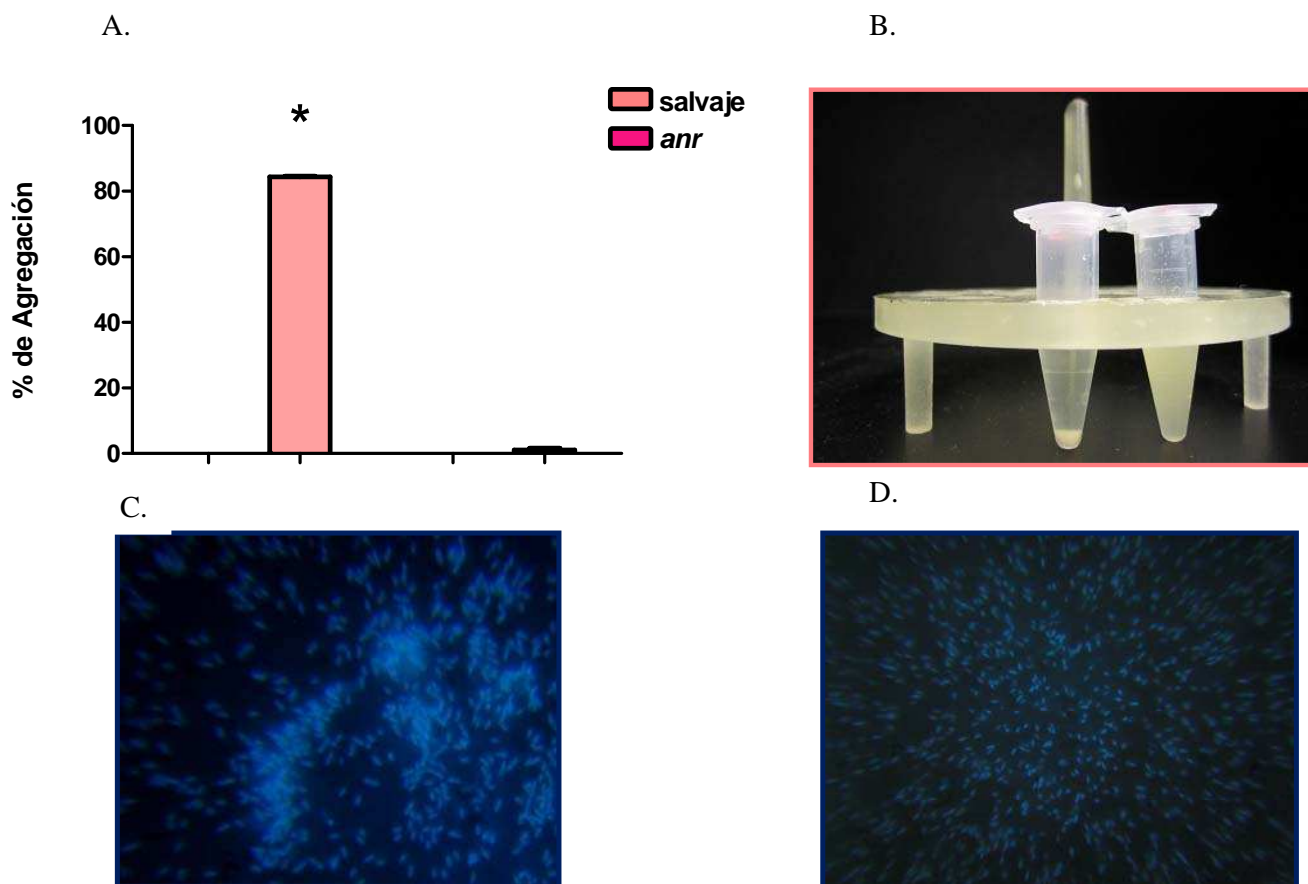


Figura 52: Ensayos de agregación. **A.** Porcentaje de agregación luego de dos horas de incubación estática. *: Indica diferencias significativas. **B.** *P. extremaustralis* salvaje (izquierda) y **C** y la cepa *anr* (derecha) y **D.**

Además de la agregación, otro factor de interés para estudiar los defectos de formación de biofilms es la adhesión a tiempos cortos, que involucra pasos reversibles e irreversibles. Los ensayos se realizaron utilizando la técnica de tinción con cristal violeta. Hasta los 30 min no se observaron diferencias entre ambas cepas, mientras que a partir de los 60 min se comienzan a ver diferencias que aumentan a lo largo del tiempo (Figura 53). Además, el índice de adherencia de la cepa salvaje aumentó a lo largo del experimento, mientras que en la cepa mutante no se observaron diferencias entre los 120 y los 180 minutos de incubación.

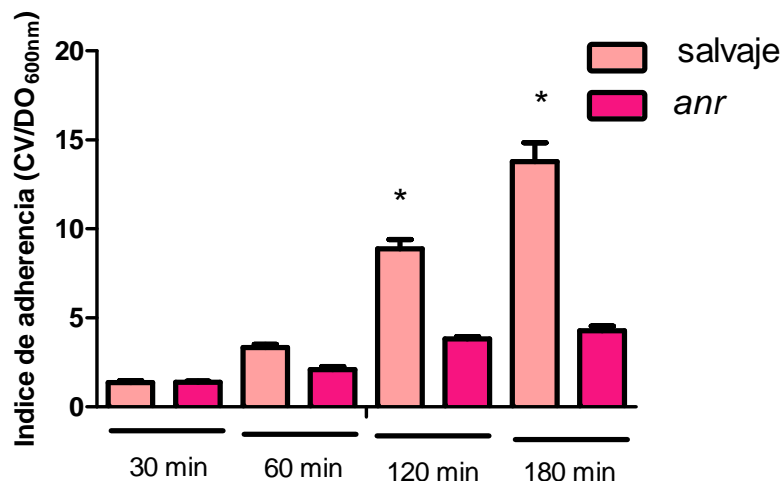


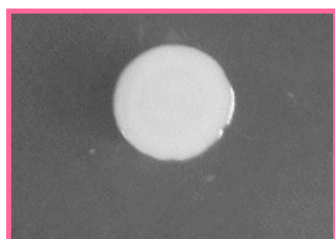
Figura 53: Adhesión a tiempos cortos empleando la técnica de tinción de Cristal Violeta. *: Indica diferencias significativas.

Ensayos de movilidad

Los fenotipos observados tanto en la formación de biofilms, la agregación celular y los defectos en la adherencia inicial podrían ser explicados por alteraciones en la movilidad celular en la cepa *anr* mutante. Para investigar si existen dichas alteraciones se llevaron adelante ensayos de movilidad y observaciones en microscopio electrónico de transmisión de manera de determinar si las células mutantes poseen diferencias en la presencia de flagelos, fimbrias o en alguna de las estructuras externas de las células.

Respecto a la movilidad de tipo *swimming*, dependiente de flagelos, la cepa mutante presentó una mayor movilidad, tal como se puede observar en la Figura 54, algo similar a la movilidad de tipo *swarming*, también dependiente de flagelos aunque no en el caso de *twitching* (no mostrado). Al cuantificar la movilidad de tipo *swimming* se obtuvieron diferencias significativas, siendo la cepa mutante la que presentó el mayor valor promedio (Figura 55), esto guarda relación con los resultados obtenidos anteriormente para biofilms y adhesión.

A.



B.

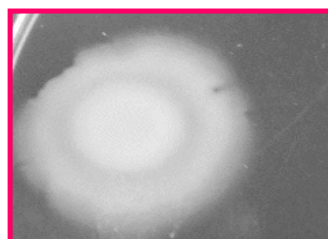


Figura 54: Movilidad de tipo *swimming*. **A.** *P.extremaustralis* salvaje. **B.** *P.extremaustralis anr*

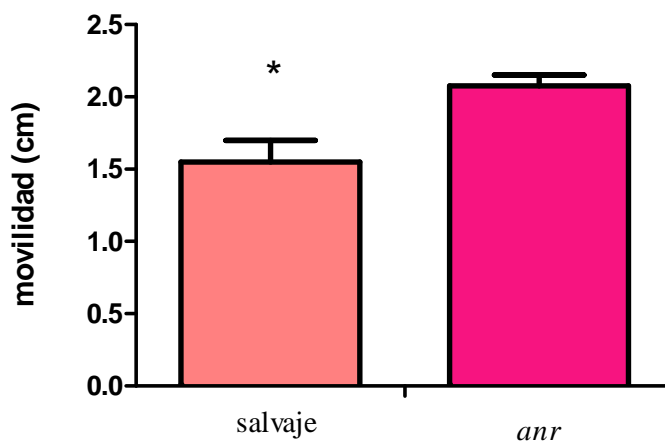
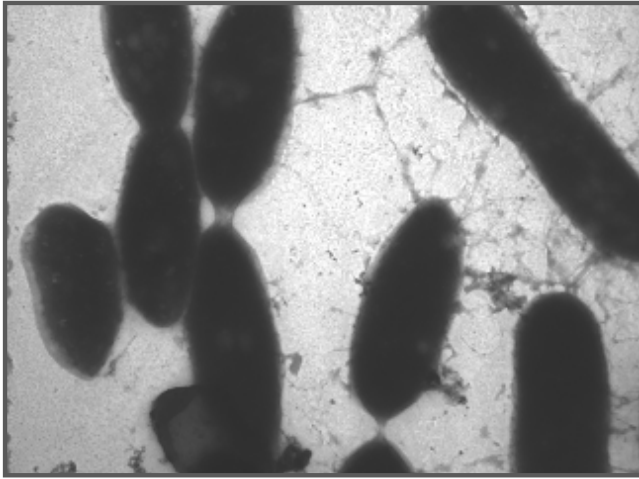


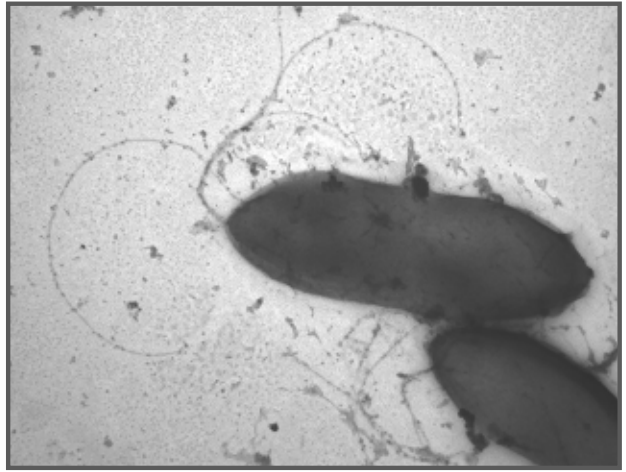
Figura 55: Cuantificación de la movilidad tipo *swimming*. *: Indica diferencias significativas.

En base a los resultados obtenidos fue de interés observar al microscopio electrónico las células de ambas cepas de manera de observar si la presencia de flagelos u otros componentes de importancia para la adhesión y la agregación se encontraban alterados en la cepa mutante. Para llevar adelante las observaciones microscópicas se emplearon células que fueron incubadas previamente dos horas en forma estática, es decir agregadas (Figura 56). Se detectó que la cepa salvaje presentaba flagelos en una menor cantidad de células, mientras que la cepa mutante presentó mayor cantidad de células presentando flagelos y si bien no es posible determinarlo con exactitud, serían más largos que en la cepa salvaje. Estas observaciones son concordantes con una mayor movilidad de tipo *swimming*. Además en la cepa salvaje se pueden observar sitios de contacto entre, al menos, dos células, fenómeno que no resulta claro en el caso de la cepa mutante.

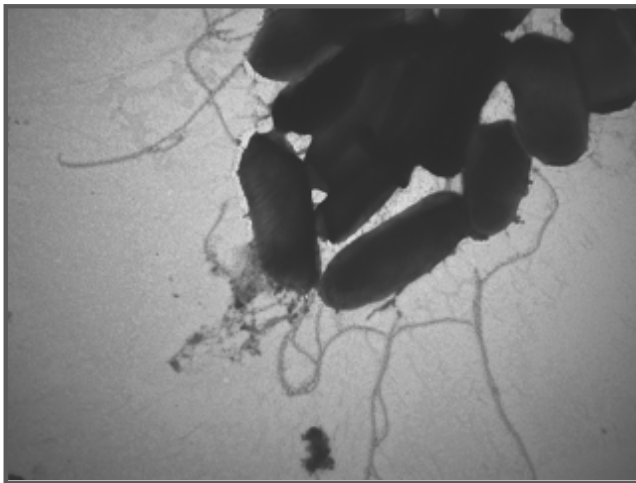
A.



B.



B.



D.

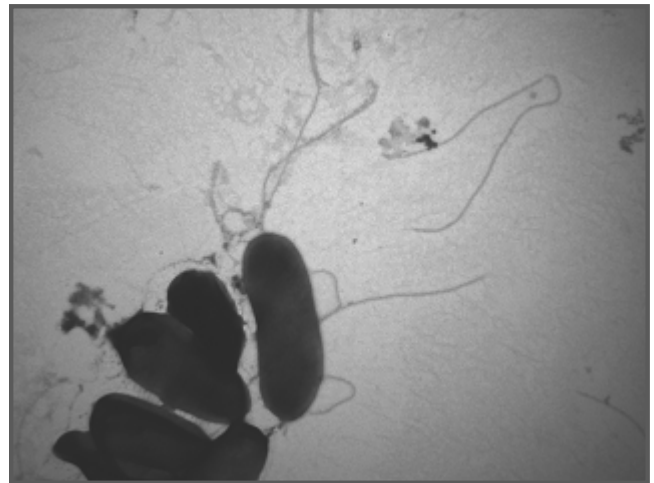


Figura 56: Microscopía electrónica de células **A** (aumento de 15.000X) y **B** (aumento de 20.000X) Cepa salvaje. **C** (aumento de 15.000X) y **D**. Cepa *anr* (aumento de 15.000X)

CAPITULO 5: Predicción del Regulon Anr en *P.extremaustralis*

Durante la última etapa de realización de este trabajo en el laboratorio se obtuvo la secuencia completa del genoma de *P. extremaustralis* lo cual permitió realizar un análisis global de los blancos probables del regulador Anr. Para esto se llevó a cabo un estudio exhaustivo empleando el programa disponible *on line* PRODORIC, que utiliza datos experimentales de *P. aeruginosa* para la construcción de las matrices predictivas en base a dominios conservados de unión a DNA para Anr-Dnr. A partir de este análisis se obtuvieron un gran número de genes que podrían ser blancos probables de regulación por Anr.

Los probables genes que serían blancos de regulación por Anr fueron 167 y se clasificaron según diversas categorías funcionales (Figura 57). Entre los genes esperados se encontró *arcD*, el primer gen del operon arginina deiminasa, genes relacionados con la respiración de nitrato como el transportador de nitrato (constituye el primer gen del operon que codifica subunidades de la enzima nitrato reductasa), proteínas de la reducción del óxido nítrico y citocromos reportados también en *P. putida* KT2440. Por otro lado, se detectaron genes que podrían estar involucrados en la formación de biofilms, como *fliK*, *fglE*, *motA*, *pgaA*, *pilG*, entre otros, involucrados en la movilidad y quimiotaxis. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos. Al clasificarlos por categorías según su función (Figura 57) se puede observar que el grupo mayoritario es aquel que incluye a los genes de respiración (16%), transportadores de pequeñas moléculas (10%), proteínas relacionadas con la resistencia al estrés y de tipo chaperonas (7%), reguladores transcripcionales (9%) y transducción de señales (5%). Estos dos últimos grupos son de importancia debido al efecto sobre distintos procesos celulares que podría explicar los efectos de tipo pleiotrópico que se observaron durante todo el trabajo.

Tabla 11: Blancos probables de regulación por Anr en *P.extremaustralis* basado en análisis *in silico* del genoma

Gen	Función	Posición a partir del ATG
<i>paaN</i>	Aldehído deshidrogenasa	55
<i>cioA</i>	Citocromo bd2, subunidad I	170
	Proteína quimiotáctica aceptora de metilos	499
<i>dnaJ</i>	Chaperona DnaJ	303
<i>groEL</i>	Chaperona GroEL	82
	N-acetiltransferasa, familia GNAT	100

	Betalactamasa putativa	76
	Regulador transcripcional, familia Fnr	134
	Proteína de estrés universal	175
	Transportador ABC, proteína unión a ATP	89
<i>arcD</i>	ArcD (3)	175
<i>treY</i>	Malto-oligosiltrehalosa sintetasa	508
	Proteína hipotética	178
	Betalactamasa putativa	75
	Proteína hipotética	105
	Regulador transcripcional, Crp	134
<i>oprI</i>	OprL bomba	82
	Guanilato ciclasa	109
<i>dinG</i>	Helicasa ATP dependiente, DinG	122
	Proteína Regulatoria, metabolismo de leucina	109
	Oxiquinona reductasa	
<i>hemE</i>	Uroporfirinogeno III decarboxilasa	99
<i>adh</i>	Alcohol deshidrogenasa	64
	Proteína regulatoria hipotética	389
<i>azu</i>	Azurina	79
<i>cbpa</i>	Chaperona clase DnaJ, CbpA	82
<i>adk</i>	Adenilato kinasa	264
<i>phaC/phaR</i>	PHB sintetasa/ Regulador de PHB	
<i>ftsB</i>	Proteína de división celular FtsB	103
	Proteína hipotética	79
<i>lpxO</i>	Dioxigenasa dependiente de Fe(+2)/alfa-cetoglutarato LpxO	131
<i>arcD</i>	ArcD (2)	284
<i>cysB</i>	Cisteína sintetasa	411
	Transportador ABC, proteína unión a ATP	69
<i>hemN</i>	Corpohidrogeno III oxidasa, oxígeno independiente	70
<i>ccoO</i>	Citocromo oxidasa subunidad CcoO	461
<i>ccoN</i>	Citocromo oxidasa subunidad CcoN	98

<i>hrpA</i>	Helicasa ATP dependiente, HrpA	476
<i>urtC</i>	Transportador ABC, permeasa de urea	37
	Transportador de Fe ⁺² tipo ABC	69
<i>hylD</i>	Proteína de secreción, HylD	68
	Proteína hipotética	73
	Coprohdrogeno III oxidasa, oxígeno independiente	72
<i>norD</i>	Proteína de activación de la enzima Nor	91
<i>norC</i>	Óxido nítrico reductasa (NorC)	71
<i>pdxH</i>	Piridoxamina 5' fosfato oxidasa	42
	Transportador ABC de glutamina	154
<i>pepN</i>	Alanina Aminopeptidasa N	103
	Permeasa simporter Na ⁺	75
	Regulador Transcripcional de la familia LysR	102
	Proteína quimiotáctica aceptora de metilos	131
	Proteína sensora histidin kinasa/Regulador respuesta Pas/Pac	156
	Proteína quimiotáctica aceptora de metilos	87
	Proteína de unión a ATP/GTP	437
<i>glnP</i>	Permeasa de Glutamina GlnP	607
	Permeasa de tipo ABC	142
	Regulador Transcripcional de la familia MarR	37
	Regulador Transcripcional de la familia AraC	325
	Resolvasa putativa	110
<i>fliK</i>	Proteína de control del <i>hook</i> FliK	69
<i>pgaA</i>	Secretina PgaA	318
<i>cysW</i>	Transportador de sulfato, CysW	61
	Proteína de estrés universal	81
	Proteína cold shock	137
	CoA-Ligasa de lipidos de cadena larga	237
	Transportador de sulfato	105
<i>lysI</i>	L-Lisin permeasa	95
	Regulador Transcripcional, familia LysR	400

	Fumarato reductasa*	600
	Quinona Oxido-reductasa	66
	Proteína extracelular	141
<i>cls</i>	Cardiopilin sintetasa	237
<i>parA</i>	ParA, proteína de partición	323
<i>proX</i>	Transportador ABC, glicina, betaina	84
	Citocromo soluble	291
	Diguanilato ciclasa con dominio PAS/PAC	156
	Permeasa de la superfamilia de facilitadores mayores	465
<i>arcD</i>	ArcD (perteneciente al operon)	545
	Proteína quimiotáctica aceptora de metilos	439
	Proteína hipotética	56
	Proteína hipotética	167
<i>motB</i>	Proteína motora del flagelo MotB	29
<i>surA</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa SurA	741
	Glucosa-1-fosfato citidiltransferasa	440
<i>aruB</i>	Succinil-arginina hidrolasa	512
<i>nosR</i>	Proteína de maduración NosR	118
<i>zur</i>	Proteína de <i>uptake</i> de Zinc, Zur	210
<i>SsuD</i>	Alcanosulfonato monooxigenasa	823
	Proteína de membrana externa	77
	Pantotenato kinasa III, tipo CoaX	206
<i>secY</i>	Translocasa secY	328
<i>nuoD</i>	NADH-ubiquinona oxidoreductasa C	175
<i>aspA</i>	Aspartato amonio liasa	330
	Proteína hipotética	461
	Proteína hipotética	385
	Helicasa putativa de la familia Dead	670
	Cadena alfa del factor de integración	166
	Monogliceril lipasa putativa	517
<i>fdhD</i>	Formato deshidrogenasa	101
	Porfobilinogeno deiminasa (metabolismo)	65

	sirohemo)	
<i>glnQ</i>	Transporte de Glutamina GlnQ	66
<i>psyR</i>	2-octaprenil-3-metil-6-metoxi-1,4-benzoquinol hidroxilasa	334
	Proteína hipotética	215
<i>ldh</i>	Lactato deshidrogenasa	335
<i>nrdN</i>	Subunidad mayor de la ribonucleotido reductasa clase III (anaeróbica)	101
<i>narK</i>	Transportador Nitrato/Nitrito	74
	Proteína de transporte de Fe+2	76
<i>ppiD</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa ppiD	376
	Regulador Transcripcional	183
<i>flgE</i>	Proteína flagelar del <i>hook</i> FlgE	396
<i>mnmC</i>	Enzima formadora de metilaminometil-2-tiouridina	67
	Proteína quimiotáctica aceptora de metilos	75
	Simporter H+/Nucleosido	395
	Proteína de unión a hierro	180
	Oxido-reductasa, Cadena corta	357
<i>nahH</i>	2-hidroxiuconico semialdehido hidrolasa	72
<i>apt</i>	Fosforibotriltransferasa	127
	Transportador de Zinc, Cadmio, Mercurio y Cobre	205
	Regulador Transcripcional, familia TetR	232
	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferase	146
<i>hisG</i>	ATP fosforibosil tranferasa, subunidad catalítica	96
<i>rlpA</i>	Lipoproteína A	476
<i>pepN</i>	Aminopeptidasa N	368
	Proteína hipotética	61
	Lipoproteína	350
	Proteína de transmembrana	184
<i>motA</i>	Proteína canal de protones MotA	131
	Proteína de capsida bacteriofago	369

	Proteína represora de bacteriofago	180
<i>pilG</i>	Biogénesis de pili tipo IV	586
	Biogénesis de pili tipo IV	326
	Probable proteína de transportador ABC	711
<i>ahpC</i>	Alkil hidroxiperoxido reductasa subunidad C	544
<i>morA</i>	Transducción de señales	90/410
	Transportador UDP-galactosa-lípido tranferasa	77
	Transportador dependiente de Mg ⁺² y ATP	78
	Transportador tipo ABC	76
	Proteína hipotética	215/72
<i>clpB</i>	Proteína chaperona	150
	3',5'-ciclo-nucleotido fosfodiesterasa probable	461
	Xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa/ Fructosa-6-fosfato fosfocetolase (Vía pentosas fosfato)	83
<i>modA</i>	Proteína periplasmica de unión a molibdeno	254
	Bacteriorreritina	243
	Probable Ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa	35
	Probable factor de transcripción familia MerR	416
<i>gshB</i>	Glutation sintetasa	79
	Proteína con dominio GAF/GGDEF/EAL	150
	Transportador general tipo MSF	160
	Probable proteasa	398
	Probable Lisina decarboxilasa 2	397
<i>yhbH</i>	Proteína de hibernación del ribosoma	200
<i>mobA</i>	Proteína de biosíntesis de dinucleotido guanina-molibterina	103
	Probable Oxidasa multicobre	157
<i>clpS</i>	Adaptador de proteasa ATP dependiente	397/107
<i>cspD</i>	Proteína <i>cold shock</i>	243
	Represor de la familia HexR	303
<i>fusE</i>	Proteína de resistencia del ácido fusarico	299
	Probable citocromo tiol	71
<i>hpa2</i>	Histona Acetiltransferasa	410/233

<i>gnaA</i>	Gama-glutamyl-putrescina sintetasa (L-glutamyl sintetasa)	393
<i>puuD</i>	Gama-glutamyl-GABA hidrolasa	293

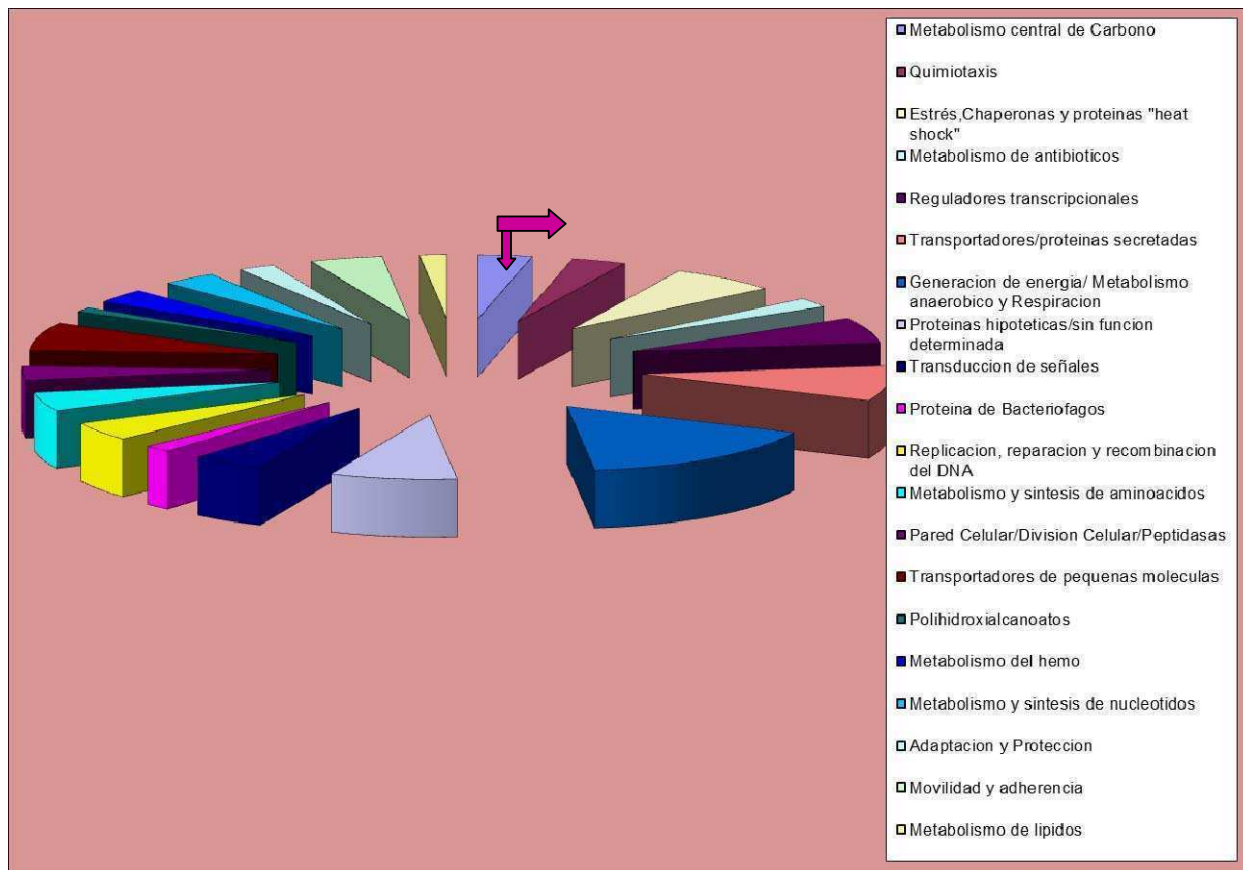


Figura 57: Clasificación de los blancos predichos en el genoma de *P. extremaustralis*. La flecha marca el inicio de los grupos funcionales mencionados, mientras que la lateral marca el sentido de lectura del gráfico.

Utilizando los posibles sitios blancos encontrados no solo con el programa PRODORIC sino también aquellos encontrados en forma manual durante diversos estudios (ej: *phaC/phaR*, *morA*, *sadB*, *pilG*) se construyó mediante el programa LOGOS la matriz consenso que corresponde a los sitios de unión de Anr en *P. extremaustralis*. El sitio consenso para Anr presenta dos "hemi-boxes" mayormente conservados, con 5 bases que son más variables, aunque en *P. aeruginosa* presentan cierto grado de conservación. En este caso, las bases más conservadas en otras especies también se hallaron en

P. extremaustralis, mientras que las bases que se encuentran entre los dos hemi-boxes no presentan la conservación que se da en *P. aeruginosa* (Figura 58). Esto pudo provocar que algunos genes que podrían ser regulados por Anr no fuesen detectados por el programa.

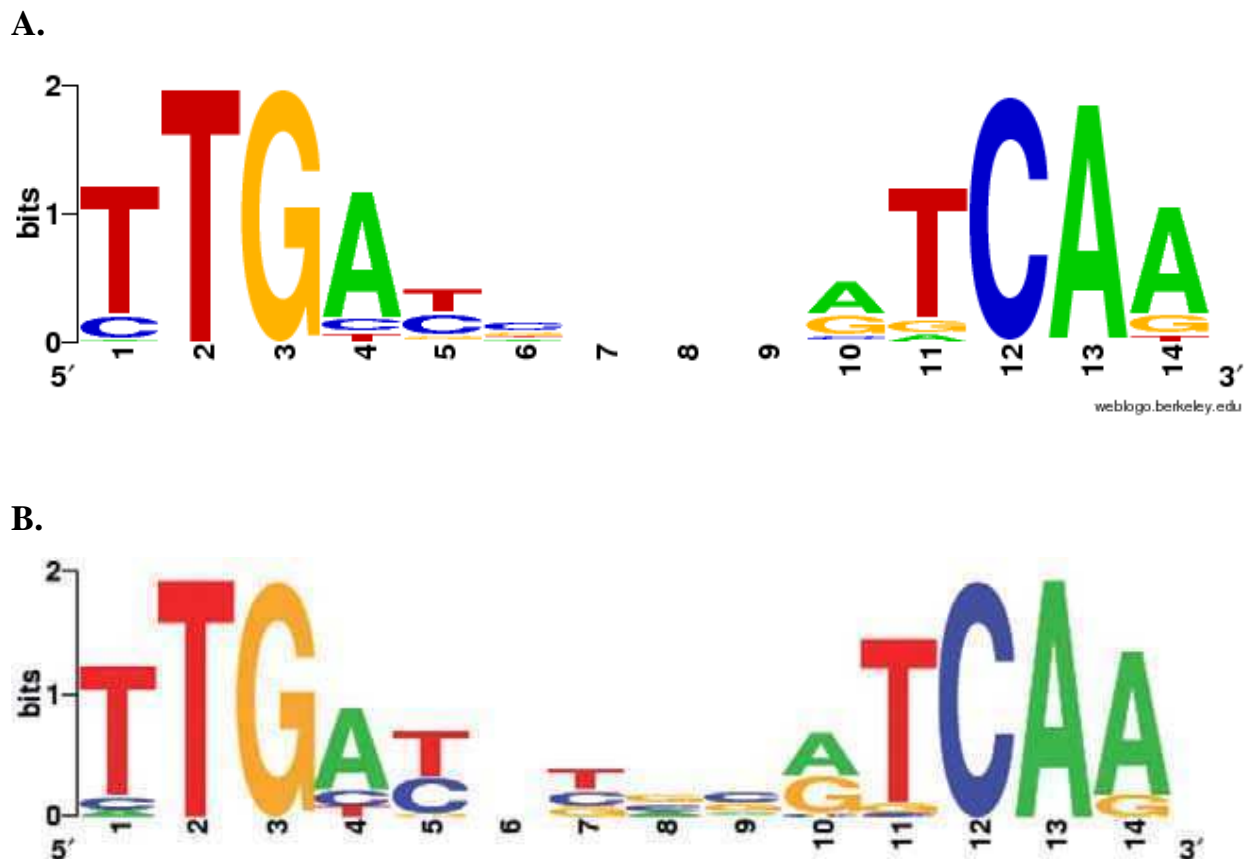


Figura 58: Matriz de posiciones de la secuencia blanco de Anr. A. *P. extremaustralis* B. *P. aeruginosa* (Trunk et al., 2010)

A partir de los datos obtenidos es posible analizar con la relación entre los diversos fenotipos descriptos, no solo en este trabajo sino también en la bibliografía obtenida, y los posibles genes blanco para este regulador transcripcional que tendría gran importancia en la fisiología de las especies del genero *Pseudomonas*.

Discusión

Metabolismo de *P. extremaustralis* en condiciones de baja tensión de oxígeno y el papel de *Anr*

El oxígeno es uno de los compuestos mas influyentes para la fisiología bacteriana, tanto para aquellas especies que lo requieren para obtener energía como para aquellas para las cuales es tóxico (Holm et al., 2006). Para las especies que lo requieren en la generación de energía, las adaptaciones necesarias para sobrevivir y crecer en condiciones de microaerobiosis son muy importantes en la colonización de diferentes hábitats. En esta Tesis se han abordado dos de los metabolismos más importantes en bajas tensiones de oxígeno en especies del género *Pseudomonas*: la utilización del nitrato y la fermentación de L-arginina. Durante la última etapa de este trabajo estuvo disponible el genoma completo de *P. extremaustralis*, lo que nos permitió el análisis de los genes relacionados con dichos metabolismos.

Durante mi Tesis de Licenciatura habíamos señalado la incapacidad de *P. extremaustralis* de generar compuestos gaseosos de nitrógeno en cultivos con bajo oxígeno en presencia de nitrato. En este trabajo observamos durante los ensayos en biorreactor una acumulación importante de NO_2^- en el medio de cultivo, acorde a lo observado anteriormente. Al realizar el análisis bioinformático de los genes de que participan en este proceso, se encontraron los genes completos de la reducción de nitrato, es decir los genes involucrados con el transporte, detección y reducción del mismo, *narL*, *narK* y todas las subunidades que componen la nitrato reductasa (Nar). Las secuencias proteicas (deducidas de las nucleotidicas) presentaron una alta similitud con proteínas pertenecientes a especies del genero *Pseudomonas*, como *P. fluorescens* WH6, pero también con especies de otros géneros, como por ejemplo en el caso de *narK* o *narL*, en las que se observó una alta similitud con especies del genero *Burkholderia*. Es importante señalar que la comparación de otras regiones del genoma del *P. extremaustralis* también muestra similitud con este genero perteneciente a las β -Proteobacterias. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que *P. extremaustralis* posee una isla genómica de adaptabilidad (Ayub et al., 2007) en la cual se encuentran, entre otros, los genes de producción de PHB. En esa región

del genoma el contenido de GC varía considerablemente y los genes *phaB* y *phaC* poseen una alta similitud con otros procedentes de especies del género *Burkholderia*. Por otro lado, para los genes que constituyen la enzima Nar, como ya se mencionó, la similitud fue más clara con especies del género *Pseudomonas*, entre ellas *P. stutzeri* A015, una vez más es interesante destacar que la isla de adaptabilidad encontrada en *P. extremaustralis* es muy similar a una hallada luego en *P. stutzeri* A015. Además se ha detectado fenotípicamente la generación de nitritos en *P. extremaustralis*, siendo capaz entonces de emplear el nitrato como aceptor de electrones. Además al realizar comparaciones de genoma completo basado en homología de función, se observó que los genes que codifican para la enzima Nap no se encuentra presente en el genoma de *P. extremaustralis*. Estas enzimas periplásmicas (a diferencia de la enzima Nar que se encuentra ubicada en la membrana plasmática) están involucradas en la reducción del nitrato a nitrito pero independientemente del oxígeno y tiene como función el mantenimiento del estado redox celular y no la generación de energía, aunque si se las ha relacionado con la desnitrificación aeróbica, un fenómeno aun no entendido totalmente (Bedzyk et al., 1999). La enzima Nap también se la ha asociado a la generación de óxido nítrico, un compuesto que tendría importancia fisiológica.

El paso siguiente en la desnitrificación es la reducción del nitrito (NO_2^-) generado a óxido nítrico (NO), los resultados indicaban que *P. extremaustralis* era incapaz de realizar este paso ya que se observó la acumulación de nitritos, fenómeno que no se da en organismos desnitrificadores como *P. aeruginosa* y sí en mutantes para la enzima nitrito reductasa (Carlson y Ingraham, 1983; Ye et al., 1992). Este fenotipo podía deberse a distintas causas, pero al analizar cuidadosamente el genoma, no se pudieron hallar los genes, exceptuando el gen *nirM*. Estos hallazgos concuerdan con el fenotipo observado.

Otras especies de *Pseudomonas*, como *P. putida* KT2240, tampoco son capaces de realizar un proceso de desnitrificación completo, pero *P. extremaustralis*, a diferencia de *P. putida* KT2440 y *P. fluorescens* Pf-5 (la más similar a *P. extremaustralis*), posee los genes de las enzimas Nor y Nos involucradas en los pasos subsiguientes, lo que podría indicar una pérdida secundaria de la habilidad para realizar el proceso completo. La secuencia proteica deducida de los genes de reducción del óxido nítrico a óxido nitroso

(enzima Nor) mostró una alta similitud con proteínas de *P.fluorescens* WH6, *P.aeruginosa* y en algunos casos como por ejemplo: *norB*, *norC* y *norD* también con proteínas de *Bordetella petri*.

Se ha observado que el NO, considerado segundo mensajero, influye en la división celular observándose un alargamiento de células en condiciones de desnitrificación que no se da en mutantes incapaces de generar NO (Yoon et al., 2011). En el caso de *P.extremaustralis* la cual no presenta ni la enzima Nap, ni es capaz de desnitrificar, presentó en las fotografías de microscopía de barrido el alargamiento celular así como la cepa *anr* que no es capaz de generar nitritos, mostrando entonces que podría haber otra fuente de generación de NO o una señalización diferente a la encontrada en *P.aeruginosa*.

Actualmente el análisis de los procesos respiratorios que tienen lugar en condiciones de baja tensión de oxígeno ha recibido gran atención debido a su importancia durante las infecciones de *P.aeruginosa* en pacientes que padecen fibrosis quística. Sin embargo, aún que mucho por conocer en este campo y también es necesario conocer su relevancia en los ambientes naturales, dado que estos procesos podrían tener importancia para entender procesos básicos tales como la colonización de nuevos nichos ecológicos, la supervivencia en los suelos o la interacción con especies vegetales, entre otros. Muchas de las especies de *Pseudomonas* más estudiadas no son capaces de transformar el NO_3^- a N_2 . A diferencia de varias de ellas *P.extremaustralis* aún conserva una gran batería de genes, que podrían tener relevancia en su fisiología.

La fermentación del aminoácido L-arginina está siendo estudiada en la actualidad con más interés ya que se ha determinado que podría ser de gran importancia en la transición de aerobiosis a microaerobiosis. La expresión de los genes involucrados en este metabolismo se encuentra aumentada tiempos cortos durante incubaciones en anaerobiosis (Trunk et al., 2010). *P.extremaustralis* es capaz de utilizar arginina como fuente de energía tal como se desprende de los experimentos de crecimiento, UFC/ml y de actividad enzimática de la enzima clave, arginina deiminasa (ADI). Además el análisis bioinformático mostró que los genes están presentes en el genoma y las secuencias proteicas deducidas mostraron una alta similitud con otras proteínas de este camino

metabólico, de especies del genero *Pseudomonas*, como *P. stutzeri* A015, *P. putida* KT2440 y *P. aeruginosa* PAO-1.

Los resultados obtenidos son consistentes entre si y confirman la habilidad de *P. extremaustralis* de sobrevivir y crecer cuando el nivel de oxígeno se vuelve limitante. Los dos fenotipos estudiados dependen directamente de la activación de esas vías metabólicas por Anr, el regulador maestro del metabolismo anaeróbico del género *Pseudomonas* (Galiman et al., 1991). El rol de Anr de *P. extremaustralis* ha sido estudiado empleando diferentes aproximaciones en este trabajo. Este regulador global está cobrando gran importancia debido a que recientemente se ha determinado que existe una gran cantidad de genes que podrían ser también blanco de acción de este regulador en *P. aeruginosa*, tal como se ha descrito en la Tabla II. Las funciones de los distintos genes blanco van desde el metabolismo energético en condiciones de baja tensión de oxígeno, aerotaxia, fimbrias y muy recientemente con el *quorum sensing* (Ye et al., 1994; Eschbach et al., 2004, Sonnleitner et al., 2011). En el caso de *P. extremaustralis*, fue de principal interés el estudio de la influencia de este regulador en la síntesis de PHB. Al momento de comenzar este trabajo existían algunos antecedentes relacionando reguladores globales y la síntesis de PHA, como el caso de CydR en *Azotobacter vinelandii* (Wu et al., 2001) en productores naturales, o los estudios de *arcA* en cepas de *E. coli* recombinantes capaces de producir PHB, desarrollados por otro grupo de nuestro laboratorio (Nikel et al., 2006). En el caso de *P. extremaustralis* se había identificado en la zona promotora de los genes de síntesis de PHB una secuencia conservada de unión a Anr, Anr-box1 (Ayub, 2009), y durante esta Tesis se identificó otro Anr-box2 conservado en la zona promotora de estos mismos genes. Por lo tanto se planteó la hipótesis de una posible regulación de esta proteína maestra sobre la síntesis del polímero.

La estrategia elegida para investigar la regulación de los genes PHB por Anr fue la construcción de una cepa mutante de este regulador y la utilización de cultivos en biorreactor en condiciones de aireación. El empleo del biorreactor fue ventajoso debido a que Anr poseería mayor actividad a menor tensión de oxígeno (Ye et al., 1995) y en el equipo empleado fue posible la generación de distintas condiciones de oxigenación.

Los resultados obtenidos muestran que la síntesis de PHB está fuertemente influenciada por la tensión de oxígeno. En la cepa salvaje, el contenido de PHB fue mayor en microaerobiosis que en condiciones de alta aireación, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. En el caso de la cepa mutante, la acumulación del polímero se vio severamente afectada tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. En concordancia con esto, la expresión de varios genes involucrados en síntesis de PHB fue mayor siempre en la cepa salvaje en condiciones microaeróbicas. En el caso de la cepa *anr* la expresión de los genes se vio fuertemente disminuida en ambas condiciones. Si bien está tradicionalmente aceptado que el PHA se acumula en fase estacionaria (Anderson y Dawes, 1990; Ruiz et al., 2001), en *P.extremaustralis* la expresión de los genes es detectada tempranamente así como la acumulación del polímero en microaerobiosis. Los resultados demuestran que Anr tiene influencia sobre la transcripción de los genes de síntesis de PHB acorde con los Anr-box encontrados en la zona promotora del *cluster*, aunque la regulación directa de esta proteína sobre el promotor necesita ser confirmada experimentalmente. Este es el primer resultado que señala la influencia positiva (activación de genes) de este regulador sobre la síntesis de los PHA, ya que trabajos realizados con CydR en *Azotobacter vinelandii* mostraron una influencia negativa sobre la acumulación del polímero. La fisiología general de *A. vinelandii* difiere respecto a especies del género *Pseudomonas*, los resultados de estos trabajos muestran que los reguladores globales resultan de interés para el estudio de la producción del polímero.

La acumulación de los polihidroxicanoatos es afectada también por diversos factores celulares, entre ellos la fuente de carbono y la disponibilidad de poder reductor, se encuentran entre los más importantes, tanto en cepas productoras naturales como cepas de *E.coli* recombinantes para la producción del polímero (Ruiz et al., 1995, Ruiz et al., 2004, Nickel et al., 2006). Debido a los defectos de crecimiento observados en la cepa *anr* mutante y de la disminución de la síntesis de PHB, se estudió el efecto de esta regulación sobre distintos parámetros relacionados con el estado redox celular, la resistencia a estrés y la producción de otros polímeros.

El estado redox celular es un parámetro de gran importancia que influye en distintos procesos metabólicos, en particular la producción de PHB está fuertemente afectada por la disponibilidad de poder reductor. En *P.extremaustralis* el cociente redox total ($\text{NADH} + \text{NADPH} / \text{NAD}^+ + \text{NADP}^+$) fue mayor en microaerobiosis que en aerobiosis; este resultado es esperado debido a que normalmente a baja tensión de oxígeno el estado redox es más reducido. En la cepa mutante el cociente global redox resultó menor en ambas condiciones en comparación con la cepa salvaje, siendo considerablemente menor en microaerobiosis, condición en la que Anr es activo. En *E.coli* mutantes para el regulador redox ArcA y para Fnr presentan un cociente redox aumentado en condiciones de microaerobiosis debido a un exceso de poder reductor (Alexeeva et al., 2003). Si bien estos resultados parecerían contrarios a lo observado en la mutante *anr*, en *E.coli* tanto ArcA como Fnr regulan enzimas claves del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) que provoca este fenómeno al mutar estos reguladores así como un desvío al metabolismo hacia procesos de tipo fermentativo (Shalel-Levanon et al., 2005). Esto no ocurriría en *P.extremaustralis* debido a que no se encontraron genes de este tipo que posean Anr-box en la región promotora.

Por otro lado, un factor de gran importancia para entender o analizar los resultados del estado redox de un microorganismo (además de la tensión de oxígeno, la fuente de carbono, de nitrógeno, la presencia de factores de estrés) es la presencia de enzimas transhidrogenasas, capaces de convertir el NADH a NADPH. Existen evidencias genéticas de la presencia de estas enzimas en especies de *Pseudomonas*, como *P. fluorescens* (Fuhrer y Sauer, 2008). Este mismo trabajo, muestra que en *P.fluorescens* la mayor parte de las enzimas involucradas en el catabolismo utilizan al NADP/NADPH como cofactor. Esto apoyaría las observaciones realizadas en *P.extremaustralis* en las cuales se pudo observar una mayor proporción de $\text{NADPH} / \text{NADP}^+$ en comparación con la cupla redox $\text{NADH} / \text{NAD}^+$. El estado redox celular es un importante factor a tener en cuenta durante la producción de PHA, especialmente a partir de glucosa. Por ejemplo, en *Escherichia coli* recombinante, productora de PHB, la acumulación de este polímero se ve aumentada en condiciones microaeróbicas en una mutante del regulador global redox ArcA, que presenta

un alto contenido de poder reductor (Nikel et al., 2006). Además la producción de PHA también se ve regulada por el cociente NADH/NAD⁺ en *P. putida* U (Ren et al., 2010).

El menor cociente redox encontrado en la cepa mutante y una mayor actividad en la cadena respiratoria, especialmente en microaerobiosis, podría estar relacionado con diferencias en la resistencia al estrés oxidativo. Si bien en estudios de arrays y proteómica en *P.aeruginosa*, el gen *kataA*, que codifica para la enzima catalasa, posee un Anr-box putativo y su expresión se ve disminuida en una mutante para Anr (Trunk et al., 2010) en *P.extremaustralis* no se hallaron Anr-boxes ni con el programa PRODORIC ni en forma manual en las secuencias promotoras de las 3 catalasas presentes. Sin embargo si se encontró una secuencia conservada de unión a Anr en el gen que codifica para la proteína alquil hidroperóxido reductasa, el gen *ahpC*. Las catalasas son las proteínas que tradicionalmente se asocian con la resistencia a peróxido de hidrógeno, sin embargo estudios en *E.coli* demostraron que la enzima Ahp es fundamental a bajas concentraciones de peróxido de hidrogeno, saturándose a concentraciones del orden de 10^{-5} M, mientras que las catalasas son importante frente a mayores concentraciones del compuesto. El trabajo muestra entonces que la enzima es de suma importancia en la detoxificación del agua oxigenada generada durante el metabolismo de la bacteria (Costa e Imalay, 2001). Estos reportes explicarían parte de los resultados obtenidos en este trabajo, ya que el gen de la subunidad C de la enzima alquil hidroperóxido reductasa estaría regulado por Anr, generándose entonces en la mutante, especialmente en condiciones microaerobicas, una deficiencia en esta proteína que podría redundar en un mayor nivel de ROS, tal como se observó en los experimentos de citometría de flujo especialmente en ausencia del agente oxidante. En *P.aeruginosa* no se encontró un *anr*-box en la secuencia promotora del gen *ahpC*, sin embargo se ha encontrado que esta proteína posee un rol importante en la defensa al estrés oxidativo en biofilm (Panmanee y Hassett, 2009), estructuras donde la baja tensión de oxígeno activaría a Anr. También, tanto en esta especie como en *P.extremaustralis* se ha encontrado un Anr-box en la zona promotora de la enzima glutatión reductasa, otro componente fundamental en la mantención del estado redox celular (Koharyova y Kollarova, 2008). Si este gen estuviese bajo la activación de Anr explicaría parte de los resultados observados en la cepa mutante en microaerobiosis, ya que una disminución en la

expresión de esta proteína provocaría un defecto a la hora de detoxificar compuestos tóxicos.

Adicionalmente, entre los posibles blancos regulatorios de Anr en *P.extremaustralis* se encuentran chaperonas de importancia en la respuesta a estrés como por ejemplo GroEL, cuya expresión se encontró aumentada en *P.aeruginosa* frente a la presencia de antibióticos o compuestos aromáticos que generan estrés oxidativo en las células (Chaves et al., 2004, Nalca et al., 2006). Estas observaciones se cumplen para otras proteínas también con función de chaperonas, como DnaK y DnaJ, cuyos correspondientes genes presentan un posible sitio de unión a Anr. En cultivos aeróbicos de *P.aeruginosa* que son sometidos a anaerobiosis se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con chaperonas y proteínas tipo *cold shock* (Schreiber et al., 2006; Trunk et al., 2010). La gran cantidad de chaperonas que poseen Anr-box en su zona promotora, obedecería a la necesidad de mantener en su conformación al *pool* de proteínas celulares sensibles a cambios en la tensión de oxígeno. En relación a esto, el análisis *in silico* del genoma de *P.extremaustralis* mostró la presencia de un gran número de Anr-box (7% del total de genes incluidos en el regulon), ubicados en genes que codifican proteínas de tipo chaperona.

Asociado al bajo cociente redox, a la disminución en la resistencia a estrés oxidativo y al alto porcentaje de células positivas en la generación ROS, se observó que la capacidad de consumo de oxígeno en ausencia de Anr se encontraba alterada, tanto en aerobiosis como en microaerobiosis. En microaerobiosis se observó una mayor capacidad de consumo de oxígeno en la cepa mutante respecto a la cepa salvaje. Esto podría estar relacionado con una desregulación en los componentes de cadena respiratoria. En *P.putida* KT2440 Anr coordina las oxidasas terminales Cio y Cbb3-1 en mayor medida y en menor a Cyo. En esta misma especie se observó que en una mutante *anr* la oxidasa terminal cio poseía una expresión aumentada respecto a la cepa salvaje especialmente en cultivos microaerobiosos o en fase estacionaria, mientras que tanto en aerobiosis como en microaerobiosis la oxidasa de tipo Cbb3-1 estaría disminuida (Ugidos et al., 2008). Es interesante destacar que la oxidasa tipo Cio presenta una baja afinidad por el oxígeno y una baja capacidad de translocación de protones mientras que lo contrario ocurre con Cbb3-1 (Arai et al., 2011).

En aerobiosis en mutantes *anr* de *P.putida* KT2440 se da únicamente una disminución en la expresión de la oxidasa Cbb3-1 sin el aumento de ninguna de las oxidasas restantes (Ugidos et al., 2008). Este antecedente explicaría la tendencia hacia menor consumo de oxígeno por parte de la cepa mutante de *P.extremaustralis*, aunque las causas por las que el cociente redox también es menor que en la cepa salvaje aún no se ha determinado. En microaerobiosis, en *P. putida* KT2440 *anr*, se da una disminución de la expresión de la oxidasa con alta afinidad y alta capacidad de generación de energía y el aumento de otra oxidasa con las características contrarias (Ugidos et al., 2008; Ray y Willams, 1997). En esta condición la baja eficiencia en la translocación de protones de Cio y la ausencia de Cbb3-1 podría llevar a una menor generación de energía provocando una mayor actividad respiratoria y a una acumulación de ROS que se observó en el caso de *P.extremaustralis anr*. Adicionalmente, durante el análisis *in silico* del regulon Anr se encontró un Anr-box río arriba del gen *azu*, que codifica para el citocromo azurina. En *P.aeruginosa* también se ha encontrado que este gen está regulado por Anr (Trunk et al., 2010). Debido a que es donador de electrones para el citocromo c peroxidasa, que cataliza la reducción de peróxido de hidrogeno a agua, la azurina estaría involucrada en el secuestro de un agente que podría resultar tóxico (Alves et al., 1999). Estos componentes de importancia para determinar el estado redox celular, así como la respuesta al estrés oxidativo, son candidatos a ser regulados por Anr y podrían explicar los resultados observados en los distintos experimentos, especialmente en condiciones microaerobicas. En aerobiosis otros factores podrían estar actuando, independientemente de Anr, de manera que las diferencias con la cepa salvaje son menores.

Otros compuestos de importancia son los denominados polisacáridos, de alto peso molecular que ($M_w > 10,000$) en caso de ser excretados al exterior se los denomina exopolisacáridos (EPS) (Wang y Yu, 2007). El metabolismo de los exopolisacáridos ha sido estudiado especialmente en *P.aeruginosa* o en otras especies productoras de alginatos (Martinez et al., 1997; Guo et al., 2011). El PHB y los EPS son dos tipos de polímeros que se producen dentro y fuera de la célula respectivamente y que pueden ser producidos simultáneamente y servir como fuente de carbono cuando el microorganismo sufre hambre (Wang y Yu, 2007). En esta tesis hemos estudiados los EPS totales presentes en

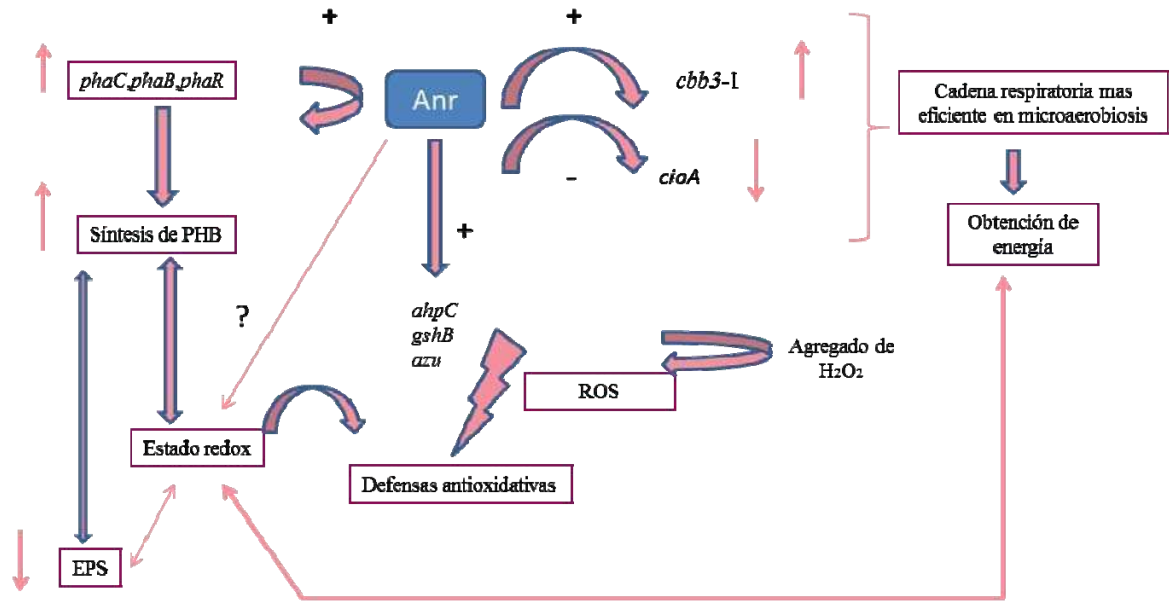
el sobrenadante de cultivos en distintas tensiones de oxígeno, tanto en la cepa salvaje como en la mutante *anr*. Se observó un menor contenido de EPS en el caso de la cepa salvaje a las 24 horas en coincidencia con una mayor producción de PHB. La relación entre ambos metabolismos ha sido estudiada por ejemplo en *Azotobacter vinelandii* en mutantes para la producción de uno de los polímeros conlleva a la sobreproducción del otro (Martinez et al., 1997). En cultivos realizados en *batch* en *Ralstonia eutropha* se observó que la acumulación de PHB en simultaneo con los EPS dependía de la concentración de amonio y glucosa que se agregaba al medio, siendo mayor la producción de PHB a bajas concentraciones de amonio y lo contrario para el caso de los EPS, mientras que el agregado de glucosa era beneficioso para ambos, por lo que se daría una competencia entre ambos metabolismos (Wang y Yu, 2007). En el caso de *P. extremaustralis* la menor producción de exopolisacáridos se dio en microaerobiosis a las 24 horas, condición en la cual también se da la mayor producción de PHB. La cepa mutante mostro una mayor acumulación de EPS, en todas las condiciones, siendo la condición aeróbica a las 6 horas de cultivo la de mayor contenido de EPS totales. Esto podría estar también relacionado con el estado redox celular, se ha observado en *P. aeruginosa* que células cultivadas en aerobiosis presentaban una cubierta de alginatos, probablemente para disminuir la difusión del oxígeno en la célula y de esta forma disminuir el estrés oxidativo (Sabra et al., 2002). En el caso de la cepa *anr* durante las primeras 6 horas de cultivo, el cociente redox presenta su valor más bajo así como una baja producción de PHB, que podrían llevar a un aumento del otro lo polímero.

El metabolismo de las fuentes de carbono también se ha visto alterado en la cepa mutante, tal como se observó en experimentos de Microlog^R (Biolog), entre los compuestos que no puede emplear la cepa mutante se encuentran el ácido D-glucónico y el compuesto ácido D-galactónico lactona, ambos involucrados las reacciones de degradación vía pentosas fosfato así como el compuesto L-arabitol, pudiendo entonces sugerir que Anr podría estar influyendo de manera directa o indirecta sobre alguna de las enzimas de este camino metabólico. En cuanto a una de las posibles causas por las cuales ciertos aminoácidos son necesarios para el crecimiento de la cepa *anr* podría mencionarse la presencia de Anr-box en la zona promotora de genes como cisteína sintetasa, aspartato amonio liasa, la enzima y la subunidad catalítica de la enzima ATP fosforibosiltransferasa.

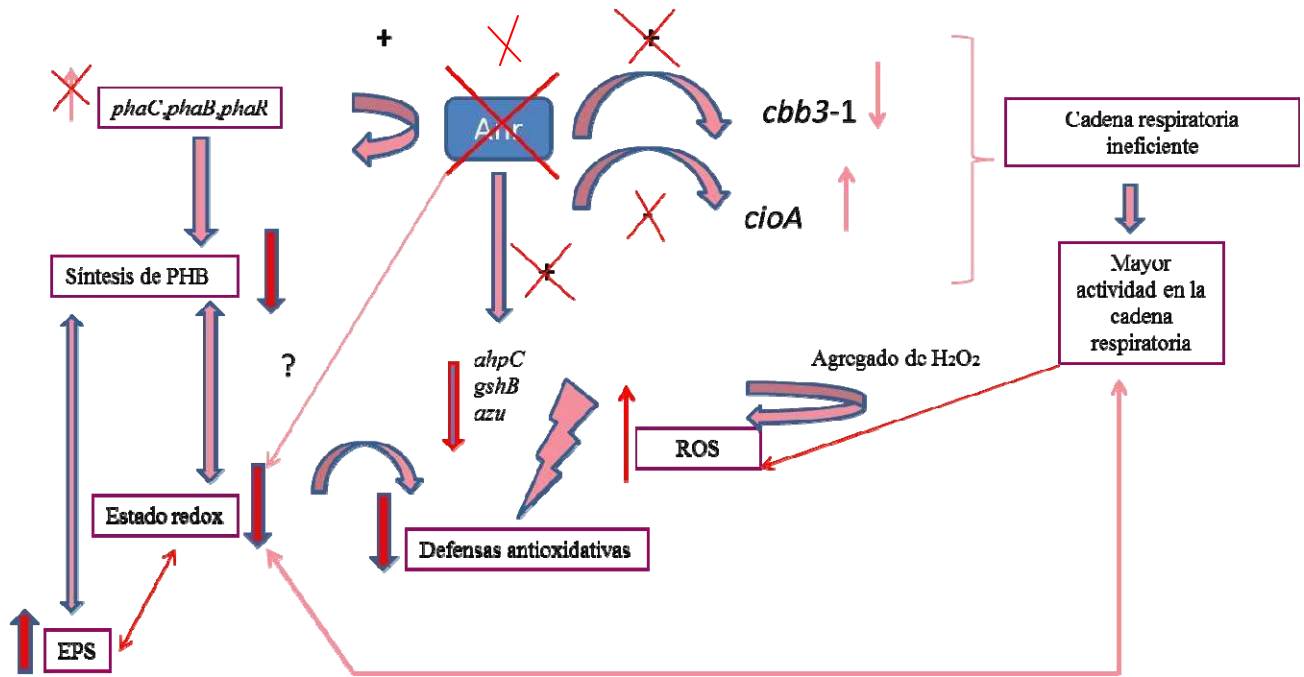
Además se estudiaron proteínas extracelulares y sus actividades enzimáticas, debido a que en *P.aeruginosa* se produce la secreción de distintos factores proteicos, entre ellos de virulencia, especialmente en bajas tensiones de oxígeno (Sabra et al., 2002). En el caso de *P.extremaustralis*, el mayor valor de proteínas extracelulares se dio para la cepa *anr* en condiciones de aerobiosis a las 24 horas de cultivo, detectándose en microaerobiosis actividad proteasa. No puede descartarse que las proteasas provengan de lisis de células de la cepa mutante que al estar creciendo en condiciones que no son las óptimas lleven a la muerte de las mismas liberándose el contenido celular al medio de cultivo. Un resultado sorprendente fue la presencia de actividad amilasa para la cepa salvaje, una actividad que no se encuentra frecuentemente en especies del género *Pseudomonas*.

Los parámetros hasta ahora estudiados se interrelacionan de formas complejas ya que Anr estaría influenciando tanto la transcripción de los genes de síntesis de PHB, así como el estado redox celular y la resistencia a estrés oxidativo. Esto último junto que la posible regulación de otros componentes de la respuesta a estrés conllevaría a un estado de menor resistencia al estrés oxidativo, que además podría ser contrarrestado por el PHB acumulado. La dilucidación de la relación causa-consecuencia aún queda por determinarse en profundidad. Los resultados obtenidos en la cepa mutante y la acción propuesta para Anr sobre parte del metabolismo de *P.extremaustralis* se plantean en el siguiente esquema:

Salvaje



Mutante *anr*



Rol del PHB en la formación de Biofilms a bajas temperaturas

Las bacterias han desarrollado distintas estrategias para sobrevivir y colonizar ambientes desfavorables; entre ellas la formación de biofilms y la acumulación de polímeros de reserva han sido anteriormente descritos (López et al. 1995; Mah and O'Toole 2001; Pham et al. 2004; Kadouri et al. 2005). En el Laboratorio hemos señalado que el PHB es esencial durante el crecimiento en frío (en cultivos planctónicos) manteniendo el estado redox celular y evitando daños por estrés oxidativo (Ayub et al. 2009). En esta Tesis se mostró también que *P.extremaustralis* es capaz de crecer en condiciones de bajas tensiones de oxígeno en cultivos en biorreactor y en biofilms. Además, se observó que la acumulación de PHB permite la formación de biofilms en condiciones de bajas temperaturas, con mayor número de células planctónicas viables en comparación con condiciones de no acumulación. Además en ausencia del polímero, esta especie presentó una mayor biomasa total adherida así como una dependencia a la microaerobiosis en cultivos líquidos. El fenotipo de sensibilidad al frío presentado por la mutante *phaC* es debido a la insuficiente disponibilidad de equivalentes de reducción necesarios para el funcionamiento de las enzimas pertenecientes a las defensas antioxidativas que serían necesarias para sobrellevar el estrés oxidativo derivado del crecimiento en frío (Ayub et al. 2009).

Los biofilms son estructuras organizadas que ofrecerían un estilo de vida protector debido especialmente a la matriz extracelular en la cual las células están embebidas (Costerton et al. 1995). Los polisacáridos extracelulares y las proteínas han sido descritas como componentes claves de la matriz extracelular, así como el DNA extracelular (Branda et al. 2005). El contenido de EPS se observó incrementado en todas las cepas en condiciones de bajas temperaturas, encontrando los mayores valores en la cepa *phaC* y en la cepa salvaje en condiciones de no acumulación de PHB. Estos resultados están acordes a la mayor biomasa total adherida. Las bajas temperaturas producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y un incremento en la actividad de las enzimas claves en las defensas antioxidantes (Chattopadhyay et al. 2011). Los resultados demuestran un mayor contenido

de EPS que estaría acorde con literatura previa que asigna a estos polímeros un rol protector debido a la capacidad química de los mismos de “secuestrar” compuestos tóxicos presentes en el medio ambiente, entre ellos los ROS (Simpson et al., 1989; Bylund et al. 2006; Wang et al. 2007; Chang et al., 2009). Como ya se ha comentado anteriormente el metabolismo de los EPS y el PHB estarían relacionados debido a que ambos caminos metabólicos consumen moléculas de carbono (Martinez et al. 1997). El defecto en la acumulación del polímero observado en la cepa mutante (Ayub et al., 2009) puede resultar en un incremento en la disponibilidad de moléculas de carbono que podrían ser redireccionadas hacia otros procesos metabólicos, como el de la síntesis de EPS. Si bien la cepa salvaje también presentó un aumento en la producción de EPS respecto a los 28°C este no fue significativo, esta tendencia sugeriría que la producción de estos polímeros también podría contribuir a la supervivencia durante el crecimiento en condiciones de estrés.

Si bien en esta Tesis hemos estudiado la producción de exopolisacaridos totales, comparando con distintas mutantes y en diferentes condiciones no hemos profundizado en la naturaleza química de los mismos. La especie más estudiada es *P.aeruginosa*, en la cual existen distintos exopolisacaridos que pueden ser sintetizados. En fenotipos no mucoides el exopolisacarido de mayor relevancia para las interacciones célula - célula y para el mantenimiento de la estructura del biofilm es el denominado Psl, rico en manosa y galactosa (Ryan et al., 2007). En particular, se ha demostrado que *pslD* (un transportador lipídico de UDP-glucosa) y *pslA* (un exportador de UDP-glucosa) son esenciales para la formación de biofilms (Campisano et al., 2006). Otro polisacárido, de importancia para el desarrollo de biofilms, es el denominado Pel, rico en glucosa, que posee importancia para la adhesión de las células, especialmente en variantes no piliadas (Vasseur et al., 2005). Los genes necesarios para la síntesis de este polímero se encuentran ampliamente distribuido en cepas de *P.aeruginosa* y también se encuentra presente en el patógeno vegetal *Ralstonia solanacearum*, cuyas mutantes en estos genes resultan deficientes en la formación de biofilm (Ryan et al., 2007). Además, en aislamientos de tipo mucoides de *P.aeruginosa*, obtenidos a partir de pacientes con fibrosis quística, el polisacárido mayoritario es el alginato, que secuestraría especies reactivas de oxígeno generadas por las células provenientes del sistema inmune (Ma et al., 2006) así como en *Azotobacter vinelandii* que

como ya se describió la síntesis de alginatos compite con la de PHB. Empleando un análisis bioinformático del genoma de *P.extremaustralis* se observó que los genes del polisacárido Pel están presentes en su totalidad y completos, si bien su funcionalidad aún queda por determinarse. Por otro lado, los genes codificantes Psl no se han encontrado en su totalidad aunque existe una proteína similar a *pslA*. Por otro lado, se han encontrado genes asociados a la síntesis de alginatos y a la síntesis de poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA). Este último polímero se encuentra presente en una variedad de especies bacterianas tales como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter baumannii* y *E. coli*, en estas dos últimas especies la producción de PGA es importante en la formación de biofilms (Cerca y Jefferson, 2008, Choi et al., 2009). Por último en el genoma de *P.extremaustralis* se encuentran presentes genes relacionados con la síntesis de ácido colánico, un polisacárido tipo capsular que en *E.coli* se asocia al crecimiento en temperaturas por debajo de 25°C y a la resistencia frente a cambios de presión osmótica y desecación (Prigent-Combaret et al., 2000). Esto resulta de interés en relación a la resistencia a frío y a la formación de biofilms en estas condiciones, si bien se han ubicado los genes *in silico* aún restan por hacer estudios fisiológicos para determinar la identidad del exopolisacárido producido en las distintas condiciones de crecimiento, tanto en biofilms como en cultivos de biorreactor.

Otro factor clave en el desarrollo de los biofilms es la movilidad (Klausen et al., 2003). En *E.coli* el rol de la movilidad parece ser dual, por un lado es necesaria para promover el contacto inicial entre las células y las superficie, contribuyendo a la formación del biofilm, pero por otro lado también se da un aumento de células móviles en la dispersión del mismo contribuyendo a la colonización de nuevos nichos ecológicos (Pratt and Kolter 1998). Además, en *P. aeruginosa* y *P. putida* fue observado que la movilidad es un factor de importancia en la etapa de dispersión del biofilm (Sauer et al., 2002) pero por otro lado en células mutantes hipermóviles de *P.aeruginosa* la capacidad de formación de biofilms se ve disminuida, así como en mutantes e *Ralstonia solanaceum* que presentaron una adhesión a plantas y frutos similar a la cepa salvaje pero una menor formación de biofilm (Caiazza et al. 2007; Meng et al., 2011).

En este trabajo de tesis, encontramos que *P. extremaustralis* presenta, cuando el inóculo había acumulado previamente PHB, una mayor capacidad de movilidad durante la

incubación a bajas temperaturas. Esto podría trasladarse a una estrategia en ambientes naturales que son generalmente pobres en nutrientes con pulsos transientes de carbono en los cuales se han detectado microorganismos acumulando PHA (Chesson et al. 2004; Kadouri et al., 2005).

Los resultados de esta Tesis muestran que el PHB podría constituir una ventaja para la colonización y dispersión en nuevos nichos ecológicos promoviendo la movilidad y la viabilidad de las células planctónicas. El metabolismo de los PHA es dinámico, las enzimas polimerasas y depolimerasas (las cuales producen la degradación del PHB) se encuentran activas simultáneamente, resultando en una síntesis y degradación paralela del mismo (Kaduri et al., 2005). Este polímero es una fuente de moléculas de carbono y equivalentes de reducción y en condiciones de bajas temperaturas la depolimerización del PHB contribuye también a mantener el estado redox y evita el daño oxidativo en las moléculas lipídicas (Ayub et al. 2009).

Influencia de Anr en la formación de Biofilms

Anr está íntimamente relacionado con el metabolismo en condiciones de microaerobiosis y regula una gran cantidad de genes involucrados en la producción de energía en bajas tensiones de oxígeno (utilización del nitrato, fermentación de arginina y piruvato) así como aquellos involucrados en otros procesos celulares como la formación de fimbrias, y posiblemente en la biosíntesis de aminoácidos, adherencia celular, etc. (Trunk et al, 2010). Debido a estos antecedentes fue de nuestro interés estudiar la formación de los biofilms en la cepa *anr* mutante. En este caso, el estudio no es sencillo debido a que la mutación en este gen afecta la capacidad de crecimiento en microaerobiosis (tal como se da en el biofilm), con lo cual el análisis debe ser cuidadoso para no confundir falta de crecimiento con defectos en el desarrollo del biofilm, por lo que en el modelo empleado en esta Tesis se realizaron ajustes en el medio de cultivo y la agitación del cultivo.

Los resultados obtenidos muestran que la mutación en el gen *anr* provoca la formación de biofilms defectuosos con baja biomasa y grosor y una mayor heterogeneidad donde se alternan áreas sin crecimiento y la aparición de sectores con macrocolonias. Sin

embargo, las células planctónicas asociadas al biofilm crecieron de manera similar a la cepa salvaje y presentaron movilidad y expresión de la proteína verde fluorescente, lo que demuestra que la cepa mutante fue capaz de sobrevivir y crecer en estas condiciones. Además, se encontró una menor capacidad de adhesión a tiempos cortos y una drástica disminución de la capacidad de agregación. Estas observaciones fueron muy interesantes ya que los primeros pasos de la formación del biofilm se relacionan con la capacidad de las células de asociarse a una superficie para luego establecerse (Klausen et al., 2003).

Tal como se describió anteriormente la presencia de estructuras asociadas a la movilidad poseen un rol dual en la formación de biofilms. *P.extremaustralis anr* presentó una mayor movilidad de tipo *swimming* (que depende de flagelos) así como presencia de largas estructuras, las cuales serían largos flagelos. Realizando un análisis bioinformático se encontraron genes blanco que podrían estar bajo el control de Anr y que podrían provocar el fenotipo observado. Entre ellos se encuentran el gen denominado *morA*, que estaría involucrado en la transducción de señales, cuyas cepas que presentaban mutaciones en este gen presenta un fenotipo de hiperflagelacion y aumento de la movilidad en *P.putida* y una disminución de biofilms en *P.aeruginosa* (Choy et al., 2004), los cuales son similares a los observados en la cepa *anr* mutante. Por otro lado, genes relacionados con la biogénesis del flagelo como *flgE*, *fliK*, *motB*, etc que también podrían ser los responsables del fenómeno de aumento de movilidad y que esto disminuya la adhesión y formación del biofilm, asociado a esto también genes asociados a la síntesis de pili IV como *pilG*, el cual también presenta en *P.aeruginosa* un *anr*-box asociado a su probable secuencia promotora (Trunk et al., 2010).

Estos resultados en conjunto sugieren que la deficiencia en el desarrollo de biofilms podría deberse a la capacidad disminuida de esta cepa de formar agregados celulares provocados por una alta motilidad. El rol de Anr sería fundamental en el desarrollo del biofilm en *P.extremaustralis*, no solo debido a la activación del metabolismo energético en microaerobiosis, sino también en funciones claves como la movilidad y agregación celular.

Por último, el regulon *in silico* determinado ha mostrado 167 probables genes blanco de regulación directa por Anr, o por Dnr que se encuentra directamente regulado por

Anr y el cual se une a boxes muchas veces indistinguibles de los de Anr (Trunk et al., 2010), los cuales están involucrados en diversas funciones celulares. Al comparar el regulon *in silico* obtenido en *P.aeruginosa* (Trunk et al., 2010), se observa que 60 son coincidentes entre ambas especies, 64 genes presentan el *anr*-box en *P.aeruginosa* y no en *P.extremaustralis* (hasta 500pb río arriba del ATG), y el resto solo se encontraron en *P.extremaustralis*. Cabe destacar que varios de los genes que se incluyen en este último grupo guardan baja similitud con *P.aeruginosa* y por otro lado, aproximadamente 32 proteínas cuya expresión dependería de Anr en *P.aeruginosa* no se encontraron en el genoma de *P.extremaustralis*. Los probables genes blancos de regulación por Anr intervienen en funciones celulares muy diversas, lo que mostraría la importancia de este regulador en la fisiología de especies del género *Pseudomonas* más allá de las funciones que inicial y tradicionalmente se le adjudicaron a Anr.

Perspectivas futuras

Los resultados obtenidos muestran que Anr tiene una importante influencia en distintos aspectos de la fisiología bacteriana, sin embargo, aún es necesario determinar si la regulación de Anr sobre los distintos procesos es directa o indirecta. En particular, para analizar si ejerce una influencia positiva directa sobre los genes de PHB se realizará un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) empleando como sonda la zona promotora de los genes de biosíntesis de PHB donde se localizan los Anr-boxes. Recordemos que dado que Anr ejerce su acción en condiciones microaeróbicas-anaeróbicas, en las cuales se encuentra como dímero, fue necesario la generación de una mutante Anr* que dimeriza en aerobiosis para poder realizar estos experimentos (Ibarra, 2010). La funcionalidad de Anr* fue probada en aerobiosis pero para lograr su sobreexpresión en las cantidades necesarias para realizar los ensayos, es necesario la utilización de una doble mutante Δfnr y Δcrp de *E. coli* en la que se está tratando actualmente de obtener las cantidades necesarias de proteína. Por otro lado, si bien es posible postular la regulación de Anr sobre citocromos, enzimas de detoxificación, etc., es necesario realizar experimentos de expresión de los genes candidatos, manipulaciones genéticas que involucren la construcción de mutantes o estrategias proteómicas. Por otra

parte, sería interesante determinar la naturaleza química de los exopolisacáridos (EPS) sintetizados en las distintas condiciones tratando de determinar si la temperatura o la disponibilidad de oxígeno provoca la producción de distintos tipos de EPS. Además, se profundizará el estudio de las proteínas secretadas por esta cepa y sus actividades enzimáticas, ya que podrían resultar de utilidad para aplicaciones biotecnológicas. En cuanto a la formación de biofilms también es necesario determinar cuál/cuales son los blancos de Anr que se ven afectados produciendo el fenotipo observado, por lo que se están realizando ensayos de PCR en Tiempo Real con algunos de los genes candidatos detectados en este trabajo. Por último, sería interesante estudiar algunos de los fenotipos observados en otras especies de *Pseudomonas* de manera de generalizar los resultados aquí discutidos. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se basan en *P. aeruginosa*, por el interés que despierta el entendimiento de la fisiología de este microorganismo en condiciones de microaerobiosis, tales como las que se dan en el pulmón de pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, como se señaló en la introducción, el metabolismo microaeróbico de otras especies de *Pseudomonas* difiere del de *P. aeruginosa*, por lo que *P. extremaustralis* podría ser un buen modelo para la dilucidación de aspectos básicos de estos procesos en microorganismos ambientales que pueden también resultar de interés para aplicaciones biotecnológicas.

Conclusiones

- Se comprobó la funcionalidad de Anr y su participación en varios procesos celulares en *P. extremaustralis*.
- Anr controló los procesos típicamente atribuidos a este regulador, la utilización del nitrato y la fermentación del aminoácido L-arginina en condiciones de baja tensión de oxígeno. El nitrato solo puede ser transformado a nitrito. El análisis del genoma mostró la presencia de los genes relacionados con la desnitrificación, aunque no completos. Los genes que componen la enzima nitrito reductasa están ausentes, lo que explica el fenotipo de acumulación de nitritos observado. *P. extremaustralis* posee todo el operón implicado en la utilización de la arginina.
- La producción de PHB en la cepa salvaje, así como la expresión de los genes involucrados en la síntesis del mismo, fue mayor en condiciones de microaerobiosis que en aerobiosis. Anr tuvo influencia sobre ambos fenómenos, así como en el estado redox celular, la producción de exopolisacáridos y la resistencia a estrés oxidativo.
- La presencia de PHB incrementó la movilidad y la supervivencia de células planctónicas en biofilms desarrollados en condiciones de frío. La acumulación del polímero podría constituir una ventaja adaptativa para la colonización de nuevos nichos ecológicos en ambientes desfavorables.
- El regulador Anr afectó el desarrollo de biofilms, la movilidad y la adherencia celular.
- El regulon Anr, determinado analizando el genoma completo, mostró una gran cantidad de probables genes blanco. El efecto de Anr sobre varios de los genes detectados explicaría algunos de los fenotipos observados en la cepa mutante.
- Los resultados obtenidos experimentalmente así como el análisis *in silico* muestran que Anr tendría una amplia injerencia en el metabolismo global de *Pseudomonas extremaustralis* y su rol sería más amplio que el tradicionalmente descripto.

Bibliografía:

- Akyol I, Comlecdoglu U. 2009. Gene Regulation and Transcriptional Regulation in Bacteria. *G.U J Scien.* 22: 77-82.
- Albesa I, Becerra MC, Battan PC, Paez PL .2004. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 317 (2004) 605–609.
- Aldor I, Keasling J. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Op Biotechnol.* 14:475–483.
- Alexeeva S, Hellingwerf K, Teixeira de Mattos JM.2003. Requirement of ArcA for Redox Regulation in *Escherichia coli* under Microaerobic but Not Anaerobic or Aerobic Conditions. *J Bacteriol*, 185:204-209.
- Alves T, Besson S, Duarte LC, Pettigrew W, Girio F, Devreese B, Vandenberghe I, Beeumen J, Fauque G, Moura I.1999. A cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617 active at high ionic strength: expression, purification and characterization. *Bioch Biophys Acta.* 1434 :248-259
- Anderson AJ, Dawes EA. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Mol Biol Rev*, 54: 450-472.
- Anderson G, O'Toole G.2008 Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:85-105.
- Arai H, Kodama T, Igarashi Y. 1997. Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 25:1141–1148.
- Arai H.2011.Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbio*, 2:1-14.
- Ayub ND, Pettinari MJ, Ruiz J ,López NI.2004. A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Curr Microbiol*, 49:170-174
- Ayub ND, Pettinari MJ, Méndez BS, López NI. 2006. Impaired polyhydroxybutyrate biosynthesis from glucose in *Pseudomonas* sp. 14-3 is due to a defective β -ketothiolase gene. *FEMS Microbiol Lett*; 264: 125–131.
- Ayub ND, Pettinari MJ, Méndez BS, López NI. 2007. The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*; 58: 240–248.
- Ayub N. 2009. Influencia del polihidroxibutirato sobre la adaptación a condiciones extremas en una bacteria Antártica. Tesis de Doctorado. Dpto Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 104 paginas.
- Ayub ND, Tribelli PM, López NI. 2009. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14–3 during low temperature adaptation. *Extremophiles*; 13: 59–66.
- Ballard AL, Ferguson SJ.1988. Respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans* Evidence for two *b*-type haems in the γ subunit and properties of a water-soluble active enzyme containing α and β subunits. *Euro J of Biochem.*174:207-212.
- Barak, Y., van Rijn, J. 2000. Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*. *J Appl Environ Microbiol* 66:1209-12.
- Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Givskov M, Whitchurch CB, Engel JN, Tolker-Nielsen T .2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 10: 2331–2343.
- Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH ,Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS.2006. Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J of Bacteriol.*188: 7344–7353.

- Benkert B, Quack N, Schreiber K, Jaensch L, Jahn D, Schobert M. 2008. Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation *arcDABC* operon. *Microbiology*, 154:3053–3060.
- Bedzyk L, Wang T, Ye R-1999. The Periplasmic Nitrate Reductase in *Pseudomonas* sp. Strain G-179 Catalyzes the First Step of Denitrification. *J Bacteriol.* 189:2802-2806.
- Bernofsky C, Swan M. 1973. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem*, 53:452-8.
- Blasco F, Dos Santos JP, Magalon A, Frixon C, Guigliarelli B, Santini CL, Giordano G. 1998. NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 28:435-47.
- Bonnefoy V, Demoss JA. 1994. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *A Van Leeuw* .66:47-56.
- Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*, 13:20-26.
- Braunegg, G., B. Sonnleitner, Lafferty RM. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- γ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 6: 29-37.
- Bylund J, Burgess LA, Cescutti P, Ernst RK, Speert DP. 2006. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *J Biol Chem* 281:2526–2532
- Caiazza NC, O'Toole GA (2004) *SadB* is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 186: 4476–4485.
- Campisano A, Schroeder C, Schemionek M, Overhage J, Rehm BHA. 2006. PsID is a secreted protein required for biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 72:3066–3068.
- Carlson CA, Ingraham J. 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol*, 45: 1247-1253.
- Chang WS, Li X, Halverson LJ .2009. Influence of water limitation on endogenous oxidative stress and cell death within unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* 11:1482–1492.
- Chávez FP, Lünsdorf H, Jerez CA. 2004. Growth of Polychlorinated-Biphenyl-Degrading Bacteria in the Presence of Biphenyl and Chlorobiphenyls Generates Oxidative Stress and Massive Accumulation of Inorganic Polyphosphate. *Appl Environ Microbiol.* 70:3064–3072.
- Chattopadhyay MK, Raghu G, Sharma YV, Biju AR, Rajasekharan MV, Shivaji S .2011. Increase in Oxidative Stress at Low Temperature in an Antarctic Bacterium. *Curr Microbiol*, 62:544-546.
- Cheng H, Walker GC. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180:5183–5191.
- Chesson P, Gebauer RL, Schwinning S, Huntly N, Wiegand K, Ernest MS, Sher A, Novoplansky A, Weltzin JF .2004. Resource pulses, species interactions, and diversity maintenance in arid and semi-arid environments. *Oecologia* 141:236–253.
- Chiang P, Burrows LL (2003) Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 185: 2374–2378.
- Choi AK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litran T. 2009. The *pgaABCD* Locus of *Acinetobacter baumannii* Encodes the Production of Poly- β -1-6-*N*-Acetylglucosamine, Which Is Critical for Biofilm Formation. *J Bacteriol.* 191:5953–5963.
- Choy WK, Zhou L, Kiu-Choong Syn C, Zhang LH, Swarup S. 2004. MorA Defines a New Class of Regulators Affecting Flagellar Development and Biofilm Formation in Diverse *Pseudomonas* Species. *J Bacteriol* 186:7221–7228.

- Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS .2001. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J App Microbiol* 88: 22–30.
- Comolli JC, Donohue TJ. 2004. Differences in two *Pseudomonas aeruginosa cbb3* cytochrome oxidases. *Mol Microbiol*, 51: 1193–1203.
- Costa Seaver L, Imalay JA.2001. Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*.183: 7173–7181.
- Costerton J, Lewandowski Z, Caldwell,D., Korber,D., Lappin-Scot H.1995. Microbial Biofilms. *Ann Rev Microbiol*, 49: 711-745.
- Cotter PA, Melville SB, Albrecht JA, Gunsalus RP. 1997. Aerobic regulation of cytochrome d oxidase (cydAB) operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Mol Microbiol*, 25:605-15.
- Crack JC, Green J, Cheesman MR, Le Brun NE, Thomson AJ.2007. Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe-4S] to [2Fe-2S] clusters in the transcriptional regulator FNR. *PNAS*, 104: 2092–2097.
- D’Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C .2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*, 7:385–389.
- Davis D, Chakrabarty AM,Geesey GG.1993.Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *App Environ Microbiol*, 59:11818-1186.
- Danhorn T, Fuqua C. 2007. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Ann Rev Microbiol*. 61: 401-422.
- de Almeida A, Ruiz J., Lopez N., Pettinari M.J. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Química viva*, Vol.3 nro.3.<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>.
- Decho AW .2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res*, 20: 1257–1273.
- Dimroth P. 2000. Operation of the F₀ motor of the ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1458:374–386.
- Donlan G.2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infec Dis*. 89: 881–890.
- dos Santos M, Heim S, Moore ER, Strätz M, Timmis KM. 2004. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Ecol*; 6: 1264–1286.
- Dunne jr. WJ. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?. *Clin Microbiol Rev*. 15: 155–166.
- Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M.2004. Long-Term Anaerobic Survival of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via Pyruvate Fermentation. *J Bacteriol*.186:4596–460.
- Filiatrault M, Picardo K, Ngai H, Passador L, Iglewski B. 2006. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Genes Involved in Virulence and Anaerobic Growth. *Infect Immun*. 74: 4237–4245.
- Fuhrer T, Sauer U. 2009. Different Biochemical Mechanisms Ensure Network-Wide Balancing of Reducing Equivalents in Microbial Metabolism. *J of Bacteriol*. 191:2112-2121.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. 2005. Survival strategies of infectious Biofilms. *TRENDS Microbiol*, 13:34-40.
- Galimand M, Gamper M, Zimmermann A, Haas D.1991. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa* . *J Bacteriol*, 173: 1598–1606.
- Gerhard P, Murray RN, Costilow N, Nester W, Wood N, Krieg NR, Phillips G. 1981. *Manual of Method of General Bacteriology*. Washington, American Society for microbiology, , pp 409–443.

- Grove J, Tanapongpipat S, Thomas G, Griffiths L, Crooke H, Cole J. 2003. *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of *c*-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Mol Microbiol*. 19: 467-481.
- Guo W, Song C, Kong M, Geng W, Wang Y, Wang S. 2011. Simultaneous production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates and alginate oligosaccharides by *Pseudomonas mendocina* NK-01. *Appl Microbiol Biotechnol*. 92:791-801.
- Hasegawa N, Arai H, Igarashi W. 2001. Two *c*-Type Cytochromes, NirM and NirC, Encoded in the *nir* Gene Cluster of *Pseudomonas aeruginosa* Act as Electron Donors for Nitrite Reductase. *Biochem Biophys Res Commun*. 288: 1223-1230.
- Hassett D, Alsabbagh E, Parvatiyar K, Howell ML, Wilmott RW, Ochsner UA. 2000. A Protease-Resistant Catalase, KatA, Released upon Cell Lysis during Stationary Phase Is Essential for Aerobic Survival of a *Pseudomonas aeruginosa oxyR* Mutant at Low Cell Densities. *J Bacteriol*. 182:4557-4563.
- Harmsen M, Yang L, Pamp S, Tolker-Nielsen T. 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59 :253-268.
- Hong S, Kuroda A, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kato J. 2004. The aerotaxis transducer gene *aer*, but not *aer-2*, is transcriptionally regulated by the anaerobic regulator ANR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biosci Bioeng*, 97:184-190.
- Holloway BW, O'Hoy K, Matsumoto H. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* PAO. In: O'Brien SJ (ed) Genetic maps, 4th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 13-2.21.
- Holm PJ, Bhakat P, Jegerschöld C, Gyobu N, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Morgenstern R, Hebert H. 2006. Structural Basis for Detoxification and Oxidative Stress Protection in Membranes. *J Microbiol Biol*, 360: 934-945
- Huisman GW, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P, Witholt B. 1992. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J Biol Chem* 266:2191-2198.
- Humphries K. M., Sweda L. I. 1998. Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37: 15835-15841.
- Ibarra JG. 2011. Análisis del regulador global del crecimiento anaeróbico, Anr, en *Pseudomonas extremaustralis*: efectos fisiológicos de su sobreexpresión y construcción de una mutante aeróbicamente activa. 65 páginas.
- Jensen KF. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J Bacteriol*. 175(11):3401-7.
- Jervis AJ, Green J. 2007. In vivo demonstration of FNR dimers in response to lower O₂ availability. *J Bacteriol*. 189:2930-2.
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y, Castro-Sowinski S. 2005. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit Rev Microbiol* 31:55-67
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48: 1511-24.
- Koharyova, M and Kollarova M. 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys*. 27: 71-84.
- Kuchma SL, O'Toole GA. 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr Opin Biotechnol*, 11:429-33.
- Kumar R, Shimizu K. 2011. Transcriptional regulation of main metabolic pathways of *cyoA*, *cydB*, *fnr*, and *fur* gene knockout *Escherichia coli* in C-limited and N-limited aerobic continuous cultures. *Microb Cell Fact*, 10:3.

- Larionov A, Krause A, Miller W.2005.A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC.6: 62.
- Laville J, Blumer C, Von Schoetter C, Gaia V, Dèfago G, Keel C, Hass D. 1998. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO. J Bacteriol; 180: 3187–3196.
- aLazazzera, B.A., Bates N, Kiley PJ.1993.The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. Gen Develop.7:1993-2005.
- bLazazzera, B, Beinert H, Khoroshilova N, Kennedy MC, Kiley PJ. 1993. DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen, J. Biol. Chem., 271: 2762-2768.
- Lee B, Schjerling CK, Kirkby N, Hoffmann N, Borup R, Molin S, Høiby N, Ciofu O.2011. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates maintain the biofilm formation capacity and the gene expression profiles during the chronic lung infection of CF patients.
- Lee SH, Lee SY, Park BC. 2005. Cell surface display of lipase in *Pseudomonas putida* KT2442 using OprF as an anchoring motif and its biocatalytic applications. Appl Environ Microbiol. 71: 8581–8586.
- Lemoigne, M. 1926. Produits de deshydratation et de polymerization de l'acid ,Boxybutyrique. Bull. soc. chim. biol. 8:770-782.
- Lehtola MJ, Miettinen IT, Keinänen MM, Kekki T, Laine O, Hirvonen A, Vartiainen T, Martikainen P.2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. Water Res, 38: 3769–3779
- Levanon S, San KY, Bennett GN. 2005. Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses.Biotechnol Bioeng. 89: 556–564.
- Link AJ, Phillips D, Church GM. 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. J Bacteriol 179:6228–37.
- López NI, Floccari ME, Garcia AF, Steinbüchel A, Mendez BS .1995. Effect of poly-3-hydroxybutyrate content on the starvation survival of bacteria in natural waters. FEMS Microbiol Ecol 16:95–101
- López N, Pettinari MJ, Stackebrandt E, Tribelli PM, Pötter M, Steinbüchel A, Méndez B. 2009. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov. A poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an Antarctic environment. Curr Microbiol; 59: 514–519.
- Lu CD,Winteler H, Abdelal H, Haas D. 1999. The ArgR Regulatory Protein, a Helper to the Anaerobic Regulator ANR during Transcriptional Activation of the *arcD* Promoter in *Pseudomonas aeruginosa*.J Bacteriol, 181: 2459–2464
- Luthi, E., A. Mercenier, and D. Haas. 1986. The arcABC operon required for fermentative growth of *Pseudomonas aeruginosa* on arginine: Tn5-751-assisted cloning and localization of structural genes. J Gen Microbiol, 132:2667-2675.
- Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek M, Wozniak DJ. 2006.Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. J Bacteriol. 188:8213-8221.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ .2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. PLoS Pathog 5: e1000354.
- Madison LL, Huisman GW .1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev 63:21–53.
- Maehara A, Taguchi S, Nishiyama T and Doi Y. 2002. Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA. J Bacteriol. 184:3992-4002.
- Mah TF, O'Toole GA.2001.Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.

- Trends Microbiol. 9:34-9.
- Mailloux R, Lemire J, Appanna V.2010. Metabolic networks to combat oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. A Van Leeuw. (3):433-42.
 - Matsusaki H, Manji S, Taguchi K, Kato M, Fukui T, Yoshiharu D. 1998. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. Strain 61–3. J Bacteriol; 180:6459–6467.
 - Martinez P, Guzman J, Espin G (1997) A mutation impairing alginate production increased accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Azotobacter vinelandii*. Biotech Lett 19: 909-912
 - Matz,C., Kjelleberg, S. 2005. Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing. Trends Microbiol.;13:302–307.
 - Meng F. Yao J, Allen C.2011. A MotN Mutant of *Ralstonia solanacearum* Is Hypermotile and Has Reduced Virulence. J Bacteriol.193: 2477-2486.
 - Meselson M, Yuan R.1968.DNA restriction enzymes from *E.coli*. Nature.217:111.
 - Mercenier, A; Simon, JP;Vander Wauven, C, Hass D .1980. Regulation of Enzyme synthesis in the Arginine Deiminase Pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol.144:159-163.
 - Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, JP Reichheld.2009. Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. Annu Rev Genet. 43:335–67.
 - Molin S, Tolker-Nielsen T .2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Curr Opin Biotech 14: 255–261.
 - Monds R, O'Toole GA.2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol, 17:73-87.
 - Moore LJ, Mettert EL, Kiley PJ. 2006. Regulation of FNR dimerization by subunit charge repulsion. J Biol Chem. 3;281(44):33268-75.
 - Moreno-Vivian C, Cabello P, Martinez-Luque M, Blasco R, Castillo F. 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. J of Bacteriol. 181: 6573–6584.
 - Morozkina EV, Zvyagilskaya RA.2007. Nitrate Reductases: Structure, Functions, and Effect of Stress Factors. Biochemistry (Moscow) 72:1151-1160.
 - Nalca Y, Lothar J,Bredenbruch F,Geffers R,Buer J,Haussler1 S.2006. Quorum-Sensing Antagonistic Activities of Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a Global Approach. Antimicrob Agents Chemother. 50:1680-8.
 - Nikel PI, Pettinari MJ, Galvagno MA, Méndez BS. 2006. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli* arcA mutants in microaerobiosis. Appl Environ Microbiol; 72: 2614–2620.
 - Nizet V, Esko J.2009. Chapter 39: Bacterial and Viral Infections Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY).
 - Ostle AG, Holt J.1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol, 44: 238-241.
 - Ohtsu I, Wiriathanawudhiwong N, Morigasaki S, Nakatani T, Kadokura H, Takagi H. 2010. The L-Cysteine/L-Cystine Shuttle System Provides Reducing Equivalents to the Periplasm in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 285: 17479–17487.
 - O'Sullivan D J and O'Gara F.1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol Mol Biol Rev. 1992 December; 56(4): 662- 676
 - O'Toole G and Kolter R .1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol. 30:295-304.
 - Panmanee W, Hassett DJ.2009. Diferential roles ofOxyR-controlled antioxidant enzymes alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF) and catalase (KatB) in the protection of *Pseudomonas aeruginosa* against hydrogen peroxide in biofilm vs.planktonic culture. FEMS Microbiol Lett. 295:238–244.

- Park SM, LU C-D, Abdela A.1997. Purification and Characterization of an Arginine Regulatory Protein, ArgR, from *Pseudomonas aeruginosa* and Its Interactions with the Control Regions for the *car*, *argF*, and *aru* Operons. J Bacteriol, 179: 5309–5317.
- Patschkowski, T., D. N. Bates, and P. J. Kile. 2000. Mechanisms for sensing and responding to oxygen deprivation, p.61–78. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C.
- Paustian T, 1999. Microbiology and Bacteriology Book. <http://VirtualMicrobiology/www.bact.wisc.edu/Microtextbook>.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T.2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2:157-65.
- Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín- González L, Espín G. 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. J Bacteriol; 184: 5672–5677.
- Pessi G, Haas D .2000. Transcriptional Control of the Hydrogen Cyanide Biosynthetic Genes *hcnABC* by the Anaerobic Regulator ANR and the Quorum-Sensing Regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 182: 6940–6949.
- Pham TH, Webb JS, Rehm BH. 2004. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. Microbiology. 150:3405-13.
- Platt M, Schurr M, Sauer K, Vazquez G, Kukavica-Ibrulj I, Potvin E, Levesque RC, Fedynak A, Brinkman F, Schurr J, Hwang SH, Lau G, Limbach P, Rowe J, Lieberman M, Barraud N, Webb J, Kjelleberg S, Hunt D, Hassett D.2008. Proteomic, Microarray and Signature Tagged Mutagenesis Analysis of Anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, Representing Chronic Cystic Fibrosis Airway Conditions. J Bacteriol, 190:2739-58.
- Povolo S, Casella S. 2000. A critical role for *aniA* in energy carbon flux and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*. Arch Microbiol; 174:42–49.
- Pratt, L.A., Kolter, R. 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Curr Opin Microbiol 2: 598–603.
- Prieto, M.A., Buhler, B., Jung, K., Witholt, B., Kessler, B., 1999. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPO1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. J. Bacteriol.63: 181, 858–868.
- Prigent –Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C.2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. Environ Microbiol. 2: 450:464
- Purevdorj-Gage B, Costerton JW, Stoodley P. 2005. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbiology 151: 1569–1576.
- Quelas JI, López-García SL, Casabuono A, Althabegoiti MJ, Mongiardini EJ, Pérez-Giménez J, Couto A, Lodeiro AR (2006) Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. Arch Microbiol 186:119-128
- Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, Buckingham-Meyer K, Stewart PS. 2007. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. J Bacteriol.189:4223-33.
- Ray A, Willams HD.1997. The effects of mutation of the *anr* gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett.156:227-232.
- Rehm, B.H., 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. Biochem. J. 376, 15–33.

- Ren Q, de Roo G, Ruth K, Witholt B, Zinn M, Thöny-Meyer L. 2009. Simultaneous Accumulation and Degradation of Polyhydroxyalkanoates: Futile Cycle or Clever Regulation?. *Biomacromolecules*, 10: 916–922
- Ren Q, de Roo G, Witholt B, Zinn M, Thöny-Meyer L. 2010. Influence of growth stage on activities of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerase and PHA depolymerase in *Pseudomonas putida* U. *BMC Microbiol*, 10:254.
- Richardson DJ, Berks BC, Russell D A, Spiro S, Taylor CJ. 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci*. 58:165-178.
- Rodríguez-Navarro, D., Dardanelli M., Ruíz-Saínz, J. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett*, 272, 127–136.
- Rudrappa1, T., Biedrzycki, M., Bais H. 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol Ecol*, 64:153–166.
- Ruiz JA, Lopez NI, Fernandez RO, Méndez BS. 2001. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural waters microcosms. *Appl Environ Microbiol* 67:225–230
- Ruiz J., López N. , Méndez BS. 2004. rpoS gene expression in carbon starved cultures of the polyhydroxyalkanoate accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr Microbiol* 48:396–400.
- Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*. 10: 644–648
- Sabra W, Kim E-J, Zeng AP. 2002. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology*, 148, 3195–3202.
- Salunkhe P, Topfer T, Buer J, Tümmler B. 2005. Genome-Wide Transcriptional Profiling of the Steady-State Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Hydrogen Peroxide. *J Bacteriol*. 187: 2565–2572.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184: 1140–1154
- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, Gilbert P. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 186: 7312–7326.
- Sawers G. 1991. Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 5:1469–1481.
- Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 30:1191-212.
- Schreiber K, Boes N, Eschbach M, Jaensch L, Wehland J, Bjarnsholt T, Givskov M, Hentzer M, Schobert M. 2006. Anaerobic Survival of *Pseudomonas aeruginosa* by Pyruvate Fermentation Requires an Usp-Type Stress Protein *J of Bacteriol*. 188: 659–668 .
- Schreiber K, Krieger R, Benkert B, Eschbach M, Arai H, Schobert M, Jahn D. 2007. The Anaerobic Regulatory Network Required for *Pseudomonas aeruginosa* Nitrate Respiration. *J of Bacteriol*, 189: 4310–4314.
- Shalel-Levanon S, San KY, Bennett GN. 2005. Effect of oxygen, and ArcA and FNR regulators on the expression of genes related to the electron transfer chain and the TCA cycle in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 7:364-74.
- Sharma V, Noriega CV, Rowe JJ. 2006. Involvement of NarK1 and NarK2 Proteins in Transport of Nitrate and Nitrite in the Denitrifying Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *App Environ Microbiol*. 72:695-701.

- Simon R, Priefer U, Ptipler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *BiolTechnology* 1:784-791.
- Singh R, Paul D, Jain RK. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol* 14:389-97.
- Sonnleitner E, Gonzalez N, Sorger-Domenigg T, Heeb S, Richter A, Backofen R, Williams P, Hüttenhofer A, Haas D, Bläsi U. The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Mol Microbiol*, 80: 868–885.
- Soum E, Drapier JC. 2003. Nitric oxide and peroxynitrite promote complete disruption of the [4Fe-4S] cluster of recombinant human iron regulatory protein 1. *J of Biol Inorg Chem*, 8:226-232.
- Spormann AM. 2008. *Physiology of Microbes in Biofilms* T. Romeo (ed.), *Bacterial Biofilms*. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 322:17-36.
- Stanier, RY, Palleroni, NJ, Doudoroff M. 1966. The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159–271.
- Steinbuchel A, Valentin H E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett.* 128: 219–228.
- Steinbuchel A, Hein S. 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 71:81–123.
- Strohm T, Griffin B, Zumft W, Schink B. 2007. Growth Yields in Bacterial Denitrification and Nitrate Ammonification. *Microbiology*, 73: 1420–1424
- Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6:199-210.
- Stewart V, Parales Jr J. 1988. Identification and expression of genes narL and narX of the nar (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J of Bacteriol* 170: 1589-1597.
- Strocchi M, Ferrer M, Timmis KN, Golyshin PN (2006) Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics*, 6: 193–206.
- Timm J, Lim E, Gicquel B. 1994. *Escherichia coli*-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to lacZ: the pJEM series. 176: 6749-6753.
- Tribelli PM, Méndez B and López NI. 2010. The oxygen sensitive global regulator, Anr, is involved in the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*. *J Mol Microbiol and Biotechnol.* 19:180-188.
- Tribelli 2006. Análisis de los fenotipos regulados por Anr en *Pseudomonas* sp. 14-3. 50 páginas.
- Trevelyan, W.E, Harrison, JS. 1956. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and micro determination of cell carbohydrate. *J. Biochem.* 63: 23-24.
- Trunk K, Benkert B, Quäck N, Münch R, Scheer M, Garbe J, Jänsch L, Trost M, Wehland J, Buer J, Jahn M, Schobert M, Jahn D. 2010. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol.* 12:1719-33.
- Ugidos A, Morales G, Rial E, Williams HD, Rojo F. 2008. The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environ Microbiol*; 10: 1690–1702.
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A & Filloux A .2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *P Natl Acad Sci USA* 98: 6911–6916.
- Vallet-Gely I, Sharp J., and Simon Dove L. 2007. Local and Global Regulators Linking Anaerobiosis to *cupA* Fimbrial Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. 189: 8667–8676.
- Vander Wauven C, Pierard A, Kley-Raymann M, Haas D. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol.* 160: 928–934.

- Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S, Filloux A.2005. The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*.151:985–997.
- Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S, Filloux A .2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *P Natl Acad Sci USA* 103: 171–176.
- Verhoogt H, Smit H, Abee T, Gamper M, Driessen A, Hass D, Koningsi W.1992. *arcD*, the First Gene of the *arc* Operon for Anaerobic Arginine Catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, Encodes an Arginine-Ornithine Exchanger.*J Bacteriol*, 174:1568-1573.
- Vijgenboom E, Busch JE, Canters W.1997. *In vivo* studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that *azu* expression is under control of RpoS and ANR. *Microbiology*, 143:2853-2863.
- Xu K, Stewart F, Huang CT, McFeters GA.1998.Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *App Environ Microbiol*, 64:4035-4039.
- Yang L, Nilsson M, Gjermansen M, Givskov M, Tolker-Nielsen T .2009. Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Mol Microbiol* 74: 1380–1392.
- Ye RW, Arunakumari A, Averill BA, Tiedjel TA.1992. Mutants of *Pseudomonas fluorescens* Deficient in Dissimilatory Nitrite Reduction Are Also Altered in Nitric Oxide Reduction. *J Bacteriol*, 174: 2560-2564
- Ye RW, Averill BA, Tiedje JM.1994. Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Appl Environ Microbiol*. 60:1053-8.
- Yoon SS, Karabulut AC, Lipscomb JD, Hennigan R, Lyman S, Groce S , Herr AB, Howell ML, Kiley PJ, Schurr MJ, Gaston B, Choi KJ, Schweizer HP,Hassett Dj. 2007. Two-pronged survival strategy for the major cystic fibrosis pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*, lacking the capacity to degrade nitric oxide during anaerobic respiration. *The EMBO J*, 26:3662–3672.
- Yoon MY, Lee K-M, Park Y, Yoon SS .2011. Contribution of Cell Elongation to the Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* during Anaerobic Respiration. *PLoS ONE*, 6:e16105.
- Wai S, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata SI , Yoshida SI .1998.*Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the Exopolysaccharide Materials That Determine Colony Morphology, Stress Resistance, and Biofilm Formation. *App Environ Microbiol* 64:3648–3655.
- Wang J, Yu HQ. 2007. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75:871–878
- Williams H, Zlosnik JE, Ryall B.2007.Oxygen, cyanide and energy generation in cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol*,52:1-71.
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U.2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev*. 24: 661-671.
- Woodmansee A, Imlay JA.2003. A mechanism by which nitric oxide accelerates the rate of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Mol Biol*, 49:11-22.
- Wu G, Moir AJG, Sawers G, Hill S, RK Poole. 2001. Biosynthesis of poly-βhydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* . *FEMS Microbiol Lett*; 194: 215–220.
- Zumt, W. 1997. Cell biology and molecular Basis of Denitrification. *Microbiol Molec Biolg. Rew*. 61:533-616.
- Zumf, W. 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme–copper oxidase type of Inorganic. *J Biochemistry* 194-215.
- Zumft, W.2008. The Smallest Biomolecules: Diatomics and their Interactions with Heme Proteins. Chapter 13 pp. 327-353.