



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**“Producción de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas extremaustralis*:
análisis del metabolismo en distintas condiciones y su influencia en la
adaptabilidad frente al estrés”**

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

Lic. María Gabriela Brito

Directora de tesis: Dra. Nancy Irene López.

Consejera de estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Interacciones Bacterianas. Departamento de Química Biológica, FCEN - UBA, IQUBICEN – CONICET.

Buenos Aires, 2023.

Dedicatoria

En verdad si quiero dedicar lo haría a muchas personas, ya que si bien es fruto de mi trabajo sin aquellos que me rodean no habría sido posible. Ahora si tengo que poner a algunas personas puntuales serian a mi mamá y a mi papá.

Mamá, sos la persona más especial que conocí en mi vida y una de mis favoritas, siempre creíste que este momento llegaría y me alentaste hasta el último minuto de tu vida. El no tenerte en persona este último tiempo fue muy duro para mí y a su vez, aunque no lo creas mi motor. Me lo prometí y te lo prometí a vos que me acompañaste todo este tiempo, es un logro personal y aunque estes en el cielo sé que desde ahí estas disfrutándolo tanto como yo.... ¡Te amo con el alma!

Papá a vos que decirte, ¡gracias! nos diste el ejemplo de trabajar y ser constante, de no bajar los brazos a pesar de todo. Que las cosas catástrofes se transforman en aprendizaje y que no hay nada que cuando uno no quiere de corazón no pueda alcanzar.... ¡Así que mil gracias!

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi directora Nancy, todavía no sé porque me eligió y quizá ella todavía se lo pregunta, pero nos embarcamos en una hermosa aventura en la cual nos nutrimos mutuamente. Fue lindo de a poco ir descubriéndote no tan solo como una guía en lo profesional sino como un pilar importante que me permitió continuar, gracias por la paciencia y no dejar que me rinda con facilidad. Sos una gran persona y te doy las gracias por haber confiado en mi todo este tiempo.

A mis grandes amores, Gonzalo mi compañero de vida, sin tu apoyo constante no hubiera podido llegar a esta instancia, cuidar a nuestra hija, aguantar mis locuras, cansancio, risas, llantos. ¡También te sumo a vos Mili, hija hermosa! con apenas dos años y medios pasados parece que entendieras por lo que está pasando mamá. Llegaste en un momento inesperado a revolucionar todo, de a poco descubrí el propósito de tu existencia, tus besos, tus caras, tus risas, lorita parlanchina me inspiras a ser mejor día a día. ¡Los amo!

No puedo dejar de nombrar a mis hermanos Matías y Sergio quienes siempre estuvieron y me dieron un apoyo a la distancia con llamadas interminablemente largas, con mis preguntas existenciales. Estoy muy agradecida de ustedes, los amo infinito.

A mis ángeles en el cielo, Víctor, Jorge, Julia, Inés, Tete María, que donde quiera que estén se que me apoyan y están felices por mí.

Por otro lado, agradecer a la Labu Sil, al Tata, Migue, Osva, a los tíos Santi, Cyn y las primas Oli y Sofi por estar presentes y ser de apoyo en todo momento.... ¡La flia porteña! Inmensamente agradecida.

Infaltables nombrar a todos mis compañeros de laboratorio, Esme, José, Pau, Ro, Die, Dani, Gon, Marie (la Rubia), Lau, Julia, Rubi, Marie (Catone), como también a

las bedeles Eva, Pato y el personal que trabaja en la Dpto. de Qca. Biológica. Gracias por estar y ser parte de este proceso, cada uno le dio un tinte diferente a esta aventurada tucumana en los pasillos de QB. ¡No quiero olvidarme a nadie así que extendiendo todo mi agradecimiento a todos!

Por otro lado, no quiero dejar de agradecer con quienes realice trabajos de colaboración, Magui, Cris, M. Laura de corazón gracias por abrirme las puertas de sus espacios y dejarme formar parte de una etapa.

A mis amistades extra facultativas, las cuales en cada etapa aportaron un oído, un consejo un abrazo Sofi, Ceci, Flor, Romi, Mecha por las escuchas, mis idas y vueltas, el ánimo y los consejos las quiero mucho.

¡Infinitamente agradecida, gracias, gracias, gracias!

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
1. Características del género <i>Pseudomonas</i>	9
2. Polihidroxicanoatos: bioplásticos con múltiples funciones	10
2.1 Genes involucrados en la síntesis de bioplásticos	12
2.2 Vías metabólicas involucradas en la producción de PHA y regulación de la producción.....	16
2.3 Papel de los PHA en la supervivencia y resistencia a estrés.....	21
2.4 Aplicaciones de los PHA: bioplásticos y mucho más.....	23
3. Aproximaciones para estudios metabólicos globales	26
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	29
Objetivos generales	29
Objetivos específicos	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Microorganismos y plásmidos utilizados	31
Medios de cultivo	32
Condiciones de crecimiento	33
Determinaciones cualitativas y cuantitativas de PHA	34
Técnicas de biología molecular	36
Construcción de una mutante deficiente en la producción de PHB y de PHAcM derivada de <i>P. extremaustralis</i>	41
Experimentos de resistencias a estrés en <i>P. extremaustralis</i>	45

Efecto del pH	45
Sensibilidad al H ₂ O ₂ en medio sólido	46
Sensibilidad a la radiación UVA.....	47
Caracterización de las cepas mutantes	49
Rastreo y análisis de genes asociados a la síntesis de PHA en distintas especies de <i>Pseudomonas</i>	52
Proteómica de <i>P. extremaustralis</i>	52
CAPITULO 1.....	58
OBJETIVOS PLANTEADOS	58
RESULTADOS	59
Medición del contenido de polihidroxicanoatos por cromatografía gaseosa en <i>P. extremaustralis</i>	59
Estudios fisiológicos y de resistencia a estrés en <i>P. extremaustralis</i>	66
Ensayos de estrés.....	77
DISCUSIÓN	90
Producción de distintos tipos de PHA en <i>P. extremaustralis</i>	90
Resistencia a estrés oxidativo y radiación UV.....	94
Efecto del pH en la producción de PHA.....	98
CAPITULO 2.....	103
OBJETIVOS PLANTEADOS	103
RESULTADOS	104
Búsqueda del gen <i>phbC</i> en los genomas de <i>Pseudomonas</i>	104
DISCUSIÓN	122
Adquisición de genes PHB por transferencia horizontal genética (THG)	122
Genes PHAcc en <i>P. extremaustralis</i>	126

Genes PHAcM en <i>P. extremaustralis</i>	126
CAPÍTULO 3.....	128
OBJETIVOS PLANTEADOS	128
RESULTADOS	129
Cuantificación y composición de los monómeros de los diferentes tipos de PHA	129
Análisis comparativo de los perfiles proteicos de <i>P. extremaustralis</i> en diversas condiciones de cultivo.....	131
Expresión de genes relacionados con la producción de PHAcc y PHAcM en todas las condiciones analizadas.....	149
Análisis de proteínas expresadas diferencialmente en fase de crecimiento estacionario en vías metabólicas centrales relacionadas con la producción de PHA	151
Análisis de proteínas diferencialmente expresadas en presencia de octanoato de sodio con distinta relación C/N	162
DISCUSIÓN.....	167
CONCLUSIONES GENERALES.....	172
ANEXO TABLAS	175
Tabla 1A. Lista de proteínas diferencialmente sobre-expresadas en NEO vs. LBO en fase estacionaria y condiciones aerobias.	176
Table 2A. Lista de proteínas diferencialmente reprimidas en LBO vs. NEO en fase estacionaria y condiciones aerobias.	181
Tabla 3A. Lista de proteínas sobre-expresadas en fase estacionaria en medio de acumulación de PHA (NEO). Comparación en aerobiosis. NEOest. vs NEOexp.	185
Tabla 4A. Lista de proteínas reprimidas en fase estacionaria en medio de acumulación de PHA (NEO). Comparación en aerobiosis. NEOest. vs NEOexp.	193

Tabla 5A. Lista de proteínas sobre-expresadas en condiciones aeróbicas vs. microaeróbicas en medio NEO. NEOA. vs NEOM. 197

Tabla 6A. Lista de proteínas reprimidas en condiciones aeróbicas vs. microaeróbicas en medio NEO. (NEOA vs. NEOM) 202

BIBLIOGRAFÍA205

“Producción de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas extremaustralis*: análisis del metabolismo en distintas condiciones y su influencia en la adaptabilidad frente al estrés”

RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros de reserva de interés como plásticos biodegradables y por su papel en el metabolismo bacteriano. De acuerdo a la longitud de los monómeros que los componen, se clasifican en PHA de cadena corta (PHAcc), entre los que se encuentra el polihidroxiacetato (PHA), y PHA de longitud de cadena media (PHAcM). Los PHAcc y PHAcM poseen distintas propiedades termoplásticas, lo que amplía sus posibles aplicaciones industriales. *Pseudomonas extremaustralis* es una bacteria procedente de la Antártida, capaz de sintetizar ambos tipos de polímeros debido a la adquisición por transferencia horizontal genética (THG) de genes para la producción de PHAcc. En esta tesis se estudió la producción de PHA en *P. extremaustralis* en distintas condiciones de cultivo que comprendieron el análisis de distintas fases de crecimiento, de la variación en la relación C/N y la aireación. Se analizó también la relevancia de los distintos tipos de polímero para hacer frente a la radiación ultravioleta A (UVA) y a variaciones de pH. Para ello se utilizaron mutantes en los genes de producción de cada uno de los polímeros y una doble mutante. Se pudo determinar que el desbalance nutricional ejerce más influencia en la producción de PHAcM que en la producción de PHB. El PHB resultó más relevante para sobrellevar la exposición a la radiación UVA y a los cambios de pH en comparación con los PHAcM, mostrando el papel clave del PHB en la fisiología de esta bacteria. Los estudios realizados también permitieron determinar el rango de pH más favorable para la producción de PHA, lo que puede resultar de utilidad para estrategias de producción del polímero o de sus monómeros. Teniendo en cuenta que los genes PHB en *P. extremaustralis*, adquiridos por THG, resultan claves para la supervivencia se realizó un análisis bioinformático comparativo de estos genes y su entorno, en los genomas de *Pseudomonas*. Se encontraron genes PHB en varias especies en las que no habían sido reportados previamente, lo que sugiere que los mismos podrían otorgar una ventaja adaptativa, tal como se demostró en *P. extremaustralis*. Esto tiene especial relevancia en especies patógenas oportunistas humanas, como es el caso de *P. aeruginosa*, o patógenas de vegetales, por su interés clínico y agrícola, respectivamente. Para analizar los cambios metabólicos que tienen lugar en esta bacteria en condiciones de acumulación de PHA se realizó un análisis proteómico en distintas condiciones de cultivo focalizado en el metabolismo de los PHA y en rutas metabólicas centrales que contribuyen con precursores para su biosíntesis. Se corroboró que las enzimas relacionadas con la producción de PHAcM se sobreexpresan en condiciones desbalanceadas de C/N. La fase estacionaria y la aireación favorecieron la expresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de ambos tipos de PHA. Se observó la activación de algunas enzimas que participan en glucólisis (vías de Embden Meyerhof Parnas y

Entner Doudoroff), ciclo de Krebs, de las pentosas fosfato, síntesis de novo y β -oxidación de ácidos grasos, así como la sobreexpresión de vías periféricas al ciclo de Krebs que pueden incrementar la diversidad de precursores disponibles para la biosíntesis. En su conjunto esta tesis explora la contribución de los distintos tipos de PHA en la fisiología de *P. extremaustralis*, pudiéndose identificar condiciones que favorecen la producción de cada uno de ellos. Estos resultados pueden resultar de utilidad para estrategias de producción de los distintos polímeros, sus monómeros o para el empleo de proteínas que participan en su biosíntesis en aplicaciones industriales. Asimismo, la alta resistencia a estrés conferida por los PHA puede contribuir a mejorar el desempeño de microorganismos productores en aplicaciones ambientales tales como la biorremediación o la promoción de crecimiento vegetal.

PALABRAS CLAVE: *PSEUDOMONAS* - POLIHIDROXIALCANOATOS - ESTRÉS - RELACIÓN C/N-PROTEOMICA

“Production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas extremaustralis*: analysis of metabolism under different conditions and its influence on adaptability to stress.”

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are interesting storage polymers as biodegradable plastics and also for their role in bacterial metabolism. They are classified according to the length of their monomeric units into short-chain PHAs (PHAcc), among which polyhydroxybutyrate (PHB) is the more common and more studied compound, and medium-chain length PHAs (PHAcM). PHAcc and PHAcM have different thermoplastic properties, which expands their possible industrial applications. *Pseudomonas extremaustralis* is a bacterium isolated from Antarctica, capable of synthesizing both types of polymers due to the acquisition of PHAcc genes by horizontal gene transfer (THG). This thesis studied PHA production under different culture conditions including different growth phases, variations of the C/N ratio, and aeration. In addition, the relevance of the different types of polymers regarding exposure to ultraviolet radiation (UVA) and pH variations was analyzed. These studies involved the use of mutants in genes involved in the biosynthesis of each type of polymer and a double mutant. The nutrient imbalance exerted more influence on PHAcM than on PHB production. PHB was more relevant for coping with UVA radiation and pH changes compared to PHAcM, showing the key role of PHB in the physiology of this bacterium. The studies allowed the determination of the most favorable pH range for the production of PHA, which could be useful for strategies related to polymer production or its monomers. Considering that the PHB genes in *P. extremaustralis*, acquired by THG, are crucial for survival, a comparative bioinformatic analysis of the *Pseudomonas* genomes was performed to search for PHAcc genes and their genomic context. Genes for PHB production were found in several *Pseudomonas* species where had not been previously reported, suggesting that they might confer an adaptive advantage, as demonstrated in *P. extremaustralis*. This is especially relevant in opportunistic human pathogenic species, as *P. aeruginosa*, or in plant pathogens, due to their clinical and agricultural interest, respectively. To analyze the metabolic changes that take place in this bacterium under different PHA accumulation conditions, a proteomic analysis focusing on PHAs metabolism and central metabolic pathways that contribute to precursors for their biosynthesis was carried out. Proteomic results showed that the enzymes related to the production of PHAcM are overexpressed under unbalanced conditions of C/N. The stationary phase and aeration favored the expression of proteins involved in biosynthesis for both types of PHA. Activation of some enzymes involved in glycolysis (Embden Meyerhof Parnas and Entner Doudoroff pathways), the Krebs cycle, pentose phosphates, de novo synthesis, and β -oxidation of fatty acids was observed, as well as the overexpression of peripheral pathways to the Krebs cycle which can

increase the diversity of precursors available for biosynthesis. In summary, this thesis explores the contribution of the different types of PHA in the physiology of *P. extremaustralis* and identifies conditions that favor the production of each one. These results may be useful for production strategies of the different polymers or their monomers, or the use of proteins that participate in their biosynthesis for several industrial applications. Likewise, the high-stress resistance conferred by PHAs may be of interest for the use PHA producing bacteria in environmental applications such as bioremediation or plant growth promotion.

KEY WORDS: *PSEUDOMONAS* - POLYHYDROXYALKANOATES - STRESS - C / N RATIO-PROTEOME.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Características del género *Pseudomonas*

Las especies del género de *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria del phylum *Pseudomonadota* (Oren y Garrity, 2021), conforman un importante grupo de microorganismos caracterizados por una amplia versatilidad metabólica (Clarke, 1982; Silby et al., 2011), lo cual les ha permitido sobrevivir en condiciones poco favorables. Las bacterias pertenecientes a este grupo se distinguen por su gran adaptabilidad a diversos ambientes, de hecho, han sido aisladas de suelos, aguas, alimentos, así como asociadas a distintas especies de animales y plantas. Es posible encontrarlas en ambientes con bajas temperaturas, altas salinidades y también en aquellos contaminados con hidrocarburos. Asimismo, son de gran importancia desde el punto de vista ecológico al participar en los ciclos biogeoquímicos de los principales elementos y en la degradación de contaminantes biogénicos y de origen antropogénico (Timmis, 2002).

Pseudomonas es uno de los géneros bacterianos mejor estudiados siendo revisado extensivamente por Palleroni (Palleroni, 2005, Palleroni, 2010) durante muchos años. Actualmente, es el género que posee el mayor número de especies entre las bacterias Gram negativas (Lalucat et al., 2022). Las especies de *Pseudomonas* poseen un gran potencial biotecnológico por lo que resultan de interés para aplicaciones tanto ambientales como industriales, siendo de utilidad en procesos de biorremediación (Carmona, et al., 2009; Jiménez, et al., 2002, Dejonghe, 2001), biocatálisis, promoción de crecimiento vegetal incluyendo el biocontrol y la producción de bioplásticos como los polihidroxicanoatos (Rehm, 2003), entre otras.

2. Polihidroxicanoatos: bioplásticos con múltiples funciones

Los polihidroxicanoatos (PHA) fueron descubiertos en la década de 1920 por Lemoigne, quien aisló y caracterizó las inclusiones de polihidroxibutirato (PHB) en *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926). Los PHA son ésteres de hidroxiaácidos (Fig. 1.I) producidos por distintos organismos procariotas, incluyendo bacterias Gram positivas y negativas y especies del dominio Archaea, que se acumulan en gránulos intracelulares como reserva de carbono y energía (Anderson y Dawes, 1990). Si bien el PHA más conocido y el más comúnmente encontrado es el polihidroxibutirato (PHB), existen otros PHA con distintas características en la naturaleza. Los PHA se clasifican de acuerdo a la composición de las unidades monoméricas, en: PHA de cadena corta (PHAcc) compuestos de entre 3 a 5 átomos de carbono y PHA de cadena media (PHAcM) que contienen de 6 a 16 átomos de carbono en sus monómeros (Rehm, 2003). La especificidad por los respectivos monómeros depende de las polimerasas o sintasas, enzimas claves en su biosíntesis, que a su vez se clasifican en polimerasas de clase I que utilizan preferencialmente monómeros de 3 a 5 átomos de carbono y sintetizan PHAcc, como la polimerasa de *Ralstonia eutropha* (actualmente denominada *Cupriavidus necator*), que es también la especie que ha sido utilizada industrialmente para la obtención comercial de este polímero (Reinecke y Steinbüchel, 2009). Las polimerasas de clase II, que se encuentran en las especies de *Pseudomonas*, utilizan preferencialmente monómeros de cadena media, de 6 a 16 átomos de carbono (Rehm, 2003).

Las propiedades físicas y químicas de los PHA los hacen materiales interesantes por sus características de bioplásticos y éstas varían dependiendo de la longitud de los monómeros que los componen, siendo los PHAcc de naturaleza termoplástica, duros y frágiles, mientras que los PHAcM, son más flexibles de naturaleza elastomérica (Catone et al., 2014).

En la actualidad, la mayoría de los plásticos se producen a partir de combustibles fósiles, fuentes no renovables. Estos plásticos derivados del petróleo no son

biodegradables por lo que se acumulan en el medio ambiente, permaneciendo inalterables en la superficie terrestre por años. Numerosas estrategias se han implementado para solucionar el problema de los residuos plásticos, entre ellas la incineración, pero la quema de plásticos es altamente contaminante incrementando el CO₂ en la atmósfera y la liberación de compuestos químicos peligrosos, como las dioxinas, el cloruro y el cianuro de hidrógeno dependiendo de la composición del plástico (Andrady, 2015). Otro procedimiento es el reciclaje, la desventaja de dicho proceso es que no puede realizarse indefinidamente, sumado a que no todos los plásticos son reciclables. Estudios recientes indican que del total producido aproximadamente el 9% se recicla, el 12% es incinerado y el 79% se acumula en vertederos o en el medio natural (Geyer et al., 2017). A pesar de esto, los plásticos de origen petroquímico se acumulan cada vez más en suelos y ambientes acuáticos y si bien son innegables los beneficios y la conveniencia del uso de plásticos para la vida humana, cada vez hay más conciencia sobre los impactos ambientales negativos que surgen de la gran cantidad de desechos plásticos (Sun et al., 2022). En los últimos años, varios estudios han reportado diversos efectos de los microorganismos sobre los plásticos derivados del petróleo, generalmente por hidrólisis u oxidación enzimática, y se ha señalado que algunas bacterias, como *Ideonella sakaiensis*, son capaces de degradar tereftalato de polietileno (PET) como única fuente de carbono y energía, la enzima involucrada se denominó PETasa (Jacquim et al., 2019). Si bien estos trabajos pueden en el futuro generar conocimiento que contribuya a solucionar el problema de estos residuos, los plásticos más comunes han demostrado ser muy recalcitrantes incluso en condiciones que se sabe favorecen la degradación microbiana y el conocimiento sobre la degradación ambiental es aún muy escaso (Krueger et al., 2015).

En este contexto, los plásticos biodegradables o bioplásticos aparecen como una alternativa a la utilización de los plásticos convencionales (Khanna y Srivastava, 2005). Los PHA son polímeros 100 % biodegradables producidos íntegramente por bacterias a partir de recursos renovables y los productos finales de su degradación bajo condiciones aeróbicas son dióxido de carbono y agua, y en condiciones anaeróbicas, metano.

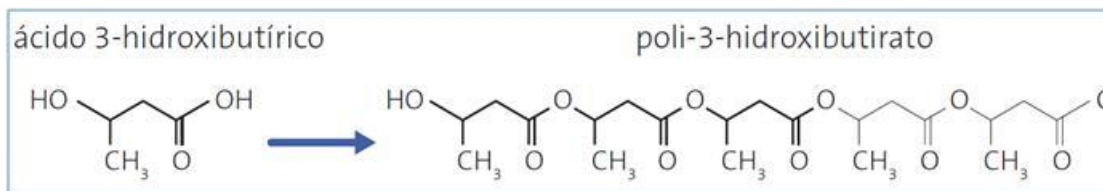


Fig. 1. Estructura del poli 3-hidroxibutirato compuesto por monómeros de C4.

Los PHA son compuestos de almacenamiento de carbono y energía. Estos polímeros normalmente se sintetizan en condiciones de desequilibrio nutricional, donde un nutriente limita el crecimiento, pero hay suficiente carbono en el medio y se movilizan o despolimerizan en condiciones de accesibilidad de nutrientes o por limitación de la fuente de carbono (Velázquez-Sánchez et al., 2020). Dado que la acumulación de PHA se ve afectada por la disponibilidad de nutrientes, las condiciones de cultivo y el balance en la relación C/N suelen utilizarse para lograr la alta producción. Además de su interés biotecnológico, estos polímeros son interesantes en la fisiología bacteriana dado que incrementan la supervivencia y la resistencia a estrés (López et al., 2015).

2.1 Genes involucrados en la síntesis de bioplásticos

La investigación intensiva de las últimas décadas ha llevado a una buena comprensión de los genes y las rutas metabólicas que conducen a la acumulación de distintos tipos de PHA, así como de las propiedades bioquímicas y funciones de las proteínas involucradas en su metabolismo, sin embargo, la interrelación de estos compuestos con el metabolismo central de diferentes bacterias ha sido aún poco analizada. A continuación, se describen los genes involucrados en la producción de los distintos tipos de PHA, las vías metabólicas relacionadas y su regulación.

La producción de PHB ha sido ampliamente estudiada en *Ralstonia eutropha* H16, el organismo modelo utilizado también comercialmente para la producción del polímero.

Si bien el nombre válido, como se mencionó, es *Cupriavidus necator*, esta especie ha sufrido cambios de nombre en varias oportunidades (Méndez et al., 2010) y en los trabajos relacionados con el metabolismo de los PHA sigue siendo mencionada como *R. eutropha* por eso en algunos casos se utilizará este nombre. La ruta de biosíntesis de PHB comprende 3 genes denominados, *phaA*, *phaB* y *phaC*, que codifican una β -cetotiolasa, una (R)-acetoacetyl-CoA reductasa y una sintasa de clase I, respectivamente. La β -cetotiolasa es la responsable de condensar dos moléculas de acetyl-CoA formando acetoacetyl-CoA; la reductasa es una enzima dependiente de NADPH o NADH y, como su nombre lo implica, es la encargada de reducir el acetoacetyl-CoA para dar R(-)-3-hidroxi-butiril-CoA y por último, la polimerasa o sintasa de clase I lo utiliza como sustrato para la polimerización (Steinbüchel y Hein, 2001). Si bien estos genes son los involucrados en la biosíntesis de PHAcc, el orden génico puede variar en las distintas especies, por ejemplo, *phaCABR* en *R. eutropha* (People y Sniskey, 1989) o *phaRBAC* en especies de *Azotobacter* (Pettinari et al., 2003, Peralta-Gil et al., 2002).

En la biosíntesis también participan proteínas regulatorias que se encuentran asociadas a los gránulos del polímero, codificadas por los genes (*phaR*, *phaF* y *phaP*). PhaR es un regulador transcripcional y las fasinas o phasinas son proteínas asociadas a los gránulos del polímero que cumplen funciones regulatorias. PhaP, la principal fasina, es una pequeña proteína anfifílica no catalítica ubicada entre el citoplasma hidrofílico y el polímero hidrofóbico que se asocia con la superficie de gránulos de PHA (Sznajder et al., 2015).

Además de estas proteínas, las depolimerasas (PhaZ), que participan en la degradación del polímero, se encuentran también presentes en los gránulos.

El grupo de genes involucrado en el metabolismo de PHAcc (*phaC1ZC2DFI*) está muy conservado dentro de las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* (Fig. 2I). Este conjunto de genes codifica dos sintasas de clase II (PhaC1 y PhaC2) separadas por el gen que codifica una PHA depolimerasa (PhaZ). Rio abajo de estos se encuentra un gen que codifica un activador transcripcional (PhaD) y dos genes responsables de la síntesis de las fasinas, PhaF y PhaI (de Eugenio et al., 2010).

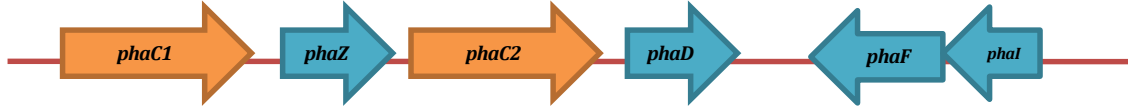


Fig. 2. Esquema del típico grupo de genes asociados a la síntesis de PHAcM en *Pseudomonas*. Los genes *phaC1* y *phaC2* codifican dos polimerasas que se encuentran separadas por el gen *phaZ* que codifica una depolimerasa. El gen *phaD* codifica un regulador transcripcional. Los genes *phaF* y *phal* codifican genes tipo fasinas.

La síntesis de PHAcM ha sido observada en un amplio grupo de especies de *Pseudomonas*, tanto fluorescentes como no fluorescentes, mientras que la producción de PHB ha sido considerada una característica rara o poco común y la ausencia de este tipo de PHA ha sido utilizada durante mucho tiempo como un rasgo negativo de valor taxonómico (Kessler y Palleroni, 2000). Sin embargo, algunas especies de *Pseudomonas*, como *Pseudomonas* sp. 61-3, *P. extremaustralis*, *P. pseudoalcaligenes* y otras incluidas en el grupo *P. oleovorans* son capaces de producir PHB (Matsusaki et al., 1998, Ayub et al., 2006, Manso Cobos et al., 2015, Diard et al., 2002).

P. extremaustralis es una bacteria extremófila, aislada de una charca temporaria de la Antártida y descrita en nuestro laboratorio (López et al., 2009). Esta bacteria constituye un buen modelo para el estudio de la síntesis de PHA dado que es capaz de sintetizar PHB y PHAcM. El análisis del genoma reveló la presencia de varios grupos de genes involucrados en el metabolismo de PHAcc. El grupo de genes involucrados en la síntesis de PHB, *phbRBAC*, (Fig. 3) está incluido en una isla genómica, donde toda la región constituye un mosaico de genes de distinto origen que fueron probablemente adquiridos de β - Proteobacteria por transferencia horizontal (Ayub et al., 2006, Ayub et al., 2007), explicando así la capacidad de producir PHAcc en esta bacteria.

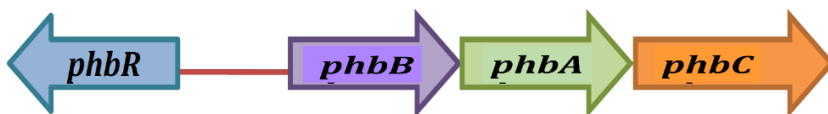


Fig. 3. Esquema de los genes asociados a la síntesis de PHB en *P. extremaustralis*. El gen *phbB* codifica una reductasa, *phbA* codifica una tiolasa y *phbC* una polimerasa. El gen *phbR* codifica un regulador transcripcional.

En *P. extremaustralis* existe otro grupo de genes involucrados en la biosíntesis de PHAcc denominados *phbFPX* (Fig. 4) ubicados en las cercanías del otro grupo de genes, en la misma región genómica, que también presentan alta similitud con genes pertenecientes a *Burkholderiales*, un orden de β - Proteobacteria. Esos genes codifican dos proteínas de tipo fasina PhbF y PhbP y PhbX una proteína de función desconocida anotada como polimerasa o depolimerasa en distintas bacterias. En *P. extremaustralis* esta proteína ha sido encontrada asociada a los gránulos del polímero, sugiriendo una probable función en su metabolismo (Catone et al., 2014).



Fig. 4. Esquema del otro grupo de genes asociados a la síntesis de PHB en *P. extremaustralis*.

El *cluster phaC1ZC2DFI* implicado en el metabolismo de PHAccm en *P. extremaustralis* se encuentra en otra región del genoma y posee todos los genes relacionados con la producción de este tipo de polímeros. Sin embargo, su organización difiere de la del resto de *Pseudomonas* debido a la existencia de una inserción de 7 marcos abiertos de lectura (ORF: Open Reading Frames), no relacionados con el metabolismo de PHAccm (Fig. 5I). Estos ORF ubicados entre los genes *phaD* y *phaF* mostraron también alta similitud con β -Proteobacterias y codifican un regulador de la familia LuxR, una probable subunidad fimbrial, dos chaperonas relacionadas con el ensamblaje de pili, una proteína de membrana externa FimD y otras dos proteínas relacionadas con fimbriae, evidenciando otro probable evento de transferencia horizontal en el genoma de *P. extremaustralis* (Catone et al., 2014).



Fig. 5. Esquema del típico grupo de genes asociados a la síntesis de PHAcM en *Pseudomonas*. Modificado de Catone et al., 2014.

Otros genes relacionados con el metabolismo de los PHA están encargados de transferir a las polimerasas metabolitos intermediarios provenientes de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, como el gen *phaG* que codifica la enzima (R)-hidroxiacil-ACP: CoA transacilasa y el gen *phaJ* que codifica la enoil-CoA-hidratasa que transfiere intermediarios de la β -oxidación de ácidos grasos. En *P. extremaustralis* *phaG* y *phaJ* se localizan en regiones distintas del genoma que no están asociadas a otras secuencias relacionadas con el metabolismo de los PHA. Se encontraron 4 secuencias con similitud a *phaJ* en el genoma de esta bacteria (Catone et al., 2013).

En base a su capacidad de acumular distintos tipos de PHA (PHAcc y PHAcM), *P. extremaustralis* resulta atractiva como modelo de estudio para analizar la producción de estos polímeros.

2.2 Vías metabólicas involucradas en la producción de PHA y regulación de la producción

La biosíntesis de PHAs se encuentra íntimamente relacionada con las rutas metabólicas centrales, las cuales proveen precursores para la síntesis del polímero (Fig. 6.I). En *Pseudomonas putida* donde se ha estudiado en profundidad el metabolismo de los PHA, los sustratos relacionados con la biosíntesis, como los ácidos grasos, son canalizados por vías metabólicas centrales como la β -oxidación y la síntesis *de novo* de ácidos grasos originando precursores directos que son procesados y utilizados luego como sustratos por las sintasas de clase II (La Rosa et al., 2014). Además, otras vías metabólicas pueden unir el catabolismo de fuentes de carbono no relacionadas, como los hidratos de carbono, por ejemplo, con el metabolismo de los ácidos grasos y la biosíntesis de PHA

proveyendo los intermediarios adecuados para la biosíntesis del polímero (Prieto et al., 2016).

Como se mencionó, las enzimas PhaJ y PhaG actúan como nexo entre rutas metabólicas y las polimerasas al proveer el monómero requerido para la biosíntesis. Los ácidos grasos, procesados a través del ciclo de β -oxidación son convertidos a acil-CoAs que se oxidan dando enoil-CoA, (S)-3-hidroxiacil-CoA y (R)-3-cetoacil-CoA a través de la acción de las enzimas transenoil-CoA hidratasa (PhaJ), epimerasa, y (R)-cetoacil-CoA reductasa específica (FabG), respectivamente, que los convierten en los monómeros (R)-3-hidroxiacil-CoA que son utilizados por las polimerasas. Otros sustratos que puedan ser oxidados hasta acetil-CoA, son procesados a través de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. En este proceso, malonil-CoA y su precursor acetil-CoA se activan por transacilación dando proteínas portadoras de acilo (ACP). Estas son condensadas por la cetoacil-ACP sintetasa, reducidas (perdiendo un grupo cetona), deshidratadas y saturadas al correspondiente (R)-3-hidroxiacil-ACP que luego es transacilado por PhaG dando los (R)-3-hidroxiacil-CoA, sustratos de las polimerasas (Prieto et al., 2016).

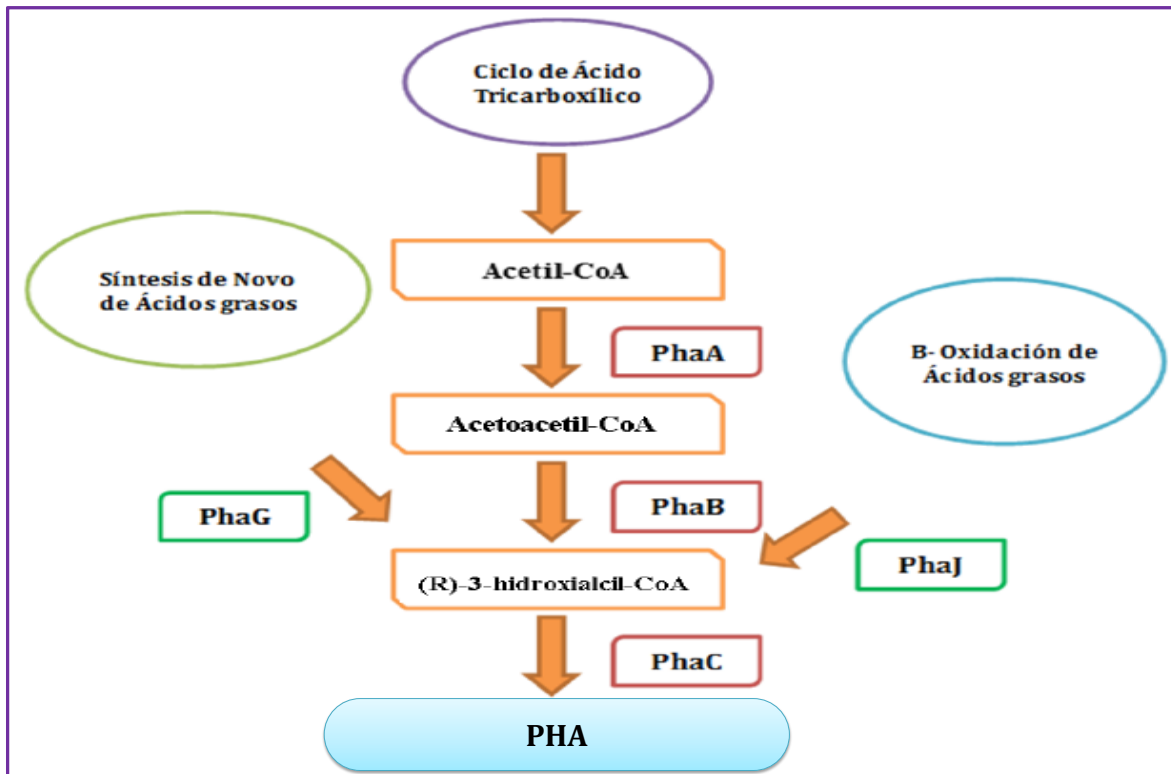


Fig. 6. Distintas vías metabólicas involucradas en la síntesis de PHA.

En *R. eutropha* se demostró que la síntesis de PHB consume poder reductor y su producción está controlada por niveles intracelulares de NADH, NADPH y acetil-CoA (Prieto et al., 2016). Por otra parte, la síntesis y degradación de PHA es un proceso dinámico y en *P. putida* se demostró que la relación acetil-CoA / CoA libre y NADH / NAD⁺ regulan la acumulación / movilización de PHA para adaptar el flujo de carbono a la demanda celular (Prieto et al., 2016). En general el desequilibrio nutricional (es decir, un exceso de carbono o la limitación de un nutriente inorgánico como nitrógeno) se ha considerado un requisito para la síntesis de PHA (Madison y Huisman, 1999), sin embargo, en *P. putida* la limitación de nitrógeno no es estrictamente necesaria para la síntesis de PHA cuando se utilizan ácidos grasos como sustrato, pero puede mejorar el rendimiento de producción del polímero y es por lo tanto un factor utilizado en la producción industrial (Prieto et al., 2016).

Los estudios realizados sobre la regulación de la síntesis de PHA en diversas especies productoras demuestran que la expresión de los genes es inducible y está sometida a dos tipos de regulación. Una regulación específica mediada por reguladores de la transcripción y otras proteínas regulatorias unidas a los gránulos de PHA en el citoplasma de la célula (Maehara et al., 2002; Prieto et al., 1999), y en muchos casos, una regulación global superpuesta a esta regulación específica. Las redes regulatorias globales permiten a las bacterias controlar múltiples funciones celulares en respuesta a cambios en las condiciones fisiológicas o cambios ambientales. Este tipo de regulación incluye factores de transcripción que controlan genes y operones que pertenecen a diferentes vías metabólicas (Ishihama, 2010) y además pequeños RNA (sRNA) que regulan la expresión de genes mediante la unión a mRNA o proteínas (Gottesman y Storz, 2011). El papel de estos reguladores en el metabolismo del PHA recién comienza a ser comprendido proporcionando explicaciones sobre el efecto del estado fisiológico celular en la síntesis y degradación del polímero. Algunos mecanismos de control global, tales como la regulación del estado redox celular, la respuesta a estrés, la respuesta estricta y la represión catabólica han sido relacionados con el metabolismo del PHA y serán mencionados brevemente a continuación.

Dentro de los mecanismos de control global en microorganismos aerobios se encuentran aquellos involucrados en la respuesta a distintas concentraciones de oxígeno, también relacionados con el equilibrio redox celular, que tiene mucha relevancia en el metabolismo de los PHA. En *Escherichia coli* los reguladores globales Fnr y ArcA regulan la transición del metabolismo aeróbico al anaeróbico. En *Azotobacter vinelandii* la mutación de *cydR*, homólogo de *fnr*, provoca un incremento en la síntesis de PHB durante la fase de crecimiento exponencial (Wu et al., 2001). Trabajos realizados en nuestro laboratorio con *anr*, que codifica el regulador global de crecimiento anaeróbico en *Pseudomonas* y es homólogo a *fnr* de *E. coli* (Sawers, 1991), mostraron una disminución de la cantidad de PHB en condiciones microaeróbicas y aeróbicas en una mutante *anr* de *P. extremaustralis* (Tribelli et al., 2010), sugiriendo la influencia de Anr en la síntesis de este polímero. El estudio de estos reguladores que controlan el estado redox celular y la respuesta frente a variaciones en la disponibilidad

de oxígeno pueden ser de utilidad para el diseño de estrategias de producción de PHA por procesos de fermentación, ya que el costo de mantener un cultivo en microaerobiosis es menor que en aerobiosis, debido a la disminución del gasto ocasionado por la alta agitación y el burbujeo de oxígeno. En relación a esto mutantes de *E. coli* en reguladores globales redox que llevan los genes de la biosíntesis de PHB de *Azotobacter* sp. FA8, dado que *E. coli* no produce PHA, han sido utilizadas para incrementar la producción del polímero en condiciones de microaerobiosis (Pettinari y Egoburo, 2021).

Los PHA se acumulan en algunas bacterias frente a variaciones en la disponibilidad de nutrientes. En condiciones de limitación de nutrientes, muchas bacterias desencadenan una serie de eventos conocidos como respuesta estricta, mediados por guanosina penta- y tetrafosfato [(p) ppGpp] y otros nucleótidos. Cuando los nutrientes son escasos, el (p)ppGpp desestabiliza el factor σ^{70} de la RNA polimerasa y por lo tanto reduce la transcripción de algunos genes (housekeeping), permitiendo así la unión de otros factores relacionados con la tolerancia al estrés, como σ^{54} o σ^s (Magnusson et al. 2005; Potrykusy Cashel, 2008). El factor σ^s (RpoS) activa la transcripción de genes implicados en la respuesta general a estrés bacteriana y existen evidencias que indican que el ppGpp induce la expresión de *rpoS* (Gentry et al., 1993). Varios trabajos han señalado la relación entre RpoS y la síntesis de PHA en *R. eutropha* (Brigham et al., 2012), *A. vinelandii* (Peralta-Gil et al., 2002) y en especies de *Pseudomonas*. El análisis de una mutante de depolimerización *phaZ* de *P. putida* GPo500 (anteriormente denominada *P. oleovorans*) en condiciones de ayuno, proporcionó evidencias de la asociación entre la degradación de PHA y la acumulación de ppGpp, así como de su relación con el aumento de la resistencia al estrés y los niveles de RpoS, el regulador global de la respuesta a estrés (Ruiz et al., 2001; Ruiz et al., 2004). El análisis de una cepa de *P. putida* deficiente en RpoS (Raiger-Iustman y Ruiz, 2008) también mostró la influencia del regulador el metabolismo de estos polímeros. Los resultados sugieren que la acumulación de PHA podría ayudar a las células a superar las condiciones adversas encontradas durante la fase estacionaria.

La síntesis y degradación de PHA también dependen de la disponibilidad de fuentes de carbono. La represión catabólica controla el metabolismo del carbono regulando la jerarquía y uso secuencial de las fuentes de carbono disponibles. En *Pseudomonas*, Crc (catabolite repression control) es un regulador clave involucrado en la represión catabólica. El nivel de Crc está controlado por el sRNA CrcZ en *P. aeruginosa* (Sonnleitner et al., 2009) y por dos sRNA (CrcZ y CrcY) en *P. putida*. Un trabajo realizado en *P. putida* KT2440 mostró que Crc inhibió la traducción del mRNA de *phaC1* en fase de crecimiento exponencial mientras que en fase estacionaria la acumulación de PHA alcanzó su máximo debido al antagonismo de CrcZ y CrcY (La Rosa et al., 2014).

El conocimiento del papel de los reguladores globales en el metabolismo de los PHA puede ser de utilidad para la optimización de las estrategias de producción.

2.3 Papel de los PHA en la supervivencia y resistencia a estrés

La producción de PHA ha sido reconocida como una característica que incrementa la supervivencia bacteriana bajo distintas condiciones de estrés (Dawes y Senior, 1973). Numerosos trabajos han abordado el estudio del papel de estos polímeros en la adaptabilidad bacteriana (por ejemplo, Obruca et al., 2017; López et al., 2015). En *Azospirillum brasilense* la comparación entre cultivos bacterianos realizados en condiciones de acumulación y de no acumulación del polímero permitió determinar que el PHA incrementaba la resistencia a la desecación y al estrés osmótico (Tal y Okon 1985). La construcción de cepas mutantes en la producción y degradación del polímero fue utilizada como una herramienta valiosa que permitió profundizar los estudios. Comparando cepas salvajes y mutantes incapaces de producir el polímero en microcosmos, se demostró que la presencia de genes *pha* favorece la supervivencia de distintas especies bacterianas en agua de río, de pozo y en suelo (López y col., 1995, López et al., 1998). En concordancia, mutantes de *Azospirillum brasilense* en *phaC* o *phaZ*, mostraron mayor sensibilidad al estrés que la cepa salvaje (Kadouri et al. 2003, Kadouri et al. 2005). También se observaron resultados similares en otras bacterias

productoras nativas como *Aeromonas hydrophila* (Zhao et al. 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (Pham 2004) o recombinantes de *Escherichia coli* (Wang et al. 2009).

Varios mecanismos han sido identificados como involucrados en el incremento en la resistencia a estrés generada por los PHA. El análisis de una mutante en la depolimerasa *phaZ* de *P. putida* GPo1 (anteriormente denominada *P. oleovorans*), proporcionó evidencias de la asociación entre la degradación de PHA y la acumulación de (p) ppGpp (Ruiz et al., 2001), una alarmona relacionada con RpoS, observándose que la degradación de PHA aumentaba la resistencia al estrés y los niveles intracelulares de RpoS (Ruiz et al., 2004). Durante los últimos años, nuestros trabajos se centraron en *Pseudomonas extremaustralis*. La capacidad de producir PHB resultó esencial para la supervivencia a baja temperatura. Se observó que la degradación de PHB confiere mayor poder reductor, modulando el estado redox celular frente al estrés oxidativo derivado de las bajas temperaturas (Ayub et al., 2009). Por otra parte, cuando esta bacteria crece formando biofilms en frío la capacidad de sintetizar PHB favorece el desarrollo de una forma de vida planctónica, probablemente contribuyendo a la colonización de nuevos ambientes (Tribelli y López, 2011).

Si bien se ha determinado que tanto los PHAcc como los PHAcm tienen un papel protector para las bacterias productoras, la importancia relativa de cada uno de ellos no se ha analizado aún en bacterias que son capaces de acumular ambos polímeros como en el caso de *P. extremaustralis*.

Como se ha mencionado en este apartado los PHA cumplen un papel muy importante en la supervivencia y resistencia a estrés de las bacterias productoras, esto determina que el metabolismo de estos polímeros sea interesante no sólo por la producción de bioplásticos sino también para generar cepas más robustas para diversas aplicaciones biotecnológicas como se mencionará a continuación.

2.4 Aplicaciones de los PHA: bioplásticos y mucho más

Los PHA resultan interesantes y han sido principalmente estudiados por sus aplicaciones biotecnológicas como bioplásticos, aunque actualmente también han sido considerados de importancia para otras aplicaciones. Desde 1980 en que empezó la producción industrial de PHB y sus copolímeros con 3- hidroxivalerato (PHB-co-HV) utilizando *R. eutropha* H16 para mejorar sus propiedades en cuanto a la flexibilidad, varias empresas han intentado producir distintos tipos de PHA a escala piloto o industrial sobre la base del cuidado del medio ambiente y considerando que el precio del petróleo se incrementaría debido a su agotamiento (Chen 2009). Los PHA pueden ser moldeados y procesados en envases, productos descartables, films para empaques, materiales reabsorbibles para aplicaciones médicas, revestimientos alimentarios, aglutinantes de pintura y "cauchos" biodegradables entre otros usos (Wang et al., 2014). Estos productos son compostables, es decir que pueden formar compost, al degradarse biológicamente generando un abono orgánico que no contiene residuos tóxicos. Debido a su biocompatibilidad y a la ausencia de toxicidad los PHA también son de utilidad para aplicaciones biomédicas, como dispositivos cardiovasculares, stents, hilos de suturas, andamios o soportes para ingeniería de tejidos, sistemas de administración de medicamentos y materiales dentales, entre otras aplicaciones (Velázquez-Sánchez et al., 2020). Sin embargo, la utilización de estos plásticos en el mercado no ha sido tan exitosa como se esperaba, debido al alto costo de producción que supera el de los plásticos derivados del petróleo. Esto ha resultado en un gran número de investigaciones buscando alternativas para lograr el abaratamiento de los costos de producción, así como nuevas aplicaciones de estos polímeros que tengan interés industrial. Entre las estrategias relacionadas con el abaratamiento de los costos del sustrato, se destaca el uso de subproductos de otras industrias que resulten económicos. Asimismo, la construcción de cepas modificadas genéticamente en genes relacionados con el metabolismo central o en reguladores globales resultan promisorias. Como se mencionó, cepas recombinantes *E. coli* que expresan los genes PHB de *Azotobacter* sp. FA8, mutantes en el regulador del estado redox celular, ArcA, mostraron mayor acumulación de PHB debido a la desregulación de la respiración

aeróbica y al incremento del poder reductor que podía ser canalizado hacia la síntesis del polímero (Ruiz et al., 2006, Nickel et al., 2006). El uso de estas mutantes permite realizar el proceso en condiciones de microaerobiosis abaratando los costos derivados de la agitación.

Por otro lado, también se están analizando las propiedades del polímero para otras aplicaciones. Los PHA son poliésteres compuestos por ácidos (R) -3- hidroxialcanoicos (monómeros de hidroxiácidos (HA)) y la composición monómero específico y la estructura molecular determina sus propiedades mecánicas (elasticidad, cristalinidad o rigidez). Debido a esto, es posible combinar más de 150 monómeros para formar materiales con propiedades muy diferentes (Steinbüchel y Valentin, 1995). Así, por ejemplo, los PHAcM son considerados candidatos prometedores como bioplásticos con aplicaciones especiales derivadas de propiedades relacionadas con sus cadenas laterales más largas, que le otorgan elasticidad, hidrofobicidad y menor cristalinidad (Chen, 2009). Además de la clasificación basada en el tamaño de monómeros (PHAcc y PHAcM), los PHA también pueden ser clasificados en términos de otros criterios relativos a la macroestructura del polímero (homogéneo, al azar o copolímeros de bloque) y de los sustituyentes funcionales en las cadenas, tales como dobles enlaces, grupos aromáticos, grupos insaturados u otros altamente reactivos (por ejemplo, halógenos, hidroxilo, epoxi, fenoxi, cianofenoxi, nitrofenoxi, grupos tiofenoxi y metil-éster) lo que da origen a los denominados PHAcM funcionalizados con distintas propiedades (Tortajada et al., 2013, Prieto et al., 2016). Esto los hace interesantes también para aplicaciones en química fina, relacionadas principalmente con la diversidad de los monómeros que los componen.

Como se mencionó anteriormente, la vía de β -oxidación juega un papel importante en el suministro de intermediarios para la síntesis de PHA cuando los ácidos grasos se utilizan como fuente de carbono. Es posible manipular esta vía metabólica a través de la mutación de los genes que codifican las proteínas FadA y FadB generando la producción de PHA con cadenas más largas de monómeros, o a través de la modificación

de algunos reguladores, lo que constituye una buena estrategia para obtener polímeros con propiedades mejoradas (Liu et al., 2011, Prieto et al., 2016).

Dado que las *Pseudomonas* no son buenas productoras de biomasa probablemente no serían los microorganismos seleccionados para la producción de bioplásticos a granel, sin embargo, pueden resultar de interés como productoras de bioplásticos de distintos tipos cuyos monómeros pueden tener aplicaciones químicas. Se ha encontrado también que las proteínas anfifílicas relacionadas con la síntesis de PHA que incluyen las phasinas, como PhaP, son útiles para lograr la purificación de otras proteínas o el direccionamiento específico de fármacos (Chen, 2009), también pudiendo cumplir un rol como chaperonas (Mezzina et al., 2015). Las phasinas surgen como proteínas con mucho potencial. Son muy diversas, pudiendo encontrarse múltiples phasinas en un mismo organismo y que en muchos casos solo han sido predichas mediante bioinformática y aún no se han explorado experimentalmente (Brown et al., 2022). Estas proteínas están surgiendo como plataformas biotecnológicas para la bioproducción sostenible a partir de biomasa, por sus funciones que incluyen el mejoramiento de la producción optimizada de bioplásticos, de la tolerancia a los inhibidores del crecimiento en biorrefinerías, de la biocatálisis "verde" y de la biorremediación ambiental, entre otras (Brown et al., 2022).

Además de las aplicaciones mencionadas, relacionadas directamente con el polímero, los monómeros o las proteínas involucradas en su metabolismo, los PHA despiertan interés por su influencia en la supervivencia bacteriana y la resistencia a estrés (López et al., 2015). Esto tiene importancia debido a que pueden resultar de utilidad para mejorar la robustez o el desempeño de bacterias utilizadas en procesos industriales conduciendo a una mejora en el rendimiento de algunos productos.

Los beneficios conferidos por el polímero en la supervivencia bacteriana también pueden ser de interés para diversas aplicaciones en biotecnología ambiental, a través por ejemplo de estrategias de biorremediación. Los microorganismos utilizados para la eliminación de contaminantes deben ser capaces de adaptarse a condiciones estresantes debido a la toxicidad de los contaminantes y también por el estrés oxidativo

generado por estos compuestos. Los PHA pueden producirse a partir de diferentes fuentes de carbono, incluidos diferentes hidrocarburos, como benceno, tolueno y xileno (BTX) (Nikodinovic et al., 2008; Prieto, 2007); por lo tanto, el mismo compuesto destinado a la eliminación podría usarse para la síntesis del polímero lo que contribuye a la persistencia del agente de biorremediación en el medio ambiente. En algunos casos esos microorganismos son capaces también de producir biosurfactantes, compuestos cuyo metabolismo está relacionado con el de los PHA, incrementando la eficiencia del proceso (Soberon-Chavez et al., 2005, Di Martino et al., 2012, Di Martino et al., 2014).

El mejoramiento de la fisiología bacteriana derivada de la producción de PHA también podría ser útil para aplicaciones agrícolas. En *Azospirillum brasilense*, por ejemplo, la acumulación de PHB contribuye a la adaptación en la rizosfera y habilidades de promoción del crecimiento de las plantas (Fibach-Paldi et al., 2012), lo que resulta de interés para el diseño de inoculantes para cultivos vegetales, sobre todo en el caso de zonas desfavorables o sometidas a estrés.

Dada las múltiples opciones para la aplicación de estos polímeros y sus monómeros, el conocimiento del metabolismo de las bacterias productoras en distintas condiciones resulta de interés para comprender los factores clave que gobiernan la producción de PHA. Esto puede conducir al diseño más eficiente de procesos fermentativos o al desarrollo de cepas mejoradas por ingeniería genética y metabólica para lograr un mayor rendimiento o para otras aplicaciones relacionadas con estos polímeros.

3. Aproximaciones para estudios metabólicos globales

En los últimos años las técnicas globales, también denominadas “ómicas”, que comprenden la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, que se enfocan en el estudio del DNA, RNA, proteínas y metabolitos, respectivamente, han surgido como herramientas valiosas para el estudio integral de las capacidades y procesos que tienen lugar en el organismo. A diferencia de lo que ocurre con los estudios fisiológicos

centrados en una o en un grupo pequeño de características, estas aproximaciones globales "ómicas" integran diferentes metodologías para caracterizar y cuantificar diferentes moléculas, permitiendo obtener una imagen detallada de la respuesta de un organismo a su entorno. El desarrollo tecnológico ha permitido obtener los datos masivos (datos ómicos), lo que, junto con la incorporación de la bioinformática, la estadística y la capacidad de procesar esos grandes conjuntos de datos biológicos posibilitó la realización de este tipo de análisis. Los estudios que emplean técnicas "ómicas" permiten comprender de manera más profunda los sistemas complejos y a su vez brindan información valiosa para la generación de nuevas hipótesis de trabajo.

Nuestro laboratorio ha abordado el estudio del genoma de *P. extremaustralis* (Tribelli et al., 2012, Raiger-lustman et al., 2015) obteniendo toda la información genética de esta especie. Además, hemos podido realizar estudios globales de transcriptómica (RNA-seq) de *P.extremaustralis* en condiciones de baja temperatura, microaerobiosis, estrés oxidativo y nitrosativo que proporcionaron información sobre los genes que se expresan en tales condiciones. Esto permitió la detección de genes clave relacionados con la resistencia y vías metabólicas alternativas novedosas, de relevancia para la adaptabilidad de esta bacteria en distintas condiciones (Tribelli et al., 2015, Tribelli et al., 2018, Solar Venero et al., 2019, Solar Venero 2020).

Al igual que en el caso de la transcriptómica, la proteómica es un estudio a gran escala que permite obtener el perfil de las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones de cultivo. La cuantificación de las mismas y la comparación de distintas condiciones resulta de utilidad para identificar aquellas asociadas a determinado estado fisiológico. Actualmente, las técnicas que se realizan utilizando espectrometría de masas (MS) permiten obtener el perfil global de proteínas (Wilkins, 2009). Los proteomas poseen una alta complejidad en comparación con genomas y transcriptomas, que principalmente radica en la gran diversidad de las proteínas en cuanto a número, tamaño, propiedades y modificaciones post-traduccionales. El número y tipo de proteínas en una célula cambia en respuesta al entorno u otros factores, como la etapa de crecimiento o ciclo de desarrollo, lo que hace que el proteoma

sea altamente dinámico. A través de esta técnica es posible determinar la abundancia de las proteínas y los cambios en respuesta a la degradación bajo determinadas condiciones. En algunos casos según las características del análisis es posible también, detectar modificaciones post-traduccionales en las secuencias proteicas, tales como fosforilaciones o glicosilaciones, por mencionar algunas. Si bien los estudios de proteómica proveen abundante información y permiten detectar componentes claves relacionados con la respuesta del microorganismo en determinadas condiciones, poseen también algunas características particulares que se deben tener en cuenta al analizar los resultados obtenidos. Como se mencionó debido a la incorporación de la bioinformática y estadística el panorama general proporcionado por los estudios proteómicos posee significado estadístico y permite identificar las proteínas mayoritarias en una condición con respecto a la otra. Sin embargo, en comparación con los estudios de transcriptómica la cobertura obtenida es menor. Esto se debe por un lado a cuestiones técnicas ya que la técnica únicamente detecta las proteínas más abundantes de la muestra (Timp y Timp, 2020) y también a cuestiones funcionales relacionadas con la expresión de las proteínas. Por este motivo, llegar a lograr la cobertura completa del proteoma de una bacteria resulta complicado sobre todo en genomas de gran tamaño. En algunos casos una aproximación interesante para lograr mayor cobertura consiste en analizar fracciones celulares por separado como fracciones citosólicas, de membrana y periplásmicas, aunque en muchos casos existe superposición de proteínas detectadas. Utilizando este tipo de estrategias otros autores se han conseguido ampliar la cobertura obtenida, por ejemplo, Nilsson *et al.* (2019) lograron identificar el 41,5% del total de secuencias codificantes (CDS) anotadas en el genoma de *Rhizobium favelukesii* LPU83 en respuesta a estrés ácido. Además de estas cuestiones, las proteínas poseen diferencias en la vida media y aquellas con vida media corta podían no ser detectadas en el análisis (Trötschel *et al.*, 2013). Además, las secuencias que codifican proteínas pueden no estar expresadas en las condiciones analizadas o no ser funcionales, por este motivo, en muchos trabajos se habla del proteoma experimental en comparación con el proteoma predicho (Zannier *et al.*, 2022).

Existen pocos trabajos que utilicen aproximaciones proteómicas para el estudio de la producción de estos polímeros en *Pseudomonas*. En *P. putida* KT2442 (Poblete Castro et al., 2012] y *P. putida* LS46 (Fu et al., 2015) se analizó el proteoma durante la producción de PHAcM utilizando decanoato de sodio y residuos de glicerol o ácidos grasos, respectivamente. Recientemente, se realizó un análisis comparativo del proteoma en tres etapas de crecimiento y síntesis de PHA en *P. putida* KT2440 cultivada con ácido oleico durante la síntesis de PHAcM (Mozejko-Ciesielska y Mostek, 2019). Con respecto a productoras de PHAcc existen trabajos de proteómica realizados en *Cupriavidus necator* H16 utilizando residuos de biodiesel como sustrato (Sharma et al., 2016) y también en *E. coli* recombinante para la producción de PHB en fase estacionaria temprana (Han et al., 2001).

No existen trabajos sobre bacterias que acumulen ambos tipos de polímeros (PHAcc y PHAcM) como en el caso de *P. extremaustralis*. Los estudios de proteómica en distintas condiciones podrían proporcionar un panorama general de las vías metabólicas que se activan en relación a la producción de estos polímeros.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo se enmarca dentro del objetivo general del laboratorio que comprende el estudio del metabolismo de los polihidroxicanoatos (PHA) y su relación con la adaptabilidad frente a distintas situaciones de estrés.

Si bien la producción de PHA se encuentra extendida a varios géneros bacterianos, existen pocos organismos capaces de acumular distintos tipos de estos polímeros como *P. extremaustralis*. Debido a que esta bacteria puede crecer en distintas condiciones de temperatura, aireación y en varios medios de cultivo constituye un buen modelo para este tipo de estudios.

En base a esto, la hipótesis del trabajo plantea que la síntesis de PHAcc y PHAcM en *P. extremaustralis* es afectada diferencialmente por la relación C/N y condiciones de aireación. Se postula también que los distintos tipos de polímero tendrán distinta influencia en la supervivencia y en la resistencia a estrés.

Los estudios de producción de PHA se basan fundamentalmente en técnicas microbiológicas y bioquímicas tradicionales, pero los análisis a nivel global son pocos. Un estudio masivo como la proteómica, podría ayudar a conocer la complejidad de los mecanismos que utilizan las bacterias para sobrevivir situaciones de estrés y a comprender en mayor profundidad el metabolismo de estos compuestos.

En base a esto se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

1. Analizar la producción de PHA en *P. extremaustralis* en distintas condiciones de cultivo con diferencia en la relación C/N. Evaluar la relevancia de los distintos PHA en la supervivencia frente a factores de estrés.
2. Analizar los genes relacionados con la producción los distintos tipos de PHA (PHAcc; PHAcM) en los genomas de *Pseudomonas* disponibles en base de datos. Comparar el contexto genómico en las distintas especies.
3. Analizar el proteoma de *P. extremaustralis* en distintas condiciones de cultivo (relación C/N, fase de crecimiento y aireación) para determinar la relevancia en el metabolismo de los distintos tipos de PHA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y plásmidos utilizados

Los experimentos se realizaron con *Pseudomonas extremaustralis* 14-3b una especie aislada de una charca temporaria de la Antártida (López et al., 2009), así como con sus mutantes derivadas deficientes en cuanto a la producción de PHA. Las características de estas y otras cepas y plásmidos utilizados durante el desarrollo de este trabajo se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepas	Características Relevantes	Referencias
<i>P. extremaustralis</i> 14-3b DSM 25547	Salvaje, productora de PHB y PHAcM	López et al. 2009, Tribelli et al., 2012
<i>P. extremaustralis</i> PHA-	Mutante incapaz de producir PHAcM, Gm	Catone, 2013
<i>P. extremaustralis</i> PHB-	Mutante incapaz de producir PHB, Kan	Catone, 2013
<i>P. extremaustralis</i> PHAB-	Mutante incapaz de acumular PHB y PHAcM, Kan, Gm	Este trabajo
<i>P. extremaustralis</i> PHB- /pMCS3Cbsec	Cepa complementada con el plásmido pBBR1MCS-1 conteniendo el gen <i>phbC</i> , capaz de acumular PHB. Kan, Tet	Este trabajo.
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Cepa salvaje aislada de una herida	Holloway et al., 1994
<i>P. putida</i> KT2440	Cepa libre de plásmidos derivada de cepa mt-2, productora de PHAcM	Nelson et al., 2002
<i>P. putida</i> GPp104	Mutante de <i>P. putida</i> KT2440 incapaz de producir PHA	Huisman et al., 1991

<i>Escherichia coli</i> S17-1	Conjugativa. Rec- derivado de 294 con RP4-2Tc::Mu Km ⁿ ::Tn7 en el cromosoma	Simon et al., 1983
<u>Plásmidos</u>		
pEX18Tc	Tet ; oriT+ sacB+	Hoang et al., 1998
pMCS3Cbsec	Plásmido pBBR1MCS-1 conteniendo el gen <i>phbC</i> , capaz de acumular PHB. Resistencia Tet	
pPHU28	<i>tetAtetRlacZ' oriT</i>	Hubner et al., 1993

Medios de cultivo

Las bacterias se desarrollaron en los medios de cultivo descritos en la Tabla 2. Cuando fue necesario se adicionó agar (1,5%) para cultivos realizados en medios sólidos.

Tabla 2. Composición de medios de cultivos y relación carbono nitrógeno.

Medios	Composición	Octanoato de sodio	Relación C/N
LB	NaCl 10g Tryptona 10g Extracto de levadura 5g	Sin agregado	3,7
LBO	NaCl 10g Tryptona 10g Extracto de levadura 5g	0,25%	4,5
0,5 NE2 (NEO)	NaNH ₄ HPO ₄ x 4 H ₂ O 1,75g. K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 7,5 g. KH ₂ PO ₄ 3,7 g Extracto de levadura 1g	0,25%	8,5
0,5 NE2 (NEO s/l)	NaNH ₄ HPO ₄ x 4 H ₂ O 1,75g. K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 7,5 g. KH ₂ PO ₄ 3,7 g	0,25%	12,3

Para la condición de acumulación de PHA, los medios de cultivo fueron adicionados con 0,25% de concentración final de octanoato de sodio (SIGMA) previamente esterilizado.

Condiciones de crecimiento

Cultivos

Los cultivos de *P. extremaustralis* y sus mutantes derivadas fueron realizados en los medios descritos en la Tabla 2. MyM. Previo a cada ensayo se realizó un cultivo *overnight* a partir de colonias aisladas de LB agar de 24 h provenientes de un stock preservado en glicerol 20% y conservado a -80°C . Este precultivo fue utilizado para inocular a una densidad óptica (DO) inicial de 0,05 los cultivos utilizados en los diferentes ensayos de este trabajo. De ser necesario se agregaron antibióticos en las concentraciones que se indican en cada caso.

Para las condiciones aeróbicas se trabajó con Erlenmeyers manteniendo una relación 1:10 (volumen medio de cultivo: volumen Erlenmeyer) y una agitación a 200 rpm, a 28°C o 10°C de temperatura de acuerdo al estudio, en tiempos de 24 h o 72 h, respectivamente.

En las condiciones de microaerobiosis se empleó una relación 1:2 (volumen de medio: volumen de frasco), con una agitación suave de 50 rpm. Los cultivos en estos casos fueron suplementados con 0,08% de KNO_3 (Tribelli et al. 2010), y cultivados a 28°C durante 24 h.

Curvas de crecimiento

Para analizar el desarrollo bacteriano se realizaron curvas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo LB, LBO o el medio 0.5NE2 (Huisman y col., 1991) con bajo contenido de N y suplementado con 0,25 % de octanoato de sodio que favorece la acumulación de polihidroxicanoatos (PHA). Cualquiera sea el caso se partió de precultivos *overnight* (ON), como se describió previamente y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) a lo largo de 24h, a intervalos de 1 h utilizando un espectrofotómetro. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada uno de los casos.

Antibióticos empleados

Cuando fue necesario se agregaron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: Kanamicina (Km) $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, Gentamicina (Gm) $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ y Tetraciclina (Tet) $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$

Conservación de las cepas

Para la conservación de las cepas utilizadas en el trabajo, se realizaron cultivos de 5 ml en medio LB (con el agregado de antibióticos de ser necesario) durante 18 h, se centrifugaron a 8000 rpm durante 2 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio LB fresco, y a una alícuota de 600 μl de las células resuspendidas se le agregó 400 μl en glicerol 50 %, resultando en una concentración 20% (v/v) final, el cual actúa como criopreservante. Las cepas se conservaron el $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas.

Determinaciones cualitativas y cuantitativas de PHA

Determinación cualitativa - Tinción de PHA con Azul de Nilo.

Para determinar la presencia de los gránulos del polímero en cada cepa estudiada, se procedió a realizar la tinción y observación al microscopio con el colorante Azul de Nilo (Ostle y Holt 1982). El colorante es una oxazina básica soluble en agua y en alcohol etílico.

Para los cultivos en medio líquido se tomaron 5 μl de cultivo y se colocaron sobre el portaobjeto mientras que si la observación se realizó a partir de una placa se tomó una colonia con el ansa y se disgregó sobre el portaobjeto con una gota de agua destilada. En ambos casos se extendió sobre el portaobjetos, se dejó secar y luego se fijó mediante calor por llama de mechero. Previamente se colocó el colorante, preparado al 0,1 % en agua, en una jarra de "coplin" a 60°C durante 15 min, donde luego se sumergieron los extendidos durante 10 min a la misma temperatura. Se lavaron con agua para eliminar el excedente de colorante y luego con ácido acético 8% durante un minuto. Se sacó el excedente y se dejó secar a temperatura ambiente. Se observó en el microscopio a una longitud de onda de 460 nm. Los gránulos fluorescen en color naranja.

Cuantificación de PHA por cromatografía gaseosa

Para realizar la cuantificación de PHA y la determinación de la composición de los monómeros fue necesaria en una primera instancia la puesta a punto de la metodología, debido a la adquisición de un nuevo cromatógrafo gaseoso en el Departamento de Química Biológica. Las determinaciones del contenido del polímero se realizaron en medios de cultivo con diferente relación C/N como se indicó en la Tabla 2 para evaluar su influencia en la producción de los tipos de PHA, a partir de pellets de células liofilizadas sometidas a metanólisis (Braunegg et al. 1978). Para la metanólisis se utilizaron entre 4-10 mg de pellet celular liofilizado al que se le agregaron 2 ml de una mezcla de metanol con 15% (v / v) de H₂SO₄ y 2 ml de cloroformo grado HPLC. Esta mezcla fue incubada a 100 °C durante 140 min en un baño de aceite. Finalizado el proceso los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron en un baño de hielo, para minimizar la evaporación de cloroformo durante la manipulación. Se agregaron 0,5 ml de agua destilada, se agitó y se extrajo la fase orgánica. Se agregaron cristales de sulfato de sodio para extraer el agua remanente. La extracción se repitió dos veces y se controló que el pH de las muestras sea mayor que 5, para evitar el deterioro de la columna y equipo. Los ésteres metílicos de los monómeros contenidos en la fase orgánica fueron analizados por cromatografía gaseosa. Se utilizó ácido benzoico (0,5 mg / ml) como patrón interno (Manso Cobos et al. 2015). Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 7820A, con detector de ionización de llama (FID) y con inyección automática ALS 7693. Se utilizó una columna capilar HP-5 (30 m; espesor de película de 0,25 µm e ID de 0,25 mm) que se caracteriza por ser no polar, compuesta por un 5% de fenil y 95% dimetilpolisiloxano, con un rango de temperatura de trabajo amplio que va desde -60 a 350°C. El horno del GC se calentó inicialmente a 40 °C durante 0,5 min, luego se utilizó una rampa de 5 °C / min hasta llegar a 65 °C. Finalmente, se incrementó la temperatura 15 °C / min hasta 130 °C, la cual se mantuvo durante 3 min, llegando finalmente a 150°C.

Las temperaturas del inyector y FID se ajustaron a 250 °C y 300 °C, respectivamente. El nitrógeno se utilizó como gas portador (*carrier*) en un caudal de 3 ml/min. El volumen de inyección fue de 1 µl con split 45:1. Las soluciones estándar se prepararon usando

ácido poli (3-hidroxi-butírico) (SIGMA Aldrich) y PHAc_m purificados de *Pseudomonas putida* KT2440, una conocida productora de PHA, compuesto por monómeros de C₆ y C₈ (Holloway y col., 1986). Todos los experimentos de medición del polímero se realizaron al menos por triplicado utilizando cultivos independientes. El contenido de PHA fue calculado como porcentaje del peso seco celular (% peso seco). La composición de los monómeros se confirmó por espectrometría de masas utilizando un servicio del Departamento de Química Orgánica (FCEN-UBA). Para la cuantificación cromatográfica, así como la identificación de los picos característicos de los diferentes PHAs realizados por GC- Masa en el servicio de Química Orgánica se utilizaron las condiciones que se detallan a continuación:

Columnas ZB-5 (30 m; 0,25 mm; 025 µm), flujo de gas carrier 1 ml/min. Inyector 200 °C, relación de Split 40:1, Temperatura de interfaz CG-EM; 280°C. Temperatura del horno: 40°C a 5°/min hasta 65°C, luego a 15°/min hasta 130 °C (20 min).

Técnicas de biología molecular

Extracción de plásmidos

Se utilizó el siguiente protocolo: Se trabajó con cultivos crecidos *overnight* en LB (con los correspondientes antibióticos), las extracciones se realizaron a partir de 1-5 ml de cultivo de acuerdo al número de copias del vector. Se centrifugaron durante 1 min a 13.000 rpm para obtener el *pellet* de células. Este se resuspendió en 200 µl de *buffer* 1, luego se agregaron 200 µl de *buffer* 2, se mezcló por inversión y se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 300 µl de *buffer* 3 en frío. Se centrifugó a 13.000 rpm en microcentrífuga durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se traspasó a un tubo limpio. Para precipitar se agregaron 900 µl de etanol absoluto, se centrifugó 20 min a 13.000 rpm y se lavó con 500 µl de etanol 70%. Se centrifugó 5 min y se descartó el etanol, dejando secar en estufa 30 min a 37°C para asegurar evaporación total del etanol. Luego se procedió a resuspender con 60 µl de H₂O deionizada.

Composición de los buffers mencionados:

Buffer 1 : Tris· Cl 25 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM ; RNAsa 100 µg/ml

Buffer 2: NaOH 200 mM; SDS 1%

Buffer 3: Acetato de potasio 3 M pH 5.5

Cuando fue necesaria la obtención de plásmidos con mayor grado de pureza se utilizó el kit comercial Easy Pure® Plasmid Mini Prep (AP-BIOTECH) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Digestión con enzimas de restricción

Para la digestión con enzimas de restricción (marca New England Biolabs o Promega) se siguió el protocolo de Sambrook et al., (1988) utilizando los *buffers* correspondientes y siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Se analizaron las secuencias de interés en el servidor NEB *cutter in silico* (www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools). El programa permitió realizar la búsqueda de enzimas de restricción que corten los fragmentos del *phbC* y *phbC::Km* en un solo sitio.

La enzima de restricción Sall junto con el *buffer* D10x para el fragmento salvaje del gen de PHB, en cambio para la mutante se utilizó HindIII más el *buffer* E10 x.

Otra enzima de restricción utilizada fue la XhoI con el *buffer* en un volumen final de 20 µl, la cual se utilizó con el fin de liberar el fragmento conteniendo el gen de *phbC* presente en la cepa complementada, que luego fue enviado a secuenciar.

Reacciones de ligado

Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Promega) para realizar el ligado entre insertos y vectores, siguiendo las especificaciones del fabricante. La relación DNA inserto/DNA vector fue de 3:1 o 1:1 según las concentraciones obtenidas. La reacción se llevó a cabo por un periodo de 16 a 18 h a 16°C.

Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización y la posterior purificación de plásmidos y de fragmentos de DNA obtenidos por reacciones de PCR, reacciones de ligado o cortes con enzimas de

restricción se realizaron electroforesis en geles de agarosa. Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE 1% a 100 volts en cubas marca Sigma (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA). Para fragmentos con rangos de tamaño de 3000 a 500 pb se utilizó una concentración de agarosa de 0,7 a 1 %. Como marcadores de peso molecular se utilizaron el DNA del fago λ digerido con HindIII (NEB), y la escalera de 1 kb de Promega. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) durante 15 min. El DNA se visualizó con un transiluminador de luz UV y se fotografiaron con una cámara digital Kodak Digital Science CD120.

Composición del buffer TAE 50X (por litro).

Tris base 242 g

Ácido acético glacial 57,1ml

EDTA 0,5 M pH 8,0 100 ml

Buffer de siembra 6X (por 100 ml)

Azul de bromofenol 0,25 g

Sacarosa 40 g

Purificación y Cuantificación de DNA

Se utilizaron los kits comerciales de Qiagen (Qiaex II gel extraction kit) para la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por reacciones de PCR o tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones, siguiendo las especificaciones del fabricante. El DNA presente se cuantificó utilizando el analizador digital 1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science), utilizando como patrón 100 ng de λ HindIII o utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) con su correspondiente software.

Preparación y transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Para la obtención de células competentes de las cepas de *E. coli* se inocularon 10 ml de LB con colonias aisladas de cultivos realizado en placa y se incubaron *overnight* a 37°C

y 200 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 50 ml de SOB-glicerol 30 g/l, colocados en un Erlenmeyer de 500 ml, partiendo de una DO_{600nm} inicial de 0,05. Se incubó a 37°C y 200 rpm alrededor de 3 horas o hasta alcanzar una DO de 0,5. Luego se procedió a incubar durante 10 min a 4°C y se obtuvo el pellet celular mediante centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C). Los pasos posteriores variaron según si las células competentes se prepararon por tratamiento químico (químico competentes) o electro competentes.

i) Químico competentes: El pellet celular se resuspendió en 8 ml de una solución de $CaCl_2$ 0,1 M (previamente enfriada), se incubó 1 hora a 4°C y se centrifugó durante 10 min a 4°C a 4000 rpm. Se resuspendió el pellet suavemente en una solución de $CaCl_2$ 0,1 M y glicerol 10 % m/v.

ii) Electro competentes: El pellet se lavó tres veces con 25 ml de glicerol 10 % m/v en agua destilada (previamente enfriada) y las células se resuspendieron en 1 ml de la misma solución de lavado.

En ambos casos las células se separaron en alícuotas de 50 μ l. Las mismas se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Composición del medio SOB

Triptona.....	2g/l
Extracto de levadura.....	5 g/l
NaCl.....	8,56 mM
KCl.....	2,5 mM
MgCl ₂ *.....	10 mM
MgSO ₄ *.....	10 mM

*Ambas sales de magnesio se agregaron luego de autoclavar al resto de los componentes del medio. Para la preparación se utilizó H₂O bidestilada.

Transformación

En el caso de utilizar células competentes obtenidas por métodos químicos, se agregaron 5-10 µl de DNA (10-50 ng), a 50 µl de células competentes, se incubaron 30 min en hielo, luego se aplicó un shock térmico a 42°C durante 90 segundos y nuevamente se incubó en hielo por 10 min. Para la recuperación de las células competentes post-transformación se agregaron 300 µl de SOC, * que posee la misma composición que el SOB, pero esta suplementado con 20 g/l de glucosa, y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación, las células se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y el pellet se resuspendió y se sembró en placas con el medio de selección según correspondiese.

En el caso de utilizar células electro competentes: se mezclaron 2 µl de DNA con 50 µl o 100 µl de células electro competentes. La electroporación se efectuó en un electroporador BioRad Micro Pulser™ en cubas de 0,2 cm, utilizando un programa predeterminado (programa 2) que ofrece el equipo. Para la recuperación de las células competentes se agregó inmediatamente 1 ml de SOC y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación se centrifugaron las células 5 min a 5000 rpm, se resuspendió y se sembró el pellet celular en placas con medio de selección correspondiente.

Conjugación

A partir de precultivos realizados según lo ya descrito se inocularon cultivos líquidos partiendo de una D.O 0,05. Para *Pseudomonas* los cultivos se realizaron a 28°C y para *E. coli* a 37°C, en ambos casos los cultivos se agitaron a 200 rpm. Una vez que los cultivos alcanzaron una D.O.= 0,5 se tomó un volumen total de 1 ml con una relación 1:2 cepa dadora (*E.coli*)/ receptora (*P. extremaustralis*), se centrifugaron 1 min a 6.000 rpm y se resuspendió el pellet en 100 µl de MgSO₄ 10 mM. Los 100 µl de la mezcla de cepas fueron colocados cuidadosamente sobre filtros de 0,22 µm estériles en placas de LB. La placa se incubó 18 h a 28°C luego de lo cual se levantaron los filtros y se resuspendieron en 1 ml de MgSO₄ 10 mM. Se centrifugó 1 min a 6.000 rpm y se sembraron en medio de selección. El crecimiento de las transconjugantes se observó luego de 48 h de

incubación a 28°C. Una vez desarrolladas las colonias se realizaron cultivos puros a partir de las colonias de interés.

Construcción de una mutante deficiente en la producción de PHB y de PHAcM derivada de *P. extremaustralis*

Para la construcción de la doble mutante de *P. extremaustralis*, es decir aquella cepa que no posee la capacidad de sintetizar ningún tipo de PHA, se utilizaron varias técnicas de biología molecular que se describieron anteriormente.

Se procedió a trabajar con una mutante PHA- incapaz de sintetizar PHAcM, previamente construida en el laboratorio (Catone 2013) con resistencia a gentamicina (Gm). Se contó además con un plásmido pEXTet::*phbCKm* que posee una construcción que contiene el gen de la sintasa *phbC*, involucrada en la producción de PHB, interrumpido con el casete de resistencia a Kanamicina (Kan), clonado en el plásmido pEX18Tc (Hoang et al., 1998) que es suicida en *Pseudomonas*.

El plásmido fue transferido por electroporación a *E. coli* λ -S17. Se realizó la conjugación entre *E. coli* λ -S17/ pEXTet::*phbCKm* y la mutante PHA- (Catone, 2013). La selección de las cepas transconjugantes se realizó en medio 0,5NE2 adicionando los antibióticos Gm 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ Kan 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ y octanoato de sodio como fuente de carbono, donde la bacteria dadora no es capaz de crecer. Luego de reiterados intentos no exitosos se procedió a cambiar el plásmido por el pPHU281 Tet^r (Hubner et al., 1993) y se realizó un subclonado cortando con la enzima de restricción KpnI ambos plásmidos y luego ligando el fragmento *phbCKm* al nuevo plásmido.

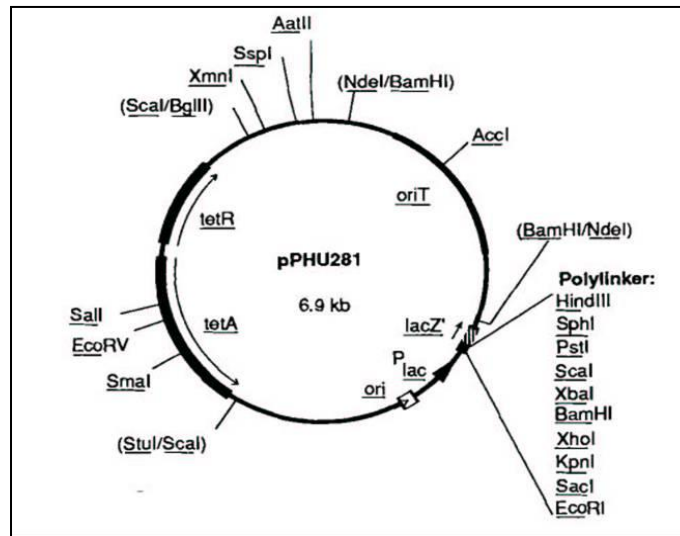


Fig.1. Mapa del vector plasmídico pPHU281 utilizado en la construcción de la doble mutante PHAB-, con resistencia al antibiótico tetraciclina.

El plásmido fue transferido a células competentes de *E. coli* λ -S17 por electroporación seleccionando aquellas que fueron capaces de adquirir el plásmido con la construcción en medio con tetraciclina (Tet) y Kan. Obtenida la construcción de interés se realizó el proceso de conjugación explicado anteriormente hasta conseguir la mutante deseada con la incapacidad de síntesis de ambos polímeros. La mutante fue verificada por observación a través del microscopio con tinción Azul de Nilo, por cromatografía gaseosa en cuanto a su incapacidad de producir ambos tipos de PHA, por crecimiento con ambos antibióticos, por PCR, y por secuenciación del fragmento de *phbC* interrumpido por Km.

Verificación de fragmentos

Los fragmentos obtenidos de la secuenciación se compararon en la base de datos BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para verificar la identidad de los mismos.

Oligonucleótidos empleados

En la Tabla 3 se pueden ver los juegos de *primers* utilizados en las reacciones de PCR.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Utilizado para amplificar
phbC-Forward	GACCTGATCGAAGCCAACG	phbC::Kan y phbC-WT
phbC-Reverse	GGCTTCATCGAGGGTTTCC	phbC::Kan y phbC-WT
DR2-up	TCGAGCAAGACGTTTCCCGTTG	Casete de kanamicina
FA2-low	CTATGGAAGTGCCTCGGTGA	Casete de kanamicina
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	Plásmido pBBR1MCS-3 y gen WT de <i>phbC</i>
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	Plásmido pBBR1MCS-3 y gen WT de <i>phbC</i>

Los *primers* phbC F y R (Tabla 3) amplifican un fragmento de 2.122 pb por fuera del gen salvaje de *phbC* y con un tamaño de 2.736 pb para la mutante derivada simple PHB- y la doble mutante PHAB-. El segundo juego de primers (Tabla 3) se utilizó en forma combinada con los primeros, para obtener los fragmentos que se secuenciaron de 1.128 pb y de un tamaño de 1.114 pb, comprendiendo parte del gen *phbC* con parte del casete de Km. Los primers M13R y M13F se utilizaron para amplificar el gen *phbC* gen nativo de *P. extremaustralis* a partir del plásmido que se utilizó para la complementación.

Condiciones utilizadas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la Tabla 4. se observa la composición de la mezcla de reacción general que se utilizó para las reacciones de PCR tanto para la verificación de genes salvajes (WT) pertenecientes a *P. extremaustralis* como para las construcciones y verificaciones nombradas anteriormente. La enzima utilizada fue la Pfu DNA polimerasa de Promega, la cual es más progresiva que la Taq polimerasa. Los oligonucleótidos se describen en la Tabla 3.

Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR.

Reactivos por tubos	(50 µl volumen final)
Buffer de reacción Promega 5X	10 µl
dNTPs 2mM	5 µl
Pfu polimerasa (Promega)	0,5 µl
Magnesio 25 mM	Dependiente de la reacción
Oligoupper (3µM)	10 µl
Oligolower (3µM)	10 µl
Dimetilsulfoxido (DMSO)	1 µl
Templado (ADN)	2 µl
Agua miliQ	11,5 µl
Volumen total de mezcla	50 µl

En la tabla 5 se puede observar el programa utilizado para obtener los fragmentos de PCR.

Tabla 5. Programa de PCR

Programa de ciclado	Tiempo	Temperatura °C
1-Desnaturalización inicial	7 min	95
2-Desnaturalización	30 seg	95
3-Unión primer-DNA molde	30 seg	55
4-Extensión	6 min	72
5-Repetición	35 ciclos	Desde paso 2 al 4
6-Extensión final	10 min	72

Experimentos de resistencias a estrés en *P. extremaustralis*

Efecto del pH

Se trabajó con *P. extremaustralis* y sus mutantes. El medio de cultivo que se utilizó fue LB caldo suplementado con octanoato de sodio (LBO). El pH se ajustó a 5,5; 6; 7; 7,5; 8; 9; 9,5 y 10 con HCl 1N o NaOH 1N según corresponda utilizando un pHmetro (Consort C231).

Una vez alcanzado el pH deseado se esterilizó el medio por filtración y se midió nuevamente el pH para verificar que se mantenga al pH deseado. Los Erlenmeyers con el cultivo se inocularon con DO_{600nm} inicial de 0,05, a partir de cultivos *overnight* en condiciones aeróbicas, detalladas anteriormente. Los cultivos se realizaron con una relación volumen de cultivo/ volumen del Erlenmeyer 1:10 y en agitación 200 rpm a 28°C durante 24h.

El efecto del pH sobre el crecimiento y la acumulación del polímero se evaluaron a través de diferentes ensayos.

Recuento de colonias

Se tomaron alícuotas de cada cultivo de *P. extremaustralis* tanto al inicio como al término de la incubación (24h) y se realizaron diluciones seriadas para realizar el recuento de UFC/ml, en placas de LB agar. Las cuales fueron incubadas en estufa a 28°C durante 24h.

Observación de gránulos de PHA por microscopia.

Los cultivos de *P. extremaustralis* y sus mutantes luego de 24h fueron observados al microscopio con tinción de Azul de Nilo, como se explicó anteriormente.

Medición de pH sobrenadante.

Transcurridas las 24 h de incubación de los cultivos líquidos, éstos fueron centrifugados a 7.000 rpm (Eppendorf Centrifuga 5804R) de esta manera se obtuvo pellet celular y

sobrenadante. Se procedió a medir el pH final en el sobrenadante libre de células con un pHmetro.

Sensibilidad a diferentes pH en medio sólidos.

Para determinar el efecto del pH sobre el crecimiento de *P. extremaustralis* y sus mutantes derivadas se empleó un ensayo de sensibilidad utilizando discos en medio sólido similar a los utilizados para evaluar el efecto de distintos factores de estrés (Ayub et al., 2004). A partir de los cultivos de 24h se ajustó la D.O._{600nm} a 1 y se tomaron alícuotas sembrando 100 µl de cultivos sobre las placas. Las placas se prepararon con 20 ml de medio, para mantener uniformidad, de manera que siempre presenten el mismo grosor. Se dejaron secar durante 20 minutos y se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo discos de papel de filtro Whatman nº1 estériles (6 mm de diámetro), dejándolos secar 15 min. Luego se agregaron 10 µl de *buffer* regulado a diferentes pH, el rango de pH de estudio fue de 5,5; 6; 7; 7,5; 8; 9 y 10. Las placas se incubaron durante toda la noche a 28°C y se procedió a medir el diámetro del halo de inhibición del crecimiento. Los buffers a diferente pH se prepararon de la siguiente manera: pH. 5,5, se utilizó *buffer* de Acetato de sodio -acético 0,1N, pH 6 a 9,5, *buffer* fosfato 0,1 N y pH 10, *buffer* glicina-NaOH 0,2 M. Todos los *buffers* se esterilizaron por filtración midiéndose nuevamente el pH final antes de ser utilizados en cada ensayo planteado.

Cuantificación de PHA por Cromatografía gaseosa.

Se cuantificó la producción de los distintos tipos de PHA utilizando la misma metodología, explicada anteriormente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Sensibilidad al H₂O₂ en medio sólido

Para determinar la resistencia al estrés oxidativo en *P. extremaustralis* y las cepas mutantes, se empleó un ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las bacterias fueron cultivadas durante 24 h en LB en presencia de octanoato de sodio a 200 rpm y 28°C. Luego de lo cual se ajustó la D.O._{600nm} de los cultivos a 1 y se sembraron

100µl en placas de medio LB. Se procedió de igual manera que el protocolo descrito anteriormente. Luego se agregaron 5µl de H₂O₂ 30%(v/v) (Merck), se incubaron durante toda la noche a 28°C y se procedió a medir el diámetro del halo de inhibición del crecimiento.

Se trabajó con *P. extremaustralis*, sus mutantes PHB- (C6+C8), PHA-, la doble PHAB-. Además, se utilizaron en este trabajo otras *Pseudomonas* presentes en nuestro laboratorio, entre ellas *P. putida* GPP104 mutante derivada de *P. putida* KT2440 incapaz de producir PHA (Huisman y col., 1991), *P. fluorescens* Pf-5, *P. putida* KT2440 productora de PHAcM.

Sensibilidad a la radiación UVA

También se analizó la sensibilidad a la radiación UVA en distintas condiciones de crecimiento y acumulación de PHA. Las bacterias crecieron a 10 °C o 30 °C hasta la fase estacionaria en LB o LBO. Los cultivos se centrifugaron (1.200 rpm, 10 min, 20 ° C). Los *pellets* celulares se lavaron una vez y se suspendieron en solución salina (NaCl 0,1 M) a D.O._{650nm} 0,4. Las suspensiones celulares se dividieron en dos fracciones de 30 ml, que se colocaron en un vaso de precipitados de vidrio (diámetro de la superficie expuesta 5 cm) abierta al aire. Se irradiaron desde arriba con dos tubos Philips TDL 18 W/08 (más del 95% de emisión UVA a 365 nm) montados a una altura fija, con reflectores aluminio anodizado, para mejorar la tasa de fluencia en la sección a ser irradiada. La fluencia incidente se midió en la superficie de la suspensión con un Radiómetro 9811.58 Cole-Parmer (Cole-Parmer Instruments Co., Chicago, IL). Una de las fracciones se irradió desde arriba a una velocidad de fluencia de 20 W/m² a nivel de la superficie, mientras la otra fracción permaneció en la oscuridad. La tasa de fluencia empleada (20 W/m²) puede ser normalmente encontrada en el medio ambiente (Hoerter et al., 2005), y se obtuvo colocando los tubos a unos 18 cm de la superficie de la suspensión.

Se tomaron muestras de las suspensiones celulares tanto expuestas a la radiación UVA o mantenidas en la oscuridad a distintos tiempos y se sembraron en placas de LB agar. En caso de ser necesario las muestras se diluyeron con NaCl 0,1 M. Las placas se incubaron inmediatamente a 30 °C en la oscuridad para evitar reparación del DNA

inducida por la luz y se contaron las colonias después de transcurridas 24 a 48 h. La supervivencia se expresó como una fracción de la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml respecto del tiempo inicial (t_0).

El contenido de PHA se midió por cromatografía gaseosa a tiempo inicial y final.

Ensayo de Catalasa

Para determinar la actividad de catalasa total, cultivos en fase estacionaria se centrifugaron a 10.000 *g* durante 10 minutos a 4 ° C. El pellet celular se suspendió en *buffer* fosfato de sodio 50 mM en frío (pH = 7). Se midió la densidad óptica y se ajustó a una $D_{650nm} = 1$ para mantener la uniformidad del ensayo. Las células se rompieron por sonicación empleando 10 ml de cultivo durante 2 min en modo pulso al 50% de “duty cycle” y 5 de “micro tip limit” (Vibra-Cell sonicator, Sonics Materials Model VC500), en un baño de agua con hielo. Luego se centrifugó a 12.000 *g* durante 10 min a 4 °C para obtener el extracto celular. La actividad de catalasa total se evaluó siguiendo la descomposición de 10 mM H₂O₂ según Aebi (1984). Una unidad de actividad se definió como la que descompone 1 μ mol de peróxido de hidrógeno por minuto por mg de proteína. Cada muestra requiere un blanco individual de 2,5 ml de *buffer* fosfato de sodio y 500 μ l de muestra. Para la determinación de la descomposición se colocaron en una cuba de cuarzo 500 μ l de muestra con 1,5 ml de *buffer* y 1 ml de H₂O₂ 30mM (concentración final 10mM de peróxido), inmediatamente después se comenzó a medir la absorbancia. Es un ensayo sencillo y rápido, las determinaciones se hacen cada 30 segundos hasta los 3 min. El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

Para la determinación de las proteínas totales se tomó 1 ml de la muestra, se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm. El pellet se resuspendió en 1 ml de 10 mM de MgSO₄, se tomaron 200 μ l y se llevaron a 1 ml con agua. Luego se añadió a cada muestra 1 ml de Solución Reactiva* y se dejó reposar durante 10 min para luego agregar 100 μ l de

reactivo de Folin diluido en agua. Se dejó reposar 30 min y se midió la absorbancia a 625 nm. Se realizó una curva de calibración con albúmina bovina (BSA).

*Solución Reactiva: 1 ml Solución C (CuSO_4 1%) + 1 ml Solución B (Tartrato de Na_4K 2%) + 98 ml Solución A (NaOH 0,1M).

Caracterización de las cepas mutantes

Determinación de tamaño celular de *P. extremaustralis* y sus mutantes

Las determinaciones se realizaron en cultivos en fase estacionaria (24h), en *P. extremaustralis* y sus mutantes PHB-, PHA- y PHAB- tanto en LB como LBO para determinar la influencia de la producción de PHA en el tamaño celular. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 con un aumento 1000 x y filtro UV 450-480 nm. Para el análisis de las imágenes se utilizó el software Image- PROPLUS V4.5 (Cybernetics) que permitió la medición del tamaño celular a través de las fotografías tomadas. Las capturas se realizaron por triplicado para cada una de las bacterias bajo estudio, en las cuales se determinaron las dimensiones celulares (largo y ancho). Los resultados se muestran como el promedio y la desviación estándar de al menos 30 células teñidas con Azul de Nilo iluminadas con luz blanca.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para profundizar en la caracterización de la morfología celular y la observación de los gránulos de PHA de *P. extremaustralis* y sus mutantes PHB-, PHA- y PHAB- se realizaron cultivos de 24h en LBO. Se realizó también un cultivo de la cepa salvaje en LB el cual se utilizó como control de no acumulación.

El protocolo involucró la etapa de fijación realizada en el laboratorio y la etapa de inclusión en resina y cortes realizada por el servicio de microscopía electrónica Lanais, Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires. Se enjuagó el pellet del cultivo con

buffer fosfato o PBS, 0,1M, pH 7,4. Luego se trasvasó a un tubo *Eppendorf*, se centrifugó para obtener el pellet.

Se retiró el *buffer* y se cubrió con el fijador con una solución de glutaraldehído 2,5% en *buffer* fosfato 0,1M 4 h pH 7,4; a 4 °C. Se resuspendió el pellet y se fijó durante 4 h a 4 °C, sobre hielo o en heladera.

Se realizó una primera fijación con una solución de glutaraldehído 2,5% en *buffer* fosfato 0,1M 4 h pH 7,4; a 4 °C. Se realizan dos lavados con *buffer* fosfato 0,1M de 15 minutos cada uno. (Pudiendo ser el 2º realizado durante toda la noche)

Se centrifugó, se retiró el fijador y se agregó el *buffer* de lavado que se dejó 15 minutos a 4 °C. Se repitió el procedimiento, manteniéndose en la heladera hasta entregar en el servicio de microscopía electrónica.

Una vez entregado al servicio se realiza una segunda fijación, con tetróxido de Osmio al 1% en el mismo *buffer* durante 60 minutos a 4 °C.

Luego se realizan dos lavados de 15 minutos con agua bidestilada.

Se procede a la deshidratación del material en alcoholes ascendentes (50º, 70º, 96º, 100º) dos cambios de cada uno durante 15 minutos. Finalizando el proceso de deshidratación con dos cambios de acetona durante 10 minutos.

Se realiza la inclusión en resina epoxy "Durcupan" la cual polimeriza a 60°C durante 72 horas. Una vez polimerizada la resina se realizan cortes semifinos de 0,50 µm de espesor por medio de un Ultramicrotomo (Reichert Jung Ultracut E) con navaja de vidrio, los cortes se montan en portaobjetos y se tiñen con Azul de Toluidina para su observación al microscopio óptico.

Para observar las muestras al microscopio electrónico de transmisión se realizan cortes ultrafinos 70-90 nm de espesor en el mismo Ultramicrotomo utilizado anteriormente. Finalmente, los cortes se montan en grillas de cobre, se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo, (método de Reynolds).

Se observó al microscopio TEM Zeiss 109, y se tomaron fotografías digitales con cámara Gatan W10000.

Cuantificación de Exopolisacáridos totales

La cantidad de hidratos de carbono se puede estimar por el método de Antrona. Si bien este método detecta azúcares totales, es un método indirecto que permite cuantificar la cantidad de exopolisacáridos totales presentes en los distintos cultivos como equivalentes de glucosa (Quelas et al., 2006).

Se preparó una solución de H₂SO₄ al 75% entre 4 y 24h antes del ensayo para realizar la hidrólisis de los exopolisacáridos, se mantuvo en frío hasta su utilización. El día del ensayo se procedió a preparar la solución de Antrona pesando 0,5 g que fue disuelto en 5 ml etanol absoluto mezclando cuidadosamente con ayuda de agitador magnético, para luego llevar a un volumen 10 ml con etanol. Ambas soluciones se mantienen en frío.

Se empleó glucosa para realizar la curva estándar correspondiente. Para lo cual se pesaron 0,05 g de glucosa, se disolvió con agua bidestilada y se llevó a un volumen final de 500 ml, resultando en una concentración final de 100 mg de glucosa/ml. Se prepararon las diluciones seriadas en tubos de vidrio con fondo redondo siguiendo las cantidades detalladas en la Tabla 6.

Tabla 6. Dilución desde Solución Madre de Glucosa 100 mg/l para la curva de estándar.

Volumen de Agua bidestilada (ml)	Volumen de Solución Madre de Glucosa (ml)	Concentración final por tubo (mg/l)
10	0	0
8	2	20
6	4	40
4	6	60
2	8	80
0	10	100

Se tomó 1 ml de sobrenadante de cultivos líquidos aeróbicos provenientes de medio LB y LBO. Se centrifugó durante 40 minutos a 9.500 rpm a 4 °C. El sobrenadante de esta centrifugación se transfirió a un tubo vidrio y se añadieron 3 volúmenes de etanol absoluto dejándose reposar durante toda a la noche a -20 °C. El siguiente paso consistió

en una centrifugación durante 40 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se descartó, el pellet se resuspendió en una solución salina de NaCl (0,5M). A partir de estas se tomaron 500 µl de muestra, se añadió la solución de Antrona y H₂SO₄, se llevaron al baño junto con las soluciones de glucosa previamente explicadas a una temperatura de 100°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 578 nm protegiendo siempre a la preparación de la luz (<https://web.itu.edu.tr/~dulekgurgen/Carbs.pdf>). Esta metodología se realizó tanto para *P. extremaustralis* como para sus mutantes derivadas, por triplicado para realizar los análisis estadísticos correspondientes.

Rastreo y análisis de genes asociados a la síntesis de PHA en distintas especies de *Pseudomonas*

Las búsquedas de genes se realizaron a través de diferentes plataformas bioinformáticas. Para el estudio de las polimerasas *phbC*, *phaC1* y *phaC2* de *P. extremaustralis*, se realizó la búsqueda en el servidor RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) donde se encuentra depositado el genoma de la bacteria bajo estudio.

Para la búsqueda de genes PHA y su entorno en *Pseudomonas* se utilizaron la base de datos *Pseudomonas.com* (<http://pseudomonas.com/>), NCBI (National Center for Biotechnology Information) y las herramientas asociadas a estas, como BLAST para comparación de secuencias.

Proteómica de *P. extremaustralis*

Se realizó la extracción de proteínas totales para el estudio del metabolismo de *P. extremaustralis* en diferentes medios cultivos (LB, LBO, NEO) en distintas fases de crecimiento y aireación. En todos los casos los cultivos se realizaron por triplicado con la adición de octanoato de sodio que favorece la producción de los PHA (C4-C6-C8).

Se analizaron muestras de cultivos NEO en diferentes fases de crecimiento aeróbico: fase exponencial (6-8 h de cultivo) con una D.O._{600nm}=0,5-0,6, y fase estacionaria (24 h) D.O._{600nm}= 6,8, así como el estudio de la cepa nativa en LBO 24 h con una D.O.= 11.

Las condiciones de microaerobiosis se realizaron con cultivos NEO de 24 h, con una relación 1:2 volumen del cultivo/recipiente y agitación suave (50 rpm), suplementados con KNO₃ 0,08% como se empleó en trabajos anteriores con *P. extremaustralis* (Tribelli et al., 2010).

Se obtuvieron los pellets celulares por centrifugación, se lavaron 2 veces con *buffer* PBS-PMSF 1mM (inhibidor de proteasa). Posteriormente, se sonicaron en el equipo Ultrasonic Homogenizer 4710 (Chicago Illinois 60648, USA) con pulsos de 20 seg al 50 % en 12 rondas con las muestras en hielo, se tomaron alícuotas de cada muestra y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando albúmina de suero bovino como estándar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) para cada condición de cultivo. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en una unidad de electroforesis vertical (10 x 10 cm x 1 mm) de acuerdo al protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando un gel de corrida al 12% y un gel concentrador al 5% (ver anexo para composición). Para la siembra las muestras fueron calentadas 5 minutos a 100°C con el *cracking buffer*, y fueron sembradas en el gel colocando igual cantidad de proteínas en cada pocillo (well) y corridas a 25 mA.

La electroforesis finalizó cuando las muestras alcanzaron 1 cm respecto del punto de siembra para concentrar las proteínas presentes. Los geles se lavaron 3 veces con agua MiliQ filtrada durante 5 min, se cortaron los taquitos de gel con sumo cuidado y los mismos se guardaron en tubos *Eppendorf* con 5 µl de agua MiliQ. Para cada condición se utilizaron 3 réplicas de cultivos independientes, que fueron enviadas al Centro de

Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires) para su análisis.

En el CEQUIBIEM, las muestras se redujeron, se alquilaron y se sometieron a digestión en gel con tripsina. Se analizaron utilizando nanoLC-MS / MS (nanoHPLC EASY-nLC 1000 acoplado a un módulo de espectrometría de masa, Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass, (ThermoScientific).

Los datos de las diferentes condiciones se analizaron con herramientas bioinformáticas como MaxQuant (Tyanova et al., 2016a) y el software Perseus Versión 1.5.5.3. (Tyanova et al., 2016b) que permite las comparaciones entre dos condiciones, su análisis estadístico y la visualización gráfica a través de la construcción de Volcano plots. Esta representación permite identificar las proteínas diferencialmente expresadas entre condiciones. Se utilizó el siguiente criterio para seleccionar las proteínas diferencialmente expresadas: veces de cambio (*fold change*) ≥ 2 (en escala logarítmica $-1 \geq \log_2(\text{veces de cambio}) \geq 1$) en el eje de abscisas y por la prueba t de Student con $p \leq 0,05$ (mayores a 1,3 en escala logarítmica) en el eje de ordenadas. La expresión de las proteínas que cumplieron con estos criterios fue considerada estadísticamente diferente entre condiciones. Asimismo, se tomó en consideración aquellas proteínas que se detectaron sólo en una condición (presente en todas las réplicas biológicas) y no en la otra. Para estas proteínas se tomó como criterio de corte que en la condición donde está presente la proteína, el número de péptidos identificados sea al menos de 5 (Valor de PSM-peptide-spectrum match) en las tres réplicas, y en la otra condición 0 PSM. Estas proteínas son a veces denominadas proteínas "todo o nada", en este trabajo se denominaron proteínas ON / OFF (Nilsson et al., 2019).

La clasificación de las proteínas diferencialmente expresadas en categorías funcionales se realizó utilizando el programa PANTHER (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships, <http://www.pantherdb.org/>), (Mi et al., 2017) y también de manera manual en base a información obtenida de las bases de datos NCBI y Pseudomonas.com. También se utilizaron bases de datos de proteínas como UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y UNIPARQ, entre otras. El estudio de rutas metabólicas de las que forman parte las proteínas presentes en las condiciones analizadas se realizó

empleando principalmente KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <https://www.genome.jp/kegg/>) y BioCyC (Karp et al., 2019) en este último se ha incorporado recientemente el genoma completo de *P. extremaustralis* DSM17835^T (la especie tipo) como genoma representativo.

Anexo electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Solución de acrilamida 30% (para 500 ml)

Acrilamida 146 g

N, N'-Metilen-bisacrilamida4 g

. *Buffer* gel separador (4X, para 500 ml)

Tris base.....90.83 g

SDS2g

Se lleva a pH 8,8 con HCl

. *Buffer* gel concentrador (4X, para 500 ml)

Tris base..... 30.23g

SDS2g

Se lleva a pH 6,8 con HCl

. Gel separador (12%) (para 25 ml)

Buffer gel separador 4X 6.25 ml

Solución de acrilamida: bis acrilamida 8.35 ml

Persulfato de amonio 10%.....0.130 ml

TEMED..... 0.014 ml

Agua deionizada.....10.5 ml

. Gel concentrador (5%) (para 10 ml)

Buffer gel concentrador 4X 2.5 ml

. Solución de acrilamida: bis acrilamida 1.7 ml

Persulfato de amonio 10% 0.04 ml

TEMED 0.02 ml

Agua deionizada 5.8 ml

. *Buffer* de corrida (por litro)

Tris base3 g

Glicina14.4 g

SDS1 g

. *Buffer* de siembra (4X, para 10 ml)

Tris 0.25M, pH 6.85 ml

SDS0.6 g

Sacarosa4g

Azul de bromo fenol.....0.004 g

2-mercaptoetanol2ml

Tinción de geles con Coomasie blue R-250.

CAPITULO 1

Estudio de la producción de PHA en *P. extremaustralis* en distintas condiciones de cultivo y análisis del efecto del polímero sobre la resistencia a distintos factores de estrés.

OBJETIVOS PLANTEADOS

En este capítulo se trabajó con el objetivo 1 de la tesis doctoral:

1. Analizar la producción de PHA en *P. extremaustralis* en distintas condiciones de cultivo con diferencias en la relación C/N. Evaluar la relevancia de los distintos tipos de PHA en la supervivencia frente factores de estrés.

Se analizó el contenido de PHA en distintas condiciones de cultivo, y su composición monomérica. Además, se realizaron estudios que involucraron el análisis del crecimiento y de la producción de biopolímeros en diferentes cepas incluyendo mutantes deficientes en la producción de PHA. Con esas mutantes, se realizaron algunos estudios de tolerancia a estrés y finalmente se analizó la influencia del pH en la producción de PHA y el efecto del PHA en la tolerancia a acidez o alcalinidad.

Los resultados que se describen a continuación proporcionan un panorama de la influencia de PHAcc y PHAcM en algunos aspectos de la fisiología de *P. extremaustralis*.

RESULTADOS

Medición del contenido de polihidroxicanoatos por cromatografía gaseosa en *P. extremaustralis*

Para los estudios del metabolismo de los PHA, la identificación de los monómeros que componen el polímero y su cuantificación resultan fundamentales. En el caso de *P. extremaustralis* la medición es más compleja en comparación con otras bacterias dado que sintetiza ambos tipos de PHA (PHAcM y PHAcc). Durante la primera etapa de esta tesis se realizó la puesta a punto de la metodología y el protocolo para la cuantificación de los distintos PHA por cromatografía gaseosa, en un nuevo equipo en el Dpto. de Química Biológica (FCEN-UBA). Anteriormente, estas mediciones en el laboratorio se realizaban a través de un servicio, lo que implicaba seleccionar adecuadamente la muestra a medir.

Las determinaciones del contenido del polímero se realizaron en medios de cultivo con diferente relación C/N cuyas características se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación carbono/ nitrógeno de los medios de cultivo utilizados lograda mediante la modificación del contenido de octanoato de sodio y extracto de levadura.

	LB	LBO	NEO	NEOs/lev
Carbono/Nitrógeno	3,7	4,5	8	12

La mayor producción de PHAcc se observó en medio LBO (36,72 %) con respecto a los medios NEO y NEOs/lev (Fig. 1, $P < 0,05$). Al analizar estadísticamente los resultados se observó que en los medios de acumulación con mayor relación de C/N

hay un aumento significativo en la producción de PHB ($P > 0,05$), aunque la cantidad de polímero producido es inferior que en el medio LBO.

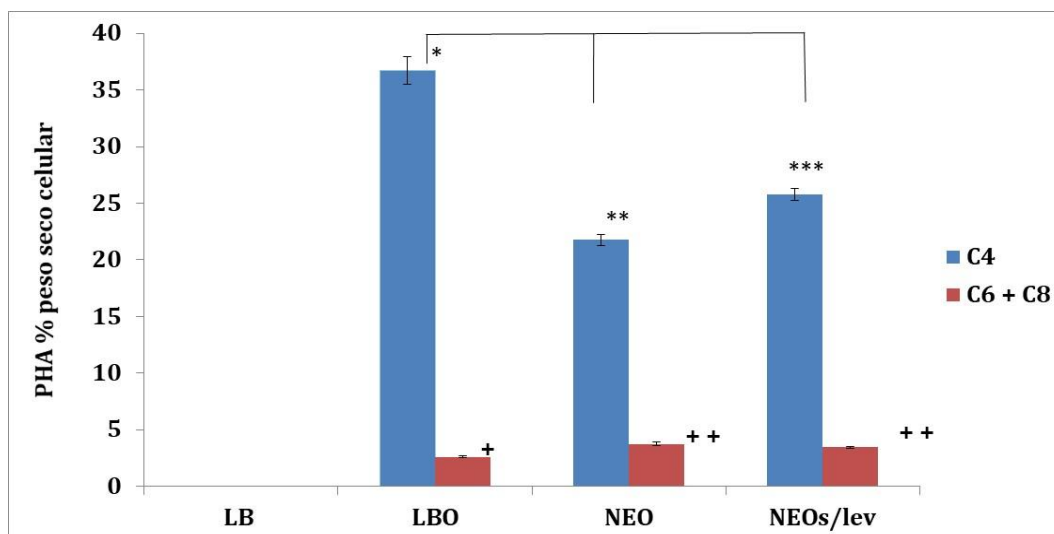


Fig. 1. Producción PHA en *P. extremaustralis* en condiciones aeróbicas en medios de cultivo con relación C/N creciente (de izquierda a derecha). Barras azules contenido de PHAcc (PHB) y barras rojas: PHAcM (C6 + C8). Los valores representan medias \pm SD de tres cultivos independientes. Distintos símbolos (+; *) significan diferencias significativas (PHAcc: a, b, c; PHAcM: d, e).

Con respecto a la producción de PHAcM, esta bacteria es capaz de producir PHA conteniendo monómeros de C6 y C8, siendo este último el mayoritario (para LBO C6= 0,95%; C8= 1,65%). Se observó que la producción de PHAcM varió entre 2,60% (LBO) y 3,76% (NEOs/lev), es decir que en este caso se incrementó a medida que aumentó la relación C/N (Fig. 1). Por otro lado, se observaron diferencias significativas al analizar LBO con respecto a los medios con alta relación de C/N ($P < 0,05$) pero no al analizar los medios con alta relación C/N entre sí ($P > 0,05$) (Fig. 1).

Los resultados obtenidos muestran que la producción de ambos tipos de polímeros en *P. extremaustralis* se ve afectada por la relación C/N del medio de cultivo. En el caso del PHB la presencia de un medio de cultivo rico en nutrientes favorece más la producción, mientras que para PHAcM la producción se incrementó en los medios más desbalanceados.

Producción de PHA en las distintas mutantes

También se analizó la producción de PHA en mutantes de *P. extremaustralis*. Se utilizaron mutantes construidas previamente en el laboratorio por la técnica de delección por PCR (Ayub et al., 2009, Catone, 2013). Una de las mutantes, denominada PHB-, no produce PHB, ya que presenta interrumpido el gen de la polimerasa (*phbC*) con un casete de resistencia kanamicina (Km) conservando únicamente la capacidad de síntesis de PHAcM. La otra mutante PHA- (Catone, 2013), es incapaz de producir PHAcM, ya que posee una delección de una región que incluye las sintasas de clase II y la depolimerasa (*phaC1ZC2*) y la inserción de un casete de resistencia a gentamicina (Gm). La mutante PHA- sólo es capaz de producir PHAcc (PHB).

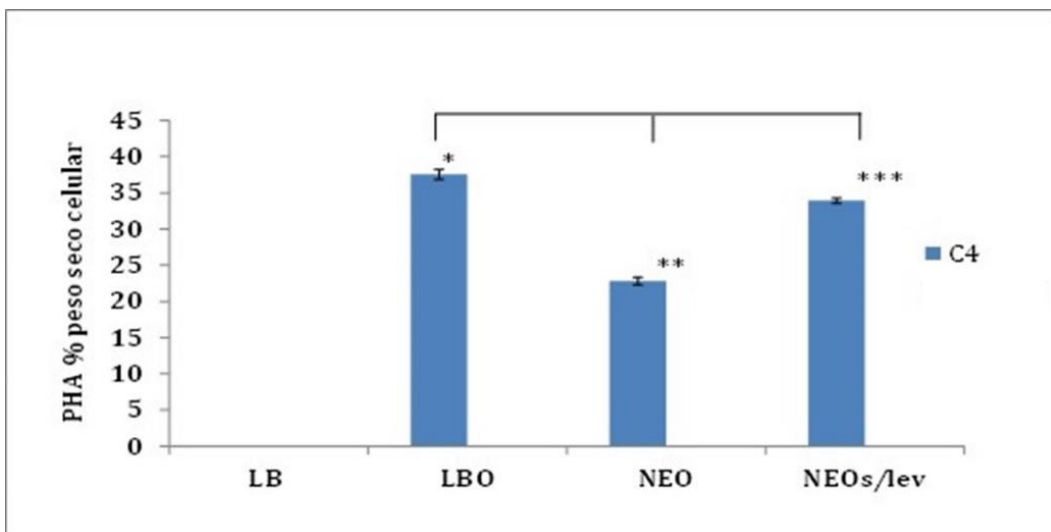


Fig. 2. Producción de PHB en la cepa mutante PHA- en condiciones aeróbicas en medios de cultivo con distintas relaciones de C/N creciente (de izquierda a derecha). Los valores representan medias \pm SD de tres cultivos independientes. Diferentes cantidades de símbolos (*) indican diferencias significativas.

En el análisis realizado para la mutante PHA- se observan diferencias significativas ($P < 0,05$) en las mediciones de los metil-ésteres correspondientes al C4 entre el

medio rico LBO y los medios de acumulación (NEO) con o sin extracto de levadura (Fig. 2). La producción de PHB mostró un patrón similar al de la cepa salvaje.

Para el caso de la mutante PHB-, los análisis estadísticos mostraron que la producción de C6 +C8 aumentó al aumentar la relación C/N (Fig.3), tal como había sido observado en la cepa salvaje, mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$). Es interesante destacar que en este caso se observó un incremento en el contenido de PHAcM con respecto a la cepa salvaje, como consecuencia de la mutación de los genes de producción de PHAcc.

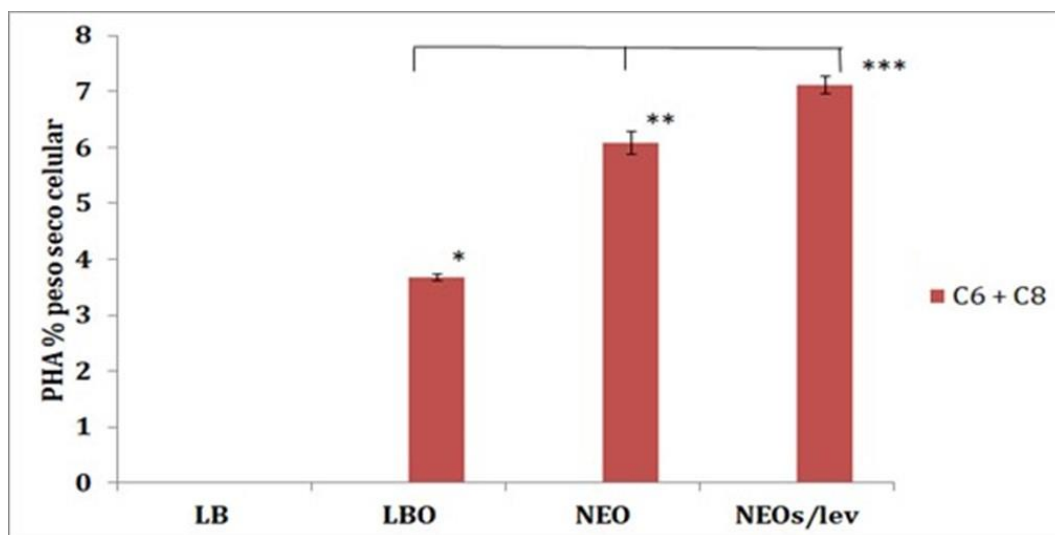


Fig.3. Producción de PHAcM en la mutante PHB- en condiciones aeróbicas en medios de cultivo con distintas relaciones de C/N creciente (de izquierda a derecha). Los valores representan medias \pm SD de tres cultivos independientes. Diferentes cantidades de símbolos (*) indican diferencias significativas.

Se observó que los medios NEO y NEOs/l resultaron adecuados para la producción de los PHAcM. En la Fig. 4 se muestra la producción de las 3 cepas en medio de cultivo NEOs/lev con la mayor relación C/N analizada.

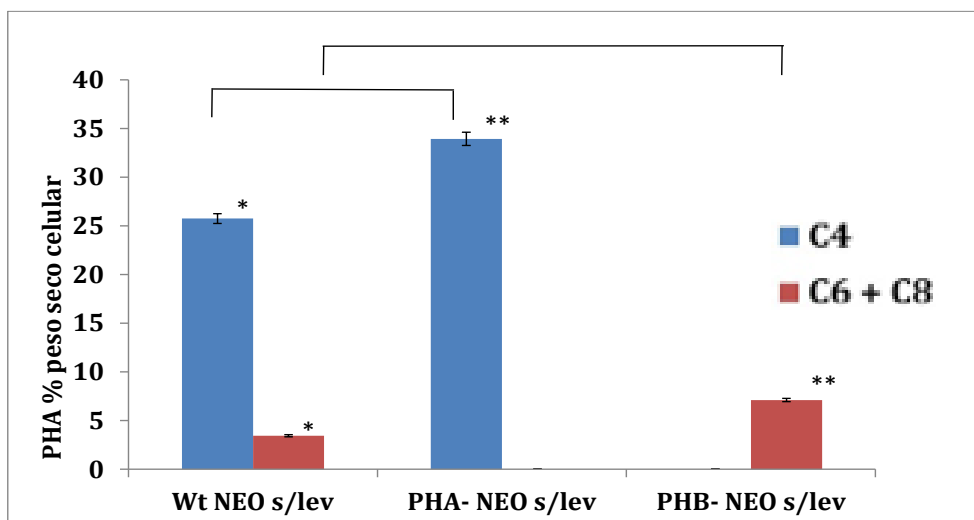


Fig. 4. Porcentaje de PHA en condiciones aeróbicas de las cepas *P. extremaustralis* y las mutantes en NEO sin extracto de levadura. Los valores representan medias \pm SD de tres cultivos independientes. Diferentes cantidades de símbolos (*) indican diferencias significativas.

La comparación de los valores de producción de PHA entre la cepa salvaje y las mutantes muestra un incremento significativo tanto en la producción de PHB como en la producción de PHAcM en las mutantes que tienen interrumpida una de las vías en comparación con la cepa salvaje ($P < 0.05$, Fig. 4), lo que sugiere que, al disminuir los requerimientos de C de una de las vías, el C disponible puede redirigirse hacia la producción del otro tipo de polímero.

Análisis de la composición monomérica por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa

La verificación de la composición monomérica se realizó por espectrometría de masas utilizando el servicio del Dpto. de Química Orgánica (FCEN-UBA). Se llevaron a cabo el análisis cromatográfico y la identificación de métil-ésteres de 3-

hidroxibutirato (3HC4), 3-hidroxihexanoato (3HC6) y 3-hidroxiocetanoato (3HC8) por cromatografía gaseosa acoplada con espectrometría de masa en las diferentes cepas.

En la Fig.5 se observa el perfil cromatográfico del polímero producido por *P. extremaustralis* en medio de acumulación (NEO) en condiciones aeróbicas y los tiempos de retención correspondientes a los diferentes monómeros.

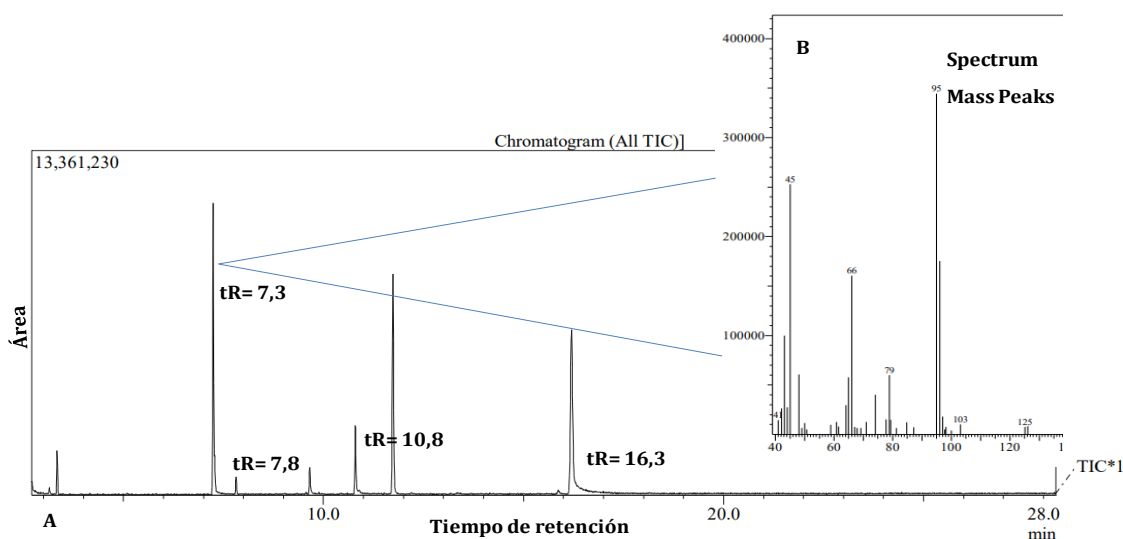


Fig. 5. A-Espectro cromatográfico de *P. extremaustralis* en medio NEO desbalanceado en C/N, mostrando tiempos de retención para los diferentes compuestos. tr= 7,3 min para el 3HC4, tr=10,8 para el 3HC6 y un tr= 16,3 para el 3HC8. B- Amplificación del espectro de masa para el compuesto 3HC4.

En las condiciones cromatográficas utilizadas, además de los métil ésteres de los tres analitos de interés (3HC4, 3HC6 y 3HC8) fue posible identificar otros compuestos. Entre ellos, crotonato trans-2-butenoico ($C_4H_6O_2$) de metilo y el 3HC4 metiléter los que son derivados de la presencia de 3HC4 en la muestra original (Tabla 2). El crotonato de metilo se obtiene por deshidratación del hidroxilo en C3, mientras que el éter mencionado es el producto de metilación del hidroxilo libre, por lo que para una cuantificación adecuada se deben tener en cuenta a la hora de los cálculos.

Otro producto interesante identificado fue el levulinato de metilo que fue registrado en las tres cepas analizadas con un tiempo de retención de 9,6 min.

Además, se observan algunos compuestos que tienen que ver con el proceso de metanólisis, de los que se obtienen picos definidos que pudieron ser identificados sin inconvenientes, como por ejemplo el sulfato de metilo y el estándar interno benzoato de metilo (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis por GC-Masa de cultivos de *P. extremaustralis* y sus mutantes. Se muestran tiempos de retención (tR) y compuestos identificados. Todas las muestras se prepararon usando ácido benzoico como estándar interno y fueron sometidas a metanólisis.

Compuesto	tR (min)	1 Acido benzoico (std. int.)	2 PHA ¹ std. (5mg)	3 PHB ² std (5mg)	4 Wt	5 PHA-	6 PHB-
2-Metil-2-metoxibutano	3,4	-	+	+	-	+	+
Crotonato de metilo	5,1	-	-	+	-	-	-
3HC4	7,26	-	-	+	+	+	Trazas
Sulfato de metilo	7,3	-	+	-	+	+	+
3HC4 metiléter	7,8	-	-	+	+	+	-
Levulinato de metilo	9,6	-	-	-	+	+	+
3HC6	10,8	-	+	-	+	-	+
Benzoato de metilo	11,7	+	+	+	+	+	+
3HC8	16,3	-	+	-	+	-	+

Abreviaturas: std. int. Estándar interno; ¹std: estándar PHA purificado obtenido de *P. putida* KT2440; ²PHB: estándar comercial de 3HC4 (Sigma)

Estudios fisiológicos y de resistencia a estrés en *P. extremaustralis*

Una aproximación de utilidad para analizar la influencia del PHA en la fisiología bacteriana y la resistencia a estrés consiste en el análisis de mutantes. En esta parte del trabajo se describen los resultados de diferentes estudios realizados con *P. extremaustralis* y sus mutantes deficientes en la producción de PHA. Para contar con todas las combinaciones posibles se construyó una doble mutante incapaz de producir ambos tipos de PHA que se describe a continuación. También fue necesaria la construcción de una cepa que complemente la mutación de la polimerasa de cadena corta (*phbC*).

Construcción de una doble mutante incapaz de producir PHA en *P. extremaustralis*

La cepa doble mutante, incapaz de producir ambos tipos de PHAcc y PHAcm, se construyó para este trabajo, partiendo de la mutante PHA- e introduciendo el plásmido pPHU281 conteniendo el gen *phbC* de *P. extremaustralis* interrumpido por el gen de resistencia a Km. Los clones candidatos fueron obtenidos mediante selección en medio (NEO) conteniendo los antibióticos Km y Gm y fueron verificados y caracterizados utilizando diferentes técnicas. En principio se realizó la tinción con Azul de Nilo y la observación al microscopio óptico para comprobar la ausencia de PHA en cultivos realizados en condiciones de acumulación. Se observaron varios clones que no presentaban gránulos. Se realizó la verificación por PCR de esos clones usando *primers* capaces de amplificar el gen *phbC* mutado conteniendo además la interrupción con el casete de Km. Los productos de PCR obtenidos se observan en (Fig. 6), junto con los controles de la cepa salvaje *P. extremaustralis* con el gen salvaje (*phbC*) y la mutante simple PHB-. Se obtuvieron dos tamaños de fragmentos, uno de 2.100pb, que corresponden al gen *phbC* completo de la cepa salvaje y otro de 2.736pb para la doble mutante.

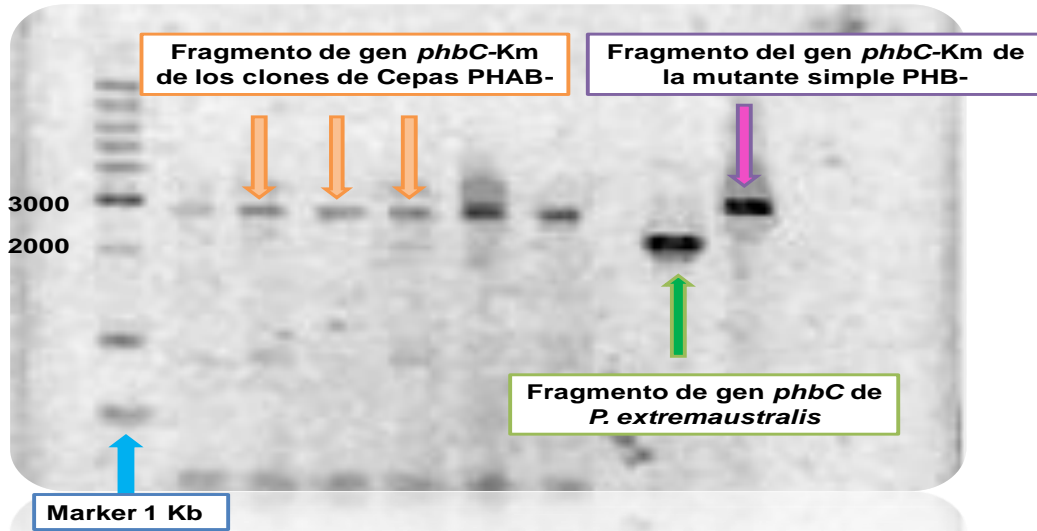


Fig. 6. Fragmentos de PCR correspondientes a la amplificación del gen *phbC* de *P. extremaustralis* (2100pb) y la construcción de *phbC-Km* (2736pb) presente tanto en la mutante doble y simple. Marcador de peso molecular (Marker).

También se realizó un análisis de restricción. Se analizó la secuencia de la construcción en el servidor *NEB cutter* en busca de enzimas de restricción para los fragmentos de *phbC* y *phbC::Km*. El análisis de restricción se realizó con los fragmentos de PCR (Fig. 7).

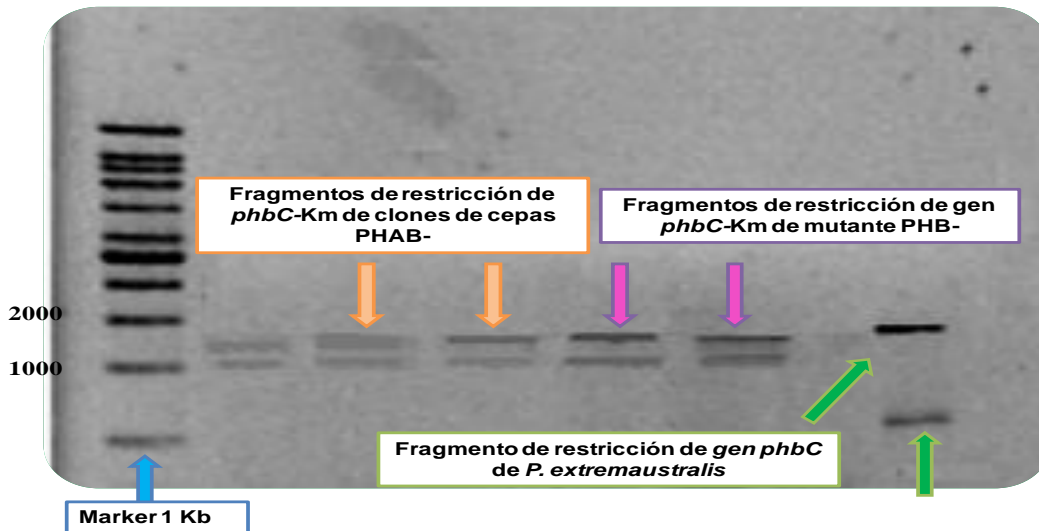


Fig. 7. Fragmentos de PCR obtenidos durante el análisis de restricción. Primeros tres carriles de izquierda a derecha corresponden a fragmentos de PCR de *phbC::Km* provenientes de PHAB-, dos carriles siguientes a fragmentos de la mutante PHB- (control), el último carril al gen de *phbC* proveniente de la cepa salvaje (control).

El gen nativo de la polimerasa (*phbC*) presentó dos bandas características de 1.547pb y de 574pb, mientras que para el gen interrumpido *phbC::Km* tanto en la mutante simple como en la doble fue posible visualizar dos bandas características de 1.418pb y 1.317pb (Fig. 7).

Continuando la caracterización de la doble mutante se verificó la ausencia del polímero por cromatografía gaseosa usando como control positivo la cepa salvaje de *P. extremaustralis*. En concordancia con lo esperado en base a los otros análisis no se observó producción de PHA en los clones analizados por cromatografía gaseosa (Fig. 8).

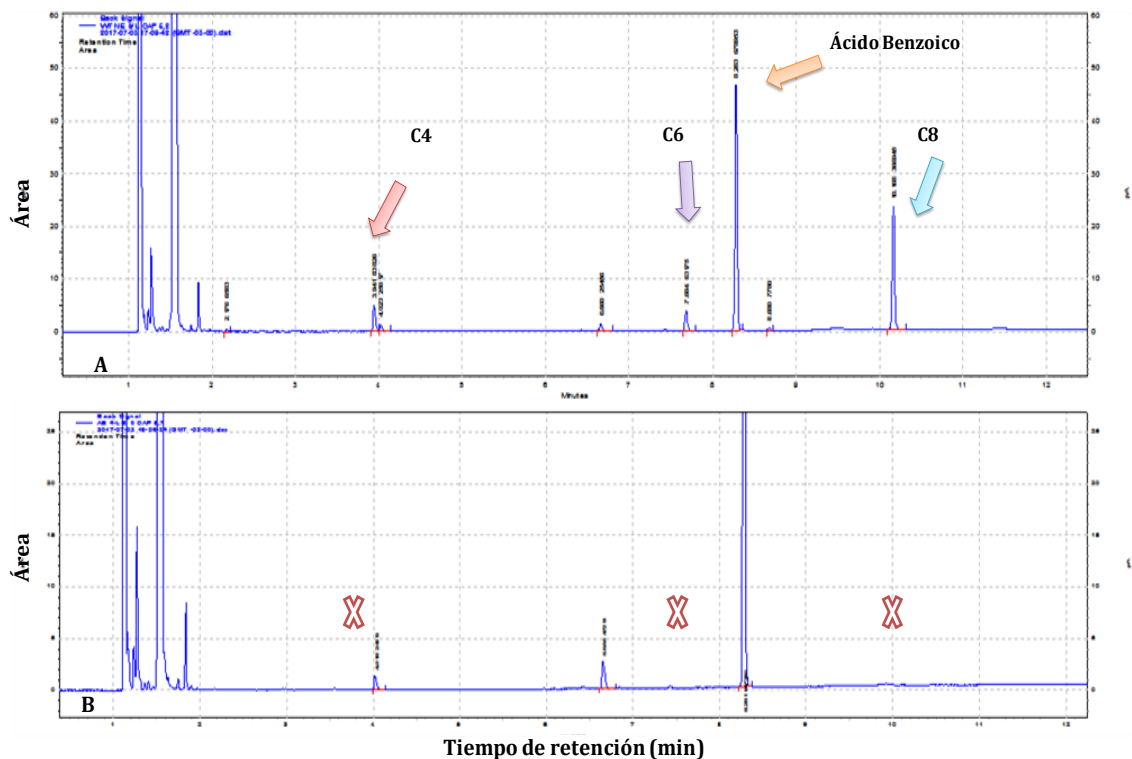


Fig. 8. Perfil cromatográfico. **A-***P. extremaustralis* productora de PHA (C4- C6-C8). **B-**Doble mutante cepa PHAB- incapaz de sintetizar PHA, en medio NEO a 200 rpm, 28°C.

Los tiempos de retención (tR) característicos de los metil-ésteres de los distintos monómeros son 3,941min para C4, un tR= 7,684 min para C6 y un tR= 10,168 min en el caso de C8 fueron observados en la cepa salvaje. El perfil cromatográfico de la cepa doble mutante no mostró la presencia de picos característicos de los diferentes monómeros (Fig. 8 A y B).

Otra metodología para verificar la cepa doble mutante fue la secuenciación de un fragmento de PCR de uno de los clones seleccionados en base a los resultados anteriores. Se emplearon *primers* externos capaces de amplificar parte de la secuencia de la construcción *phbC::Km*. Para ello se utilizaron dos juegos de *primers*, uno de ellos capaz de amplificar la secuencia de Km, previamente diseñado en el laboratorio, y el otro juego diseñado para esta tesis, descritos en materiales y métodos.



```

CGGAATCCCCAGACCCGATTACCCAAGGATTTTTGCCATTCTTTAGGGAAACTGCCCT
CCGGGGGAGTTTTTTCCCTTCCATTAACAGAAAACGCTTTTTTCCAAAATTTGGGTATT
GGATAATCCCTGAATAGGAATAAATTGCCAGTTTTTCATTTGGATGCTCGAATGAGTTTTTT
TTAATCCGAAATTGGGTTAAATTGGGTTGTAACACTGGGCAGAGCCTTTACGGTGAAC
TGACGGGAACGGGGGCTTTTGTGAAAAAATCGAAATTTTTGGTGAGTTGAAGGGTT
CAGATTAAGGATTTTTCCGAAAAGCAGACCGTTTCGTGGCAAAGCAAAGTTTAAAT
TACCAAATGGTTCACCTTAAAAAAGTTTTATTAACCGTGAATTCCTCACTTTTTGGGTG
GATGATGGGGGATTTAGGCCTGGTTTGAGTTAGCAAACCCTTTTTTTCAGGGGGGGACC
TTAGGGCCCCCCCCCTGCAGGTCGACGGATTCTTTTTGGCACACCTTCTCCCTGCTG
CGGCCAACGAGCTGTGGTGGAACTACAACGTCGACAAGTACCTCAAGGGACAGAAAC
CACGCGCCCTAGATCTGCTGTTCTGGAACAACGACAGTACCAACCTACCTGGCCCCATGTA
CTGCTGGTATTTGCGCCACACCTACCTGCAGAACGACCTCAAGTCGGGCGAGCTGGAGCT
GTGCGGGGTCAAGCTGGATCTGCGCTCCATAGAGGGCGCCAGCCTACCTCCTCGGAACCA
CGATGACCACATAGTCCCATGGCGCAGTGCCTATGCCAGCACGGCTTTCTTGGGGGATC
GAAACGCTTCGTCCTCGGATCTTCTGGCCACATCGCCGGAGTGATTAACCCACCAGCAAG
CAACAAACGCCATTACTGGGTAAACGAGCACATCACGCCGATTGCTGACGACGGGCTAC
AAAGCGCTCAACAACACGCAGGTAGTTGGTGGGTCGATTGGTTCGCCGGGCTGGCCGG
GCATGCCGGCGAGCTCCGGCCCGCCATCACGCGGATGGGCAATGCCGAATACCCTCCCCT
AGAACAAGCGCTGGGCGCTACGGAGCATGCCGCCCT

```

Fig. 9. A. Esquema de la región *phbC::Km*. B. Fragmento secuenciado de la construcción de *phbC::Km* perteneciente a la doble mutante PHAB-, incapaz de sintetizar PHAs correspondiente a la combinación de primers que se muestran en color verde. La secuencia en color naranja corresponde al gen que codifica la resistencia a Km y en color violeta parte del gen *phbC*.

En base al análisis realizado con el programa BLAST se puede observar la secuencia del fragmento que muestra identidad con el casete de Km y con el gen *phbC* (Fig. 9).

En base a los análisis realizados por distintos métodos, se seleccionó un clon con el que se continuó trabajando, denominado mutante PHAB- de *P. extremaustralis*. Estas verificaciones fueron necesarias dado que por tratarse de una cepa obtenida de un ambiente natural resulta más difícil de manipular genéticamente en comparación con otras cepas de *Pseudomonas* tradicionalmente usadas en los laboratorios.

Complementación de la deficiencia en la producción de PHB en la cepa mutante PHB-

Se realizó la complementación de la cepa mutante PHB-, utilizando algunas construcciones iniciadas en el laboratorio (Catone, resultados no publicados) que contenían el gen *phbC* clonado en el plásmido pBBR1MCS-3 (Fig. 10A). Este plásmido fue introducido en la mutante PHB-, como se describió en materiales y métodos. La presencia del plásmido con el gen *phbC* de *P. extremaustralis*, denominado pMCS3Cbsec, se verificó mediante la extracción del mismo y análisis por electroforesis. El tamaño del plásmido obtenido fue de 6935pb, correspondiente al plásmido más la secuencia del gen *phbC* nativo.

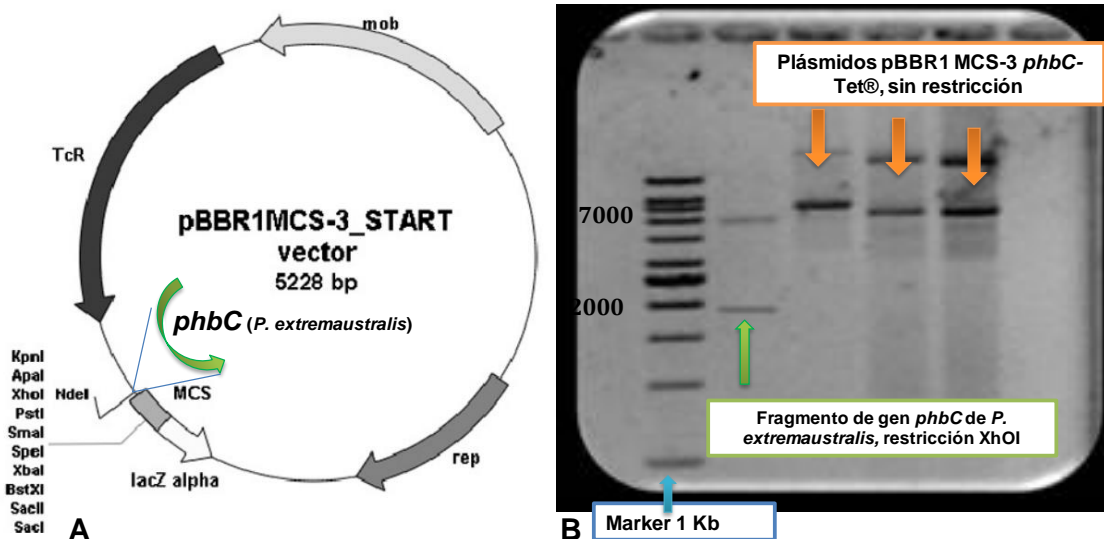


Fig. 10. A- Mapa del vector de clonado pBBR1 MCS-3, donde se insertó gen nativo de *phbC* de *P. extremaustralis*. B- Ensayo de restricción, en el primer carril (de izquierda a derecha) marcador de peso molecular, producto de restricción con XhoI del plásmido pBBR1 MCS-3 *phbC*-Tet y plásmido entero.

Además, se realizó un análisis de restricción enzimática con XhoI capaz de liberar el fragmento conteniendo el gen *phbC*. (Fig. 10B). El plásmido con la construcción fue enviado para su secuenciación al servicio de Macrogen y la secuencia se analizó

utilizando el programa BLAST. La secuencia obtenida mostró una similitud de 99,9 % con la sintasa de *phbC* (Accession: AM262984.2) de *P. extremaustralis* 14-3b y del 100% con la cepa tipo DSM17835 de esta bacteria.

Curvas de crecimiento de *P. extremaustralis* y sus mutantes en cultivos con distinta relación C/N

Antes de realizar los ensayos de estrés se analizó el crecimiento de las distintas mutantes en distintos medios de cultivo (LB, LBO, NEO y NEOs/lev) en comparación con la cepa salvaje.

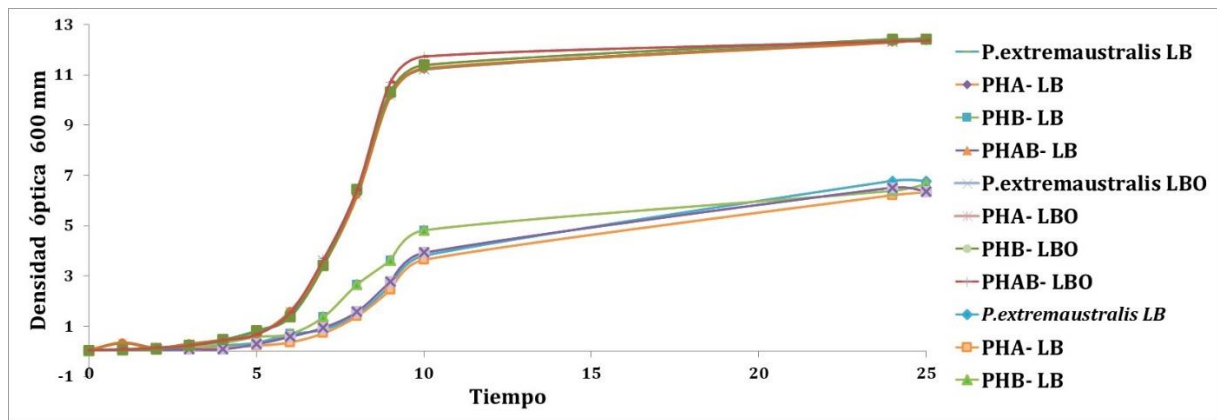


Fig.11 Crecimiento de *P. extremaustralis* y sus mutantes PHA-, PHB- y PHAB-. En medio LB y LBO a 28°C y 200 rpm durante 24h. Los valores representan media \pm SD de 3 cultivos independientes.

Si bien las curvas obtenidas tanto para los medios LB y LBO presentaron diferencias en el desarrollo luego de las 24 h, no se observaron diferencias entre las cepas dentro de un mismo medio. En medio LBO el desarrollo de las mismas llegó a valores aproximados de 12,3-12,6 luego de 24h de cultivo, mientras que en medio LB el valor promedio de crecimiento al que llegaron las cepas estuvo alrededor de 6,7-6,4 (Fig. 11).

Este mismo análisis se realizó para los medios con alta relación C/N. En la Fig. 12 se representan las curvas de crecimiento en medio de acumulación NEO y NEO sin extracto de levadura (NEO s/lev).

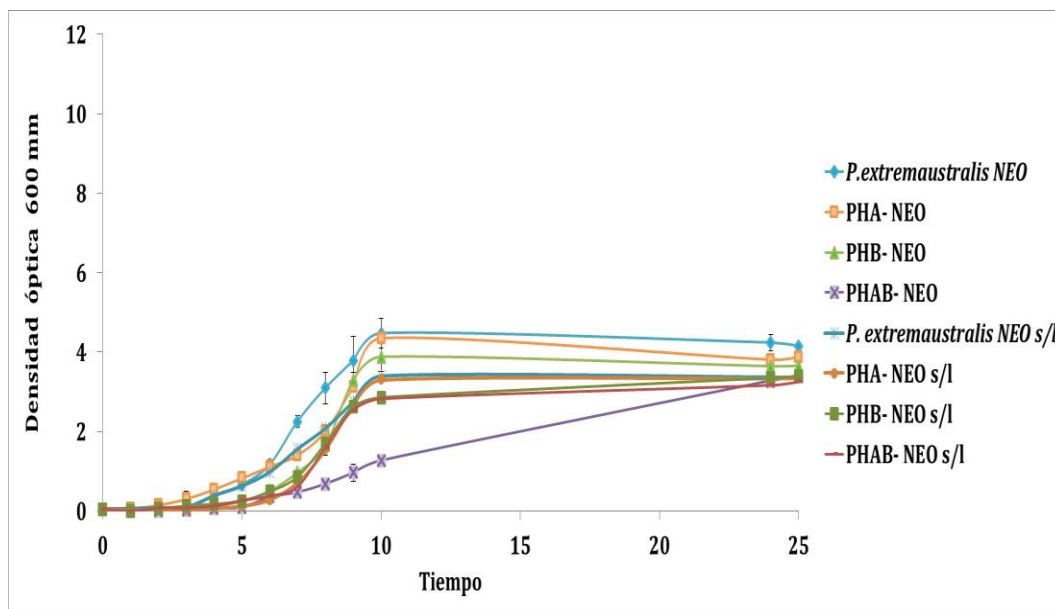


Fig. 12. Crecimiento de *P. extremaustralis* y sus mutantes PHA-, PHB- y PHAB-. En medio NEO y en NEOs/l a 28°C y 200 rpm. Los valores representan media \pm SD de 3 cultivos independientes.

Las distintas cepas mostraron valores de crecimiento menores en comparación con los medios con baja relación C/N (LB – LBO). La doble mutante PHAB- mostró un retardo en el crecimiento en las primeras horas de cultivo con respecto a las otras cepas, sin embargo, alcanzó la misma DO al tiempo final (24h). La mutante PHA- también mostró un retardo menos marcado, llegando también a valores similares al tiempo final (Fig. 12).

El análisis de crecimiento en distintos medios de cultivos mostró que todas las cepas presentaron muy buen desarrollo en medio LBO, por lo que este se seleccionó para los análisis de resistencia a estrés que se muestran posteriormente en este capítulo.

También a partir de estos ensayos de crecimiento fue posible detectar que en medio LBO se observó que la cepa mutante PHAB- desarrolló un crecimiento en forma de

anillo (biopelícula o biofilm) alrededor del Erlenmeyer que fue muy marcado en comparación con la cepa salvaje (Fig. 13).



Fig.13. Cultivos aeróbicos de *P. extremaustralis* y su mutante PHAB- en medio LBO a 200 rpm y 28°C.

Este resultado, sugiere que parte del carbono que no se utiliza para la síntesis de PHA podría ser derivado a la producción de otros compuestos carbonados como los exopolisacáridos (EPS). Por lo cual se realizaron ensayos de cuantificación de EPS.

Cuantificación de la producción de exopolisacáridos (EPS)

Se realizó la determinación del contenido de EPS totales, utilizando el reactivo de Antrona, en cultivos de las diferentes cepas en medio LBO. Si bien este método detecta azúcares totales, los EPS se calcularon como equivalentes de glucosa (Quelas et al., 2006).

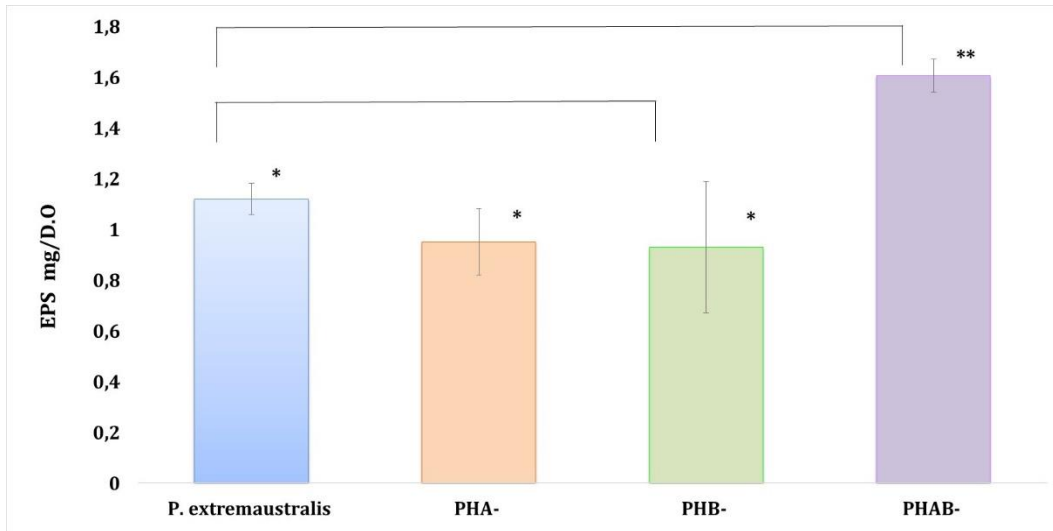


Fig.14. Medición de EPS en cultivos aeróbicos de *P. extremaustralis* y sus mutantes en cultivos aeróbicos en medio LBO a 28°C. Diferentes cantidades de símbolos (*) indican diferencias significativas.

Las mediciones se analizaron estadísticamente utilizando la prueba de test de Student. La cepa doble mutante mostró valores significativamente mayores de producción de EPS en comparación con el resto de las cepas analizadas ($P < 0.05$, Fig. 14). La mayor producción de EPS en esta cepa explicaría la mayor formación de biofilms y adherencia verificada por el anillo observado en el Erlenmeyer, lo que constituye una primera evidencia de que el exceso de carbono podría ser direccionado hacia distintos polímeros: PHA en la cepa salvaje y EPS en la doble mutante. La incapacidad de sintetizar PHA incrementa la síntesis de EPS en la doble mutante.

Comparación del tamaño celular en condiciones de acumulación y no acumulación

Las dimensiones de las células de *P. extremaustralis* cultivada en LB y LBO se determinaron a partir de imágenes obtenidas por microscopía óptica y analizadas con el programa ImageJ (Tabla 3).

El análisis reveló que en LBO, las dimensiones de *P. extremaustralis* fueron en promedio $1,85 \pm 0,087 \mu\text{m}$ de largo y $0,83 \pm 0,083 \mu\text{m}$ ancho; mientras en condiciones de no acumulación (LB) las células mostraron una ligera pero significativa disminución siendo $1,73 \pm 0,084 \mu\text{m}$ de largo y $0,66 \pm 0,075 \mu\text{m}$ de ancho (Student's *t* test, $P < 0,05$). Las mutantes PHB- y PHA- mostraron valores intermedios, algo inferiores al de la cepa salvaje (Tabla 3) en LBO, mientras que la doble mutante PHAB- fue la que presentó menor valor siendo similar al de la cepa salvaje en LB (sin acumulación). La complementación de la mutante PHB- restituyó el tamaño observado en la cepa salvaje.

Tabla 3. Longitud y ancho (μm) de *P. extremaustralis* y sus mutantes (n=30).

Medición en LBO con gránulos		
Cepas	Longitud (μm)	Ancho (μm)
<i>P. extremaustralis</i>	$1,8493 \pm 0,08$	$0,8298 \pm 0,08$
PHA-	$1,7974 \pm 0,09$	$0,7810 \pm 0,09$
PHB-	$1,7619 \pm 0,07$	$0,6620 \pm 0,07$
PHAB-	$1,7064 \pm 0,06$	$0,6456 \pm 0,07$
PHB-Comp	$1,8381 \pm 0,09$	$0,8006 \pm 0,09$
Mediciones en LB sin gránulos		
	Longitud (μm)	Ancho (μm)
<i>P. extremaustralis</i>	$1,7280 \pm 0,08$	$0,6573 \pm 0,07$

También se realizaron análisis de las células y observación de los gránulos del polímero por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se realizaron cortes de entre 70-90 nm de espesor que se observaron al microscopio.

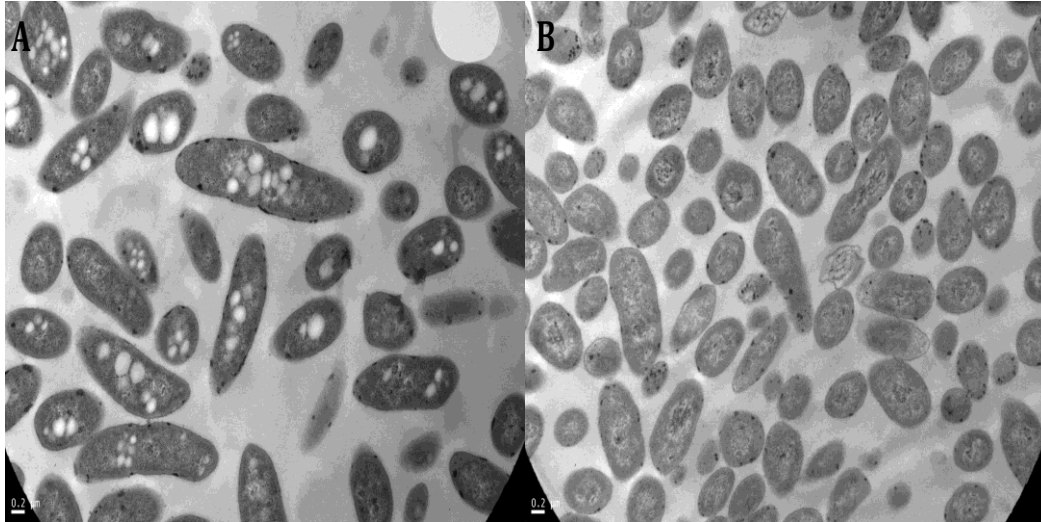


Fig.15. Imágenes obtenidas con microscopio electrónico de transmisión. A-*P. extremaustralis* B- Doble mutante PHAB- incapaz de producir polímero. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo (método de Reynolds).

Las células de la cepa salvaje de *P. extremaustralis* en medio LBO presentaron alrededor de 4-10 gránulos de PHAs en su interior que variaron también en tamaño (Fig.14.A), mientras los gránulos de PHA estuvieron ausentes en la doble mutante PHAB- (Fig.14.B).

Ensayos de estrés

Los PHA cumplen un rol en la supervivencia y en la resistencia a distintos tipos de estrés. En esta parte del trabajo se analizó la influencia de los distintos tipos de PHA en resistencia a estrés oxidativo y a la radiación ultravioleta (UVA).

Resistencia a estrés oxidativo en discos con peróxido de hidrógeno

Para determinar la resistencia al estrés oxidativo en *P. extremaustralis* y las cepas mutantes (PHB-, PHA- y PHAB-), se empleó un ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en discos, midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento.

En la Fig. 16 se observa que todas las cepas mostraron similar sensibilidad al H₂O₂ al desarrollarse en medio LB (condiciones de no acumulación de PHA).

En medio LBO la cepa salvaje fue más resistente al estrés en presencia de PHA, comparado al LB (p<0,05).

Al analizar las mutantes en medio LBO se observan que presenta una mayor sensibilidad que la salvaje, el mayor halo de inhibición se observó en la doble mutante PHAB-. La cepa complementada, fue capaz de revertir el fenotipo de sensibilidad, es decir no mostró diferencias significativas al compararla con *P. extremaustralis* salvaje.

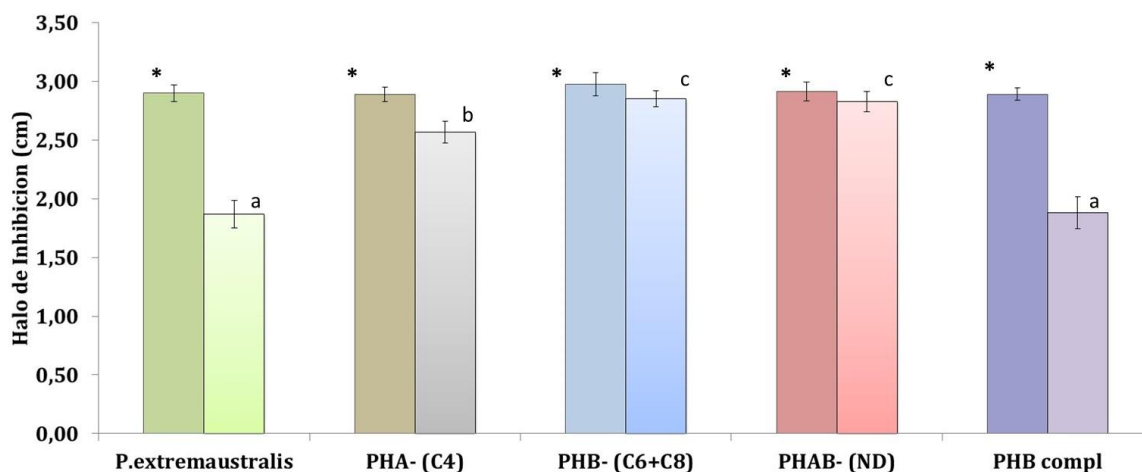


Fig.16. Halos de inhibición producidos por H₂O₂ en *P. extremaustralis* y sus mutantes en medio LB (barras de color fuerte) y LBO (barras de color esfumado). Diferentes letras o símbolos (*) indican diferencias significativas.

También con fines comparativos se realizó el mismo ensayo y se analizó la resistencia al H₂O₂ en otras especies de *Pseudomonas* (Fig. 17): *P. protegens* Pf-5, *P. putida* KT2440 y *P. putida* GPp104, una mutante incapaz de producir PHA (Huisman y col., 1991).

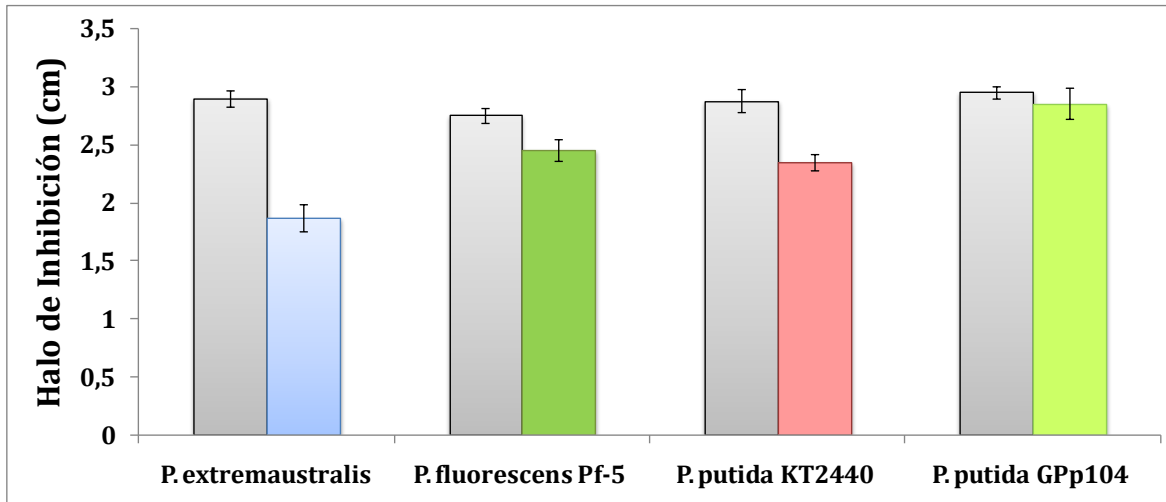


Fig.17. Comparación de halos de inhibición por H₂O₂ en cepas del género *Pseudomonas*. Medio LB (barras grises), medio LBO (barras de colores). Diferentes letras o símbolos (*) indican diferencias significativas.

P. putida KT2440 una productora natural de PHAcM y *P. protegens* Pf-5 mostraron mayor sensibilidad en comparación con *P. extremaustralis* (Fig. 17), mientras que la mutante *P. putida* GPp104 presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto de todas las *Pseudomonas* bajo estudio, con el mayor halo de inhibición (Fig. 17), siendo la cepa con mayor sensibilidad al estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno.

Estos resultados indican que la acumulación de ambos tipos de PHA está involucrada en la resistencia frente al peróxido de hidrógeno.

Resistencia a irradiación ultravioleta A (UVA)

La radiación ultravioleta constituye un factor de estrés que produce daños en macromoléculas blanco, como DNA, RNA, proteínas y lípidos, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Koháryová and Kollárová 2008; Tharmalingam et al. 2017).

Para determinar si los PHA protegen contra el estrés provocado por la radiación ultravioleta, se analizó el efecto de radiación ultravioleta A (UVA,315-400 nm) en cultivos de *P. extremaustralis* y sus mutantes. Luego de la exposición a UVA, se analizó la supervivencia por recuento de colonias en placa (UFC/ml) a distintos tiempos en medio LB y LBO (Fig. 18).

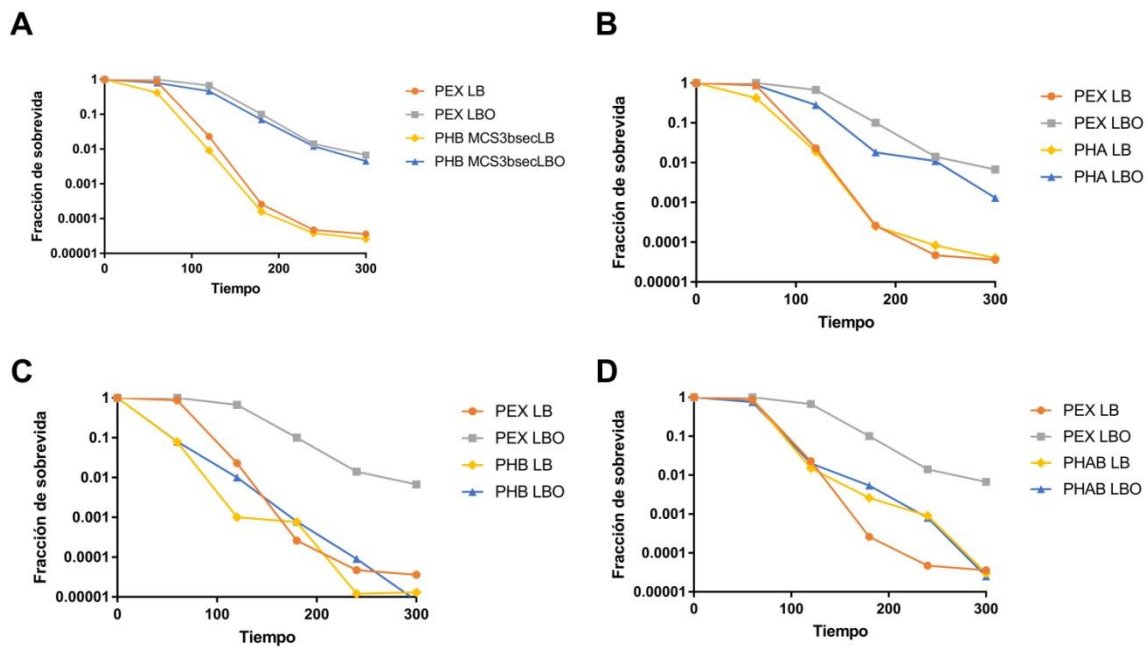


Fig. 18. Sobrevivencia en función del tiempo de *P. extremaustralis* y sus mutantes en medio LB y LBO luego de exposición a UV. **A-** *P. extremaustralis* y mutante PHB- complementada. **B-** *P. extremaustralis* y mutante PHA-. **C-** *P. extremaustralis* y mutante PHB-. **D.** *P. extremaustralis* y mutante PHAB-.

Como puede observarse en la Fig. 18 todas las cepas exhibieron una alta sensibilidad a la radiación cuando son cultivadas en medios LB, sin mostrar diferencias significativas entre ellas luego de transcurridos los 300 minutos de exposición a UVA ($P > 0.05$).

Cuando las bacterias fueron cultivadas en LBO se observó un incremento en la viabilidad tanto en la cepa nativa como en las mutantes PHB- y PHA- ($P < 0,05$). La mayor supervivencia se observó en la cepa salvaje. La cepa PHAB- incapaz de

producir ambos polímeros, bajo iguales condiciones, mostró niveles de supervivencia mucho más bajos respecto a la cepa salvaje (Fig. 18).

También se realizaron ensayos con la cepa PHB- complementada con el plásmido pMCS3Cbsec que contiene el gen *phbC*. La complementación fue capaz de restaurar el fenotipo salvaje, la supervivencia no mostró diferencias significativas ($P>0.05$) en comparación con *P. extremaustralis*.

La comparación de la supervivencia de la cepa salvaje y las mutantes mostró que el fenotipo de mayor sensibilidad a los rayos UVA se debe a la falta de PHB (C4).

Determinación del contenido de PHA frente a la exposición a UVA

Los ensayos de supervivencia se realizaron a 30°C dado que *P. extremaustralis* crece adecuadamente como organismo mesófilo y también es capaz de crecer en frío (Ayub y col, 2009). Las bajas temperaturas causan daños celulares incluyendo la producción de ROS asociadas al daño de biomoléculas (Chattopadhyay et al. 2011). Por este motivo resulta interesante analizar el contenido de PHA a distintas temperaturas luego de la exposición a UVA.

Se realizó el análisis de la producción de PHA en cultivos realizados a 10°C y 30°C al inicio y al final de las irradiaciones (Tabla 4).

Tabla 4: Producción de distintos tipos de PHA en *P. extremaustralis* en medio LBO antes y después de ser irradiada en cultivos a 30°C y 10°C.

Temp.	PHB (C4) %			PHA (C6+C8) %		
	Inicial (t_0)	UVA (t_{300})	Oscuro(t_{300})	Inicial(t_0)	UVA(t_{300})	Oscuro(t_{300})
30°C	47,32±9,03 ^a	38,5±2,49 ^a	42,89±9,21 ^a	3,75±1,49 ^b	3,39±0,58 ^b	3,29±1,54 ^b
10°C	3,18±1,13 ^c	ND	3,03±0,80 ^c	1,83±0,34 ^d	2,50±1,89 ^d	2,71±1,83 ^d

Temp: temperatura; **ND**-no detectado; **a**-no hay diferencias significativas en la producción de PHB; **b**-no hay diferencia significativa en PHAc_m en la producción a 30°C ($P>0.05$); **c**- no hay diferencia significativa en la producción de PHB; **d**-no hay diferencia significativa en PHA cm en la producción a 10°C ($P>0.05$).

Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la cantidad de PHA (PHB y PHAcM) luego de la exposición a los rayos UVA a 30°C. Cuando las bacterias se desarrollaron en frío (10°C), se observó una disminución significativa en el contenido de PHB luego de la exposición a UVA (t300), esto no se observó para los PHAcM.

La presencia de PHB el cual es sintetizado en mayor cantidad, posibilita afrontar el daño ocasionado por la radiación UVA y tener mayor sobrevivencia.

Los resultados también indican que a 10°C el estrés derivado de la exposición a la radiación UVA y la baja temperatura generó una degradación significativa del contenido del polímero, en comparación a lo observado a 30°C.

Indicadores de estrés oxidativo

Dado que la radiación UVA genera estrés oxidativo y en *P. aeruginosa* la principal catalasa, KatA, es esencial para la respuesta frente a dosis letales de UVA (Costa et al. 2010; Pezzoni et al. 2014), se determinó la actividad catalasa en *P. extremaustralis* y sus mutantes. Las catalasas son enzimas capaces de descomponer el H₂O₂ una de las especies reactivas de O₂ (ROS) implicadas en los efectos perjudiciales producidos por la radiación UVA.

La determinación de la actividad catalasa se realizó en cultivos de 24 h en LB y LBO. La actividad de catalasa se calculó en el sobrenadante siguiendo la descomposición de H₂O₂ a 240 nm de acuerdo al protocolo de (Aebi, 1984), explicado detalladamente en materiales y métodos.

Tabla 5. Medición de actividad de catalasas en medio LB y LBO en *P. extremaustralis* y sus mutantes. Los valores de actividad reflejan el promedio y desvío estándar de tres mediciones.

Cepas	Medio	<i>P. extremaustralis</i>	PHA-	PHB-	PHAB-	PHB MCS3bsec
Actividad U/mg	LB	29 ± 5	32,5 ± 0,7	29,7 ± 6,6	27,66 ± 6,6	29,7 ± 4,6
	LBO	33 ± 4	38 ± 5	34,5 ± 2,5	31,5 ± 2,5	33,5 ± 2,5

La actividad catalasa de las cepas estudiadas resultó similar en ambos medios de cultivo (**Tabla 5**). Los resultados indican que esta enzima no es la responsable de la supervivencia a la radiación UVA observada en las distintas cepas.

Efecto del pH en la producción de PHA

Dado que los PHA protegen contra varios factores de estrés y que a su vez los factores de estrés pueden tener relevancia en la síntesis del polímero, se analizó el efecto del pH sobre el crecimiento y la producción en *P. extremaustralis*. Los efectos del pH en relación al metabolismo de los PHA no han sido estudiados en profundidad en especies de *Pseudomonas* y podrían ser relevantes en la fisiología y también para ser considerados en estrategias de producción.

Efecto del pH sobre el crecimiento de *P. extremaustralis*

Para analizar cómo el pH inicial del medio de cultivo afecta el crecimiento de *P. extremaustralis* se realizaron cultivos aeróbicos en medio LBO. El rango de pH utilizado para los ensayos abarcó desde 5.5 a 11, se realizó el recuento de células viables (UFC/ml) en el tiempo inicial y final (24 h de incubación), como también la medición de DO_{600nm}. Todos los cultivos se inocularon con precultivos realizados a pH 7 a una DO_{600nm} inicial de 0,05 que corresponde aproximadamente a 1×10^7 UFC/ml.

En los cultivos a pH 5.5 el shock ácido afectó la viabilidad y el desarrollo dado que se observó una disminución del inóculo inicial y un escaso crecimiento (Fig.19A). En contraste a pH 6, el inóculo inicial (t_0) no se vio afectado, pero el desarrollo luego de 24 h alcanzó valores menores ($3,5 \times 10^8$ UFC/ml) en comparación con los cultivos realizados a pH neutro. Los cultivos realizados a pH 7, 8, 9 y 9,5, mostraron un incremento de alrededor de 3 órdenes de magnitud en promedio luego de 24 h, (Fig. 19A y B).

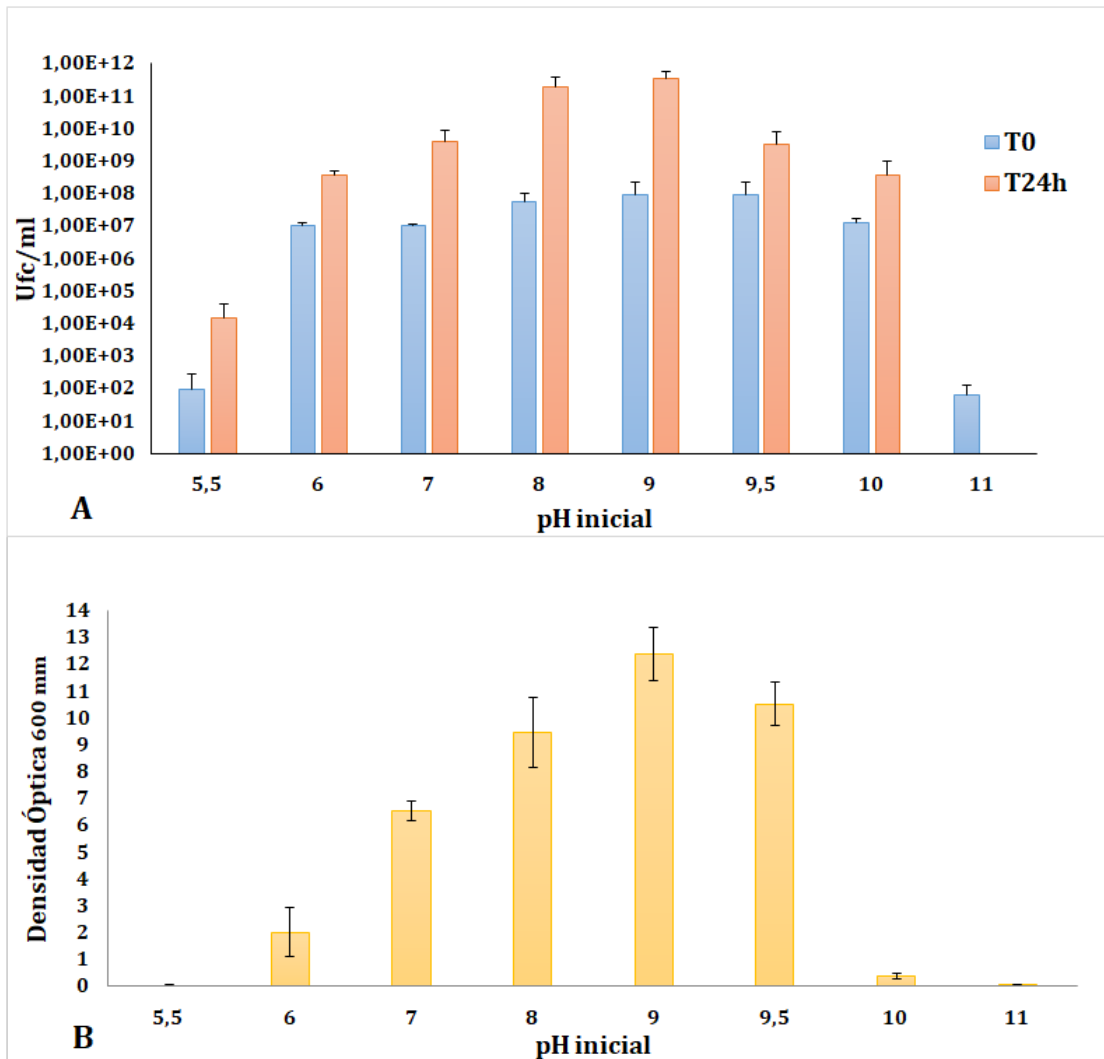


Fig. 19. Efecto del pH sobre la viabilidad celular en *P. extremaustralis*. **A**-Recuento de UFC/ml en función del pH a T₀ (tiempo inicial) y T₂₄ (tiempo de 24h de incubación). **B**- Medición de DO_{600nm} a las 24 h.

En condiciones más alcalinas, es decir en cultivos a pH 10 las células bacterianas fueron capaces de sobrevivir, pero mostraron poco desarrollo luego de las 24h de incubación. Mientras que a pH 11 las bacterias perdieron viabilidad a las 24h de incubación (Fig. 19. A y B).

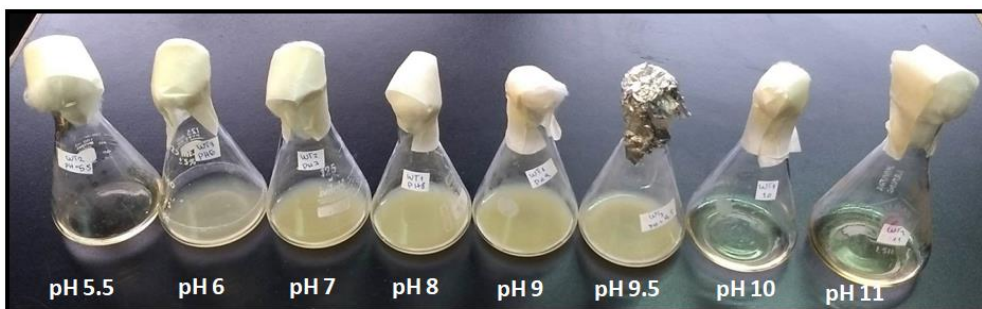


Fig. 20. Cultivos de *P. extremaustralis* en medio LBO en condiciones aeróbicas a 28°C durante 24 h a distinto pH.

En la Fig. 20 se muestra el crecimiento de los cultivos a los distintos pH ensayados, observándose la mayor turbidez en el rango de pH que va de 7 a 9.5.

Acumulación de PHA en cultivos realizados a diferente pH inicial

La producción del polímero se evaluó cualitativamente mediante tinción con azul de Nilo (Fig. 21 A y B). luego de 24 h de cultivo.

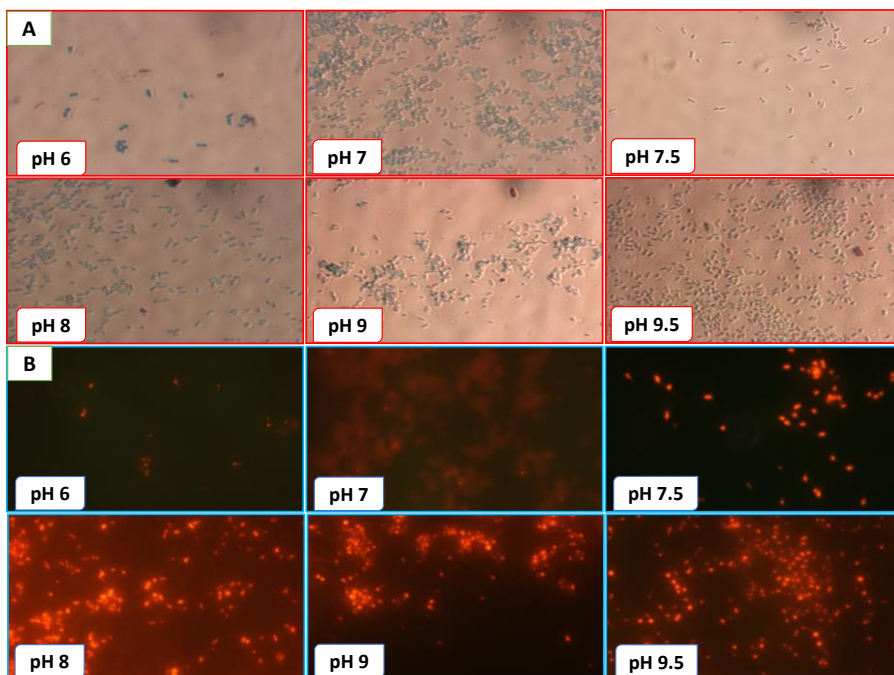


Fig.21. Observación al microscopio de la producción de PHA en *P. extremaustralis* en medio LBO a diferente pH inicial. A: células iluminadas con luz blanca. B. Gránulos de PHA en el interior de las células teñidas con azul de Nilo.

Se observó la presencia de gránulos de PHA (fluorescencia color naranja) en el interior de las células de *P. extremaustralis* a pH 6, 7, 7,5, 8, 9 y 9,5 (Fig. 21B).

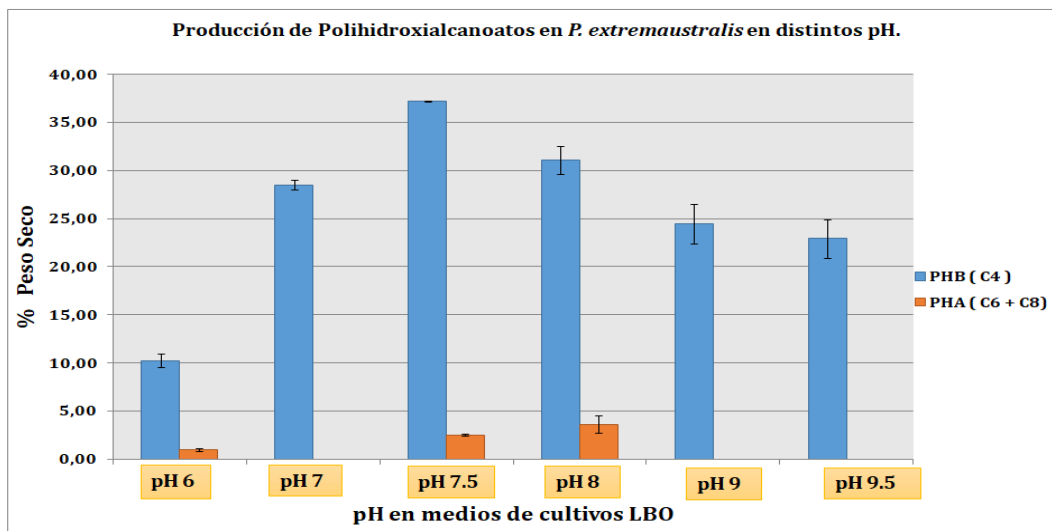


Fig. 22. Medición de PHA por cromatografía gaseosa en *P. extremaustralis* en medios LBO a diferentes pH a 28°C durante 24 h a 200 rpm.

La cuantificación del contenido de PHA se realizó por cromatografía gaseosa, identificándose los monómeros producidos. *P. extremaustralis* fue capaz de sintetizar polihidroxibutirato (PHB) en todos los pH analizados (Fig. 22). Se observó un incremento significativo (test de t de Student, $P < 0,05$) en la producción de PHB desde pH 6 hasta pH 7 y 7,5. Mientras que a pH 8, 9 y 9,5 se observó una disminución en el contenido de PHB con respecto a pH 7,5. El análisis estadístico mostró un incremento significativo en la producción a pH 8 en comparación con el polímero producido a pH 9 y 9,5 ($P < 0,05$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar el contenido de PHB a pH 9 con 9,5 ($P > 0,05$).

Por otro lado, al realizar el mismo análisis para los PHAcM sólo fue posible detectar su acumulación cuando los cultivos fueron realizados a pH 6, 7,5 y 8 (Fig. 22). Los análisis en estos casos mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la producción a pH 6 ($2,22 \pm 0,13$) frente a los pH 7,5 y 8, siendo mayor en los últimos

dos pH. Sin embargo, el análisis de la producción de PHAcM entre pH 7,5 y 8 ($2,54 \pm 0,08$; $3,64 \pm 0,70$) no arrojó diferencias significativas.

Determinación del pH de los sobrenadantes luego del cultivo

Se realizó la determinación del pH en los sobrenadantes de cultivo realizados a diferente pH inicial luego de 24 h de incubación. Los cultivos fueron centrifugados y se midió el pH final en el sobrenadante libre de células (Fig. 23).

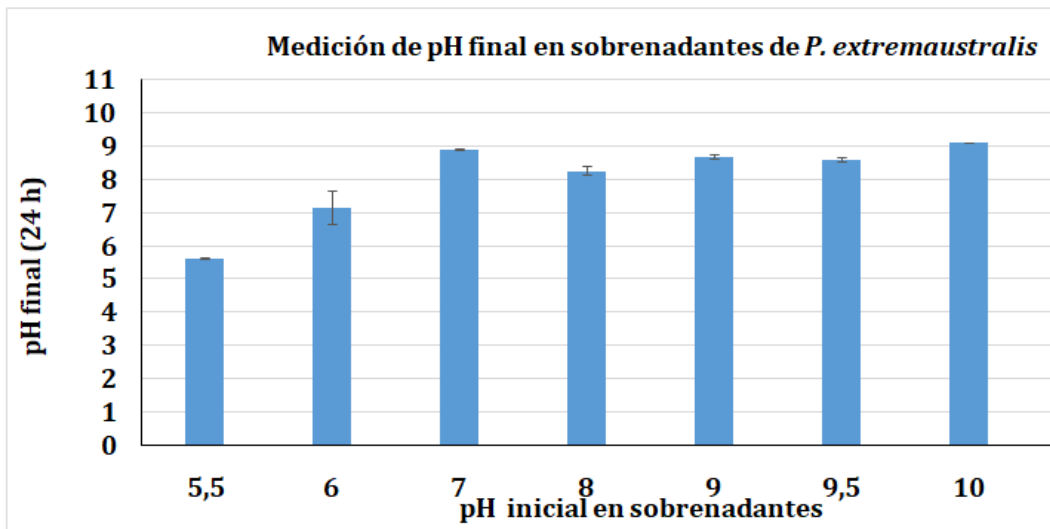


Fig. 23. Determinación de pH del sobrenadante en *P. extremaustralis* en medios LBO a 28°C, durante 24 h y 200 rpm.

Para los cultivos que cuyo pH inicial se encontraba entre 7 y 9,5, fue posible determinar que los valores de pH final del sobrenadante mostraron valores promedios de 8,3 aproximadamente.

El pH de los cultivos que se iniciaron a pH 5,5 se mantuvo igual luego de la incubación y a pH 10 disminuyó levemente (Fig. 23), debido a que a estos pHs *P. extremaustralis* mostró deficiencias en el crecimiento. A pH 11 las células murieron. A pH 6 se observó la capacidad de crecer y aumentar levemente el pH de los

sobrenadantes del cultivo (Fig. 23). Estos resultados podrían sugerir la existencia de un mecanismo tendiente a contrarrestar la variación del pH que permita el desarrollo celular.

Análisis de la tolerancia a la acidez y a la alcalinidad

La influencia del PHA en la tolerancia a la acidez y a la alcalinidad se analizó utilizando ensayos de inhibición de crecimiento en discos que fueron impregnados con buffer a distintos pHs. Se analizó la tolerancia al pH en cultivos en LBO de *P. extremaustralis* y sus mutantes PHB-, PHA-y PHAB-.

Tabla.6. Medición de diámetro del halo de inhibición en placas con buffer pH 5,5 y pH 10 en *P. extremaustralis* y sus mutantes. Letras distintas indican diferencias significativas. Los valores representan media \pm SD de 3 cultivos independientes.

Cepas	Diámetro de inhibición (cm) pH 5.5	Diámetro de inhibición (cm) pH 10
<i>P. extremaustralis</i>	1,04 \pm 0,08 ^a	1,30 \pm 0,02 ^a
PHA-	1,09 \pm 0,06 ^a	1,51 \pm 0,09 ^b
PHB-	1,66 \pm 0,25 ^b	1,77 \pm 0,05 ^c
PHAB-	2,62 \pm 0,12 ^c	2,03 \pm 0,13 ^d

En el rango de pH comprendido entre 6 y 9,5 tanto *P. extremaustralis* como sus mutantes no mostraron inhibición significativa en el crecimiento ($P > 0.05$). En contraste, se observó inhibición del crecimiento a pH 5,5 y pH 10 (Tabla 6, $P < 0.05$).

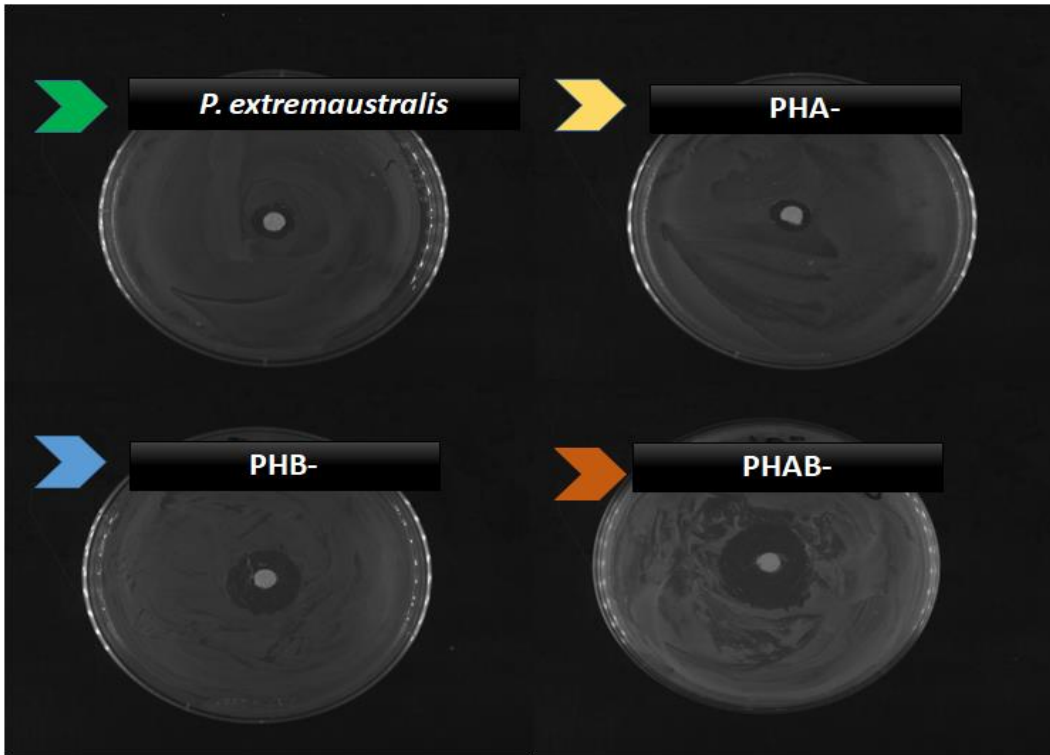


Fig. 24. Foto representativa del ensayo de sensibilidad de *P. extremaustralis* y sus mutantes a pH 5,5. Se observa el halo de inhibición de crecimiento. Placas incubadas a 28°C durante 24h.

P. extremaustralis y la mutante PHA- mostraron similar sensibilidad al ácido con diferencias no significativas en los ensayos a pH 5,5 (Tabla 6). Sin embargo, se apreciaron diferencias significativas en los halos de inhibición al comparar *P. extremaustralis* con la mutante PHB-, la cual es incapaz de sintetizar polímero de cadena corta, como también para el caso de la doble mutante (PHAB-), sin capacidad de síntesis general de PHA, mostrando que el PHB resulta relevante en la sensibilidad al ácido. A pH 10, los halos de inhibición observados en las cepas mutantes mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$, Tabla 6) al ser comparadas con la cepa salvaje.

En la figura 24 puede observarse un ensayo representativo de sensibilidad a pH 5,5 de *P. extremaustralis* y sus mutantes.

DISCUSIÓN

Producción de distintos tipos de PHA en *P. extremaustralis*

La producción de PHA está influenciada por diferentes factores ambientales. Entre estos factores se destacan la presencia de exceso de carbono y bajos niveles de nitrógeno, fosfato u oxígeno (Hervas et al., 2009). Si bien en la mayoría de los casos las condiciones limitantes en nutrientes o bajos niveles de O₂ favorecen la acumulación de estos polímeros, algunas bacterias como *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida* LS46, *Methylobacterium* sp. ZP24 y *Bacillus mycoides* RLJ B-017 son capaces de producir PHA durante el crecimiento, con poco o ningún requerimiento de condiciones limitantes (rev. en Velázquez-Sánchez et al., 2020). El efecto de la relación C/N se encuentra entre los factores más estudiados y reconocido como relevante para maximizar la producción de PHA. Ha sido señalado que, si bien un aumento de la relación C/N promueve una mayor acumulación de PHA en diferentes bacterias, tiene también un efecto contrario sobre el crecimiento celular (Raza et al., 2018, de Melo et al., 2022). Por otro lado, también se reportó la reducción de la acumulación al aumentar la relación C/ N (mol/mol) de 8:1 a 20:1 para una cepa de *Cupriavidus taiwanensis* (Wei et al. 2011). El efecto de estos factores en bacterias capaces de producir distintos tipos de polímeros no ha sido estudiado en profundidad. En esta tesis se analizó el efecto de distintas condiciones de cultivo sobre la producción de PHAcc y PHAcM en *P. extremaustralis*. Los genes involucrados en la biosíntesis de PHA han sido analizados en profundidad previamente en nuestro laboratorio (Catone 2013, Catone et al, 2014). En este trabajo, nos centramos en el estudio del efecto de la relación C/N. Los resultados mostraron que el desbalance en la relación C/N favorece en mayor medida la producción de PHAcM en comparación con PHAcc en *P. extremaustralis*. En bacterias productoras de PHB muy estudiadas como *Cupriavidus necator* (anteriormente conocida como *Ralstonia eutropha*) y *Azotobacter vinelandii* la acumulación ocurre en condiciones de desbalance

nutricional; en *A. vinelandii* en particular, está asociada principalmente con un exceso de fuente de carbono y bajas concentraciones de oxígeno (Castillo et al., 2017). Por otro lado, en especies de *Pseudomonas*, productoras de PHAcM, como *P. putida*, la limitación de nitrógeno, aunque no es estrictamente necesaria para la síntesis de PHA a partir de ácidos grasos, puede mejorar el rendimiento y, por lo tanto, se utiliza en la producción industrial de estos biopolímeros (Prieto et al., 2016). Un análisis multiómico realizado en *P. putida* KT2440 cultivada en octanoato de sodio y bajo nitrógeno mostró también que la producción de PHA fue más alta en condiciones de limitación de nitrógeno (Poblete- Castro et al., 2012) y en *P. putida* CA-3 (Nikodinovic-Runic et al., 2009).

El conocimiento de las condiciones fisiológicas que favorecen la biosíntesis del polímero y de los mecanismos regulatorios genéticos involucrados es importante dado que ofrecen la posibilidad de seleccionar procesos de producción asociados al crecimiento. Esto permite implementar estrategias de cultivo más eficientes para lograr un mejor rendimiento en la producción de PHA (Velázquez-Sánchez et al., 2020). En este sentido, la producción de PHAcc en *P. extremaustralis* podría cumplir estas condiciones, dado que no es necesario un desbalance muy marcado para la producción del polímero permitiendo también un buen rendimiento celular.

Por otra parte, ha sido señalado que la limitación de O₂, incluso la inherente provocada por los cultivos que crecen a alta densidad celular, puede ser utilizada como una estrategia de control simple y eficaz para la síntesis de PHA a partir de ácidos grasos en *P. putida* LS46 (Blunt et al., 2019). En esta bacteria se propuso, además, que la estrategia de alimentación por pulsos favorece la optimización rápida del bioproceso, sobre todo cuando se utilizan sustratos que pueden resultar tóxicos o algo inhibitorios como el ácido octanoico (Blunt et al., 2019), comúnmente empleado para la producción de PHAcM en *Pseudomonas*.

Otra observación interesante y novedosa surgida a partir del análisis de la composición del PHA por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de

masa (GC-MS) en *P. extremaustralis* fue la presencia de levulinato de metilo, como monómero obtenido luego del proceso de metanólisis. La GC-MS constituye un método más adecuado para la identificación y cuantificación de los monómeros de PHA en comparación con la cromatografía gaseosa con detector de llama (GC-FID), ya que se puede realizar aún en ausencia de estándar (Koller y Rodríguez-Contreras, 2015). Ha sido señalado que el ácido levulínico puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía y como precursor de 3-Hidroxivalerato (HV) y 4-HV en *R. eutropha* (Volodina et al., 2015). El ácido levulínico tiene relación con el metabolismo de los PHAcc dado que es la forma oxidada de 4-HV, y su catabolismo comienza con la activación a levulinil-CoA por una acil-CoA sintetasa unida a la membrana (Volodina et al., 2015). En *R. eutropha* el ácido levulínico cosuministrado con glucosa en condiciones optimizadas permitió la acumulación de PHA hasta 81% de CDW (Wang et al., 2013). El polímero obtenido estuvo compuesto de 3HV y 3HB y la incorporación de 3HV se vio menos afectada por la limitación de nitrógeno en comparación con 3HB, lo que indica también que variando la relación C/N se puede modificar la composición del polímero y en consecuencia sus propiedades (Volodina et al., 2015). Esto demuestra que el ácido levulínico puede ser metabolizado por diferentes microorganismos e incorporado en distintos componentes celulares, similar a lo observado en el PHA de *P. extremaustralis*.

Como ha sido comentado previamente, existe gran interés a nivel mundial en el desarrollo de alternativas eficientes a los productos derivados del petróleo debido a la gran demanda en el mercado por el incremento de la población, el agotamiento de las reservas fósiles y a las fluctuaciones en el precio. La síntesis química de estos productos posee varias desventajas, entre ellos los problemas debidos a los efectos sobre el calentamiento global, el aumento de la contaminación ambiental, el uso de catalizadores tóxicos y el mayor costo energético (Pachapur et al., 2016). Por este motivo, hay una tendencia creciente hacia la generación de energía limpia unida a una demanda de los consumidores solicitando productos ecológicos. Como consecuencia de esto, el foco de atención está puesto en la generación microbiana

de productos químicos a partir de recursos renovables. Las estrategias que comprenden la exploración de alternativas biológicas (materias primas o procesos de producción) con mejoras en la tecnología de bioprocesos resultan muy atractivas. En este sentido, existe una gama de productos en plataformas químicas de base biológica en la cual los ácidos y alcoholes orgánicos tienen un papel especial dado que podrían usarse para aplicaciones industriales a gran escala como bloques para la construcción de distintos compuestos (Pachapur et al., 2016). El ácido levulínico es uno de los productos químicos de la plataforma, ya que sus características químicas que incluyen la presencia de grupos funcionales (carboxilo y cetona) le imparten un patrón notable de reactividad permitiéndole formar derivados que tienen aplicaciones significativas en varios campos, lo que lo convierte en un compuesto químico verde versátil (Morone et al., 2015). Lo mismo se aplica a los monómeros (R)3-hidroxihexanoato e hidroxioctanoato que son sustratos valiosos como componentes básicos para una variedad de aplicaciones biotecnológicas, como la síntesis de antibióticos, poliésteres, vitaminas e incluso dioles (Manoli et al., 2022, Yañez et al., 2020). Estos monómeros y compuestos relacionados tienen al menos dos grupos funcionales (un grupo hidroxilo y un carboxilo) y son susceptibles de modificación química. Se pueden producir por despolimerización *in vivo* de los PHA acumulados, por fermentación para la producción directa de 3-hidroxicanoatos (HA) en el medio de cultivo y por conversión de PHA purificados. La ventaja de las dos primeras alternativas es que la producción no requiere la extracción de los PHA intracelulares ya que se liberan al sobrenadante (Yañez et al., 2020).

Todas estas observaciones remarcan la importancia del estudio de las condiciones de producción de estos polímeros en las diferentes bacterias para ampliar el espectro de sus aplicaciones. En el caso de *P. extremaustralis*, sería interesante explorar no solo la producción de los distintos polímeros sino la de los monómeros incluyendo también el ácido levulínico. Por otro lado, ha sido señalado que los PHA tienen un papel clave en la fisiología bacteriana y en la resistencia a distintos factores de estrés tanto bióticos como abióticos (Müller-Santos et al., 2021), sin

embargo, la contribución de los distintos tipos de PHA en una bacteria no ha sido abordado previamente y se describe en el apartado siguiente.

Resistencia a estrés oxidativo y radiación UV

La radiación UV es uno de los factores de estrés ambiental más importantes en el planeta. Frente a la exposición a la radiación UV, muchos microorganismos son capaces de generar mecanismos de defensa que les permiten sobrevivir en esas condiciones. Un ejemplo claro son los microorganismos extremófilos muchos de los cuales son capaces de sintetizar metabolitos (extremolitos) que absorben en un amplio rango de radiación permitiendo el desarrollo en esas condiciones (Gabani y Singh, 2013).

Los PHA tienen un papel relevante en la resistencia a múltiples factores de estrés (López et al. 2015), sin embargo, existe poca información sobre su contribución en la tolerancia a la radiación UV. En este trabajo se exploró la relevancia de PHAcc y PHAcM en la resistencia a distintos tipos de estrés en *P. extremaustralis* y sus mutantes. En particular, dado que esta especie procede de la región Antártica se analizó la resistencia a la radiación UVA y su relación con el daño oxidativo.

Los trabajos previos relacionados con el estudio del efecto de la radiación UV en bacterias productoras de PHA analizaron la radiación de onda corta (UVC). Estudios realizados en distintas cepas de *Azospirillum brasilense*, comparando cultivos realizados en condiciones de acumulación de PHB y de no acumulación o cepas salvajes y mutantes deficientes en la producción, mostraron que el polímero protege de la radiación UVC (Tal y Okon 1985, Kadouri et al. 2003). Mayor supervivencia a la radiación UVC también fue observada en cepas recombinantes de *E. coli* que expresan los genes PHB de *Cupriavidus necator* en comparación con la cepa salvaje (Wang et al., 2009).

Recientemente, se demostró que el PHB también protege contra la radiación UVA en *C. necator* (Slaninova et al., 2018). El principal efecto nocivo de la radiación UVA se atribuye a la formación de ROS que genera daño a las macromoléculas. La

contribución de los PHA en la protección frente al estrés oxidativo, se ha demostrado en varias especies bacterianas, como *A. brasilense*, *A. hydrophila* y especies de *Pseudomonas* (Kadouri et al., 2003, Zhao et al. 2007, Ayub et al., 2004, 2009), incluyendo *P. extremaustralis*. En concordancia con esto, *P. extremaustralis* y sus mutantes mostraron mayor sensibilidad a la radiación UVA en ausencia de PHA. Se observaron diferencias entre cepas mutantes, indicando diferente contribución de los distintos tipos de polímero en la tolerancia a UVA. Dado que la mayor sensibilidad se observó en la mutante PHB-, esta fue complementada restaurando el fenotipo salvaje en cuanto a la resistencia, lo que indica que el efecto protector depende en mayor medida del PHB.

En el presente trabajo de tesis se pudo determinar, que ambos tipos de polímeros PHB y PHAcM, a pesar de no ser sintetizados en igual proporción, colaboran en la tolerancia al peróxido de hidrógeno favoreciendo la supervivencia de las cepas bajo estudio. Ha sido mencionado que la tolerancia al estrés asociada a la producción de los PHA está relacionada con su movilización ya que estos polímeros son compuestos reducidos que funcionan como reservorios de carbono y energía y están implicados en el balance redox celular (López et al., 2015).

Los resultados muestran que en *P. extremaustralis* el PHB es el principal involucrado en la protección UVA. Cuando la bacteria fue expuesta a UVA a 30 °C el contenido de PHB mostró una tendencia a disminuir, aunque los resultados fueron no significativos. En frío, se observó una clara disminución en la cantidad de PHB luego de la exposición a UVA. La movilización del polímero permitió alcanzar un estado fisiológico antioxidante, al proporcionar poder reductor, para hacer frente al estrés oxidativo derivado del frío y de la radiación UVA. Los resultados de esta tesis relacionados con la resistencia a la radiación UVA han sido parcialmente publicados en Tribelli et al., (2020). En condiciones de baja temperatura se observó un mayor efecto protector del PHB contra la radiación UVA en *P. extremaustralis* en comparación con 30°C. En esta bacteria, la posibilidad de sintetizar y acumular PHB es clave en condiciones de frío ya que la mutante deficiente en PHB no crece

adecuadamente a 10°C, ni puede desarrollar una vida planctónica (Ayub et al. 2009, Tribelli y López 2011). Esta deficiencia está relacionada con diferencias en el estado redox celular dado que la mutante PHB- mostró una disminución notable de la relación NADH/NAD⁺ y contenido de NADPH, en comparación con la cepa salvaje y en consecuencia mayor daño a macromoléculas (Ayub et al. 2009). Estas observaciones indican que el PHB es clave en las defensas antioxidantes en *P. extremaustralis* y están en concordancia con estudios que muestran la inducción de enzimas antioxidantes en condiciones de frío (De Maayer et al. 2014). A diferencia de lo observado para *P. aeruginosa* (Pezzoni et al., 2014), los resultados obtenidos muestran que la enzima catalasa no estaría involucrada en la protección UVA en *P. extremaustralis*.

La resistencia bacteriana a los rayos UVA además podría involucrar mecanismos globales de regulación genética vinculados a los PHA. Se conocen reguladores maestros en *Pseudomonas*, como el factor sigma RpoS implicado en la respuesta estricta y Quorum Sensing, que ha sido relacionado con la respuesta a la exposición a la radiación UV por su control sobre el sistema antioxidante (Miller et al. 2001; Costa et al. 2010; Pezzoni et al. 2012). Asimismo, en *P. putida* en condiciones de estrés se demostró la asociación entre la degradación de PHA, la acumulación de la alarmona ppGpp y el aumento de los niveles intracelulares de RpoS (Ruiz et al. 2001, 2004). RpoS también está involucrado en el control de la transcripción de genes PHB en *A. vinelandii* (Peralta-Gil et al. 2002) y en la movilización del polímero en *P. putida* (Raiger Iustman y Ruiz, 2008). Por otra parte, también se ha demostrado que el monómero 3-hidroxi-butirato (3HB) o las phasinas pueden actuar como chaperonas preservando las enzimas frente a los efectos del daño oxidativo (Obruca et al. 2016, Mezzina et al. 2015), lo que también podría contribuir en la tolerancia a los rayos UVA.

Un mecanismo diferente que previene los efectos de la radiación UVA está relacionado con la presencia de compuestos que actúan como escudos o pantallas frente a la radiación, absorbiendo o desviándola, impidiendo así que los fotones

alcancen los objetivos celulares, asegurando el mantenimiento de la viabilidad celular (Gao y Garcia-Pichel, 2011). Se han descrito dos mecanismos para explicar la interacción de estos compuestos con la radiación UV: la dispersión y la absorción de la luz. La dispersión consiste en la desviación de fotones de su trayectoria por heterogeneidades en las células o el medio, mientras que la absorción es la captura de fotones por moléculas fotoactivas. Un estudio realizado en *C. necator* mostró que los gránulos de PHA pueden actuar dispersando la luz y generando este efecto de escudo o pantalla frente a la radiación UVA, contribuyendo así a través de sus propiedades biofísicas a la reducción de las ROS intracelulares (Slaninova et al. 2018). La evaluación de estas características se realiza a través de técnicas espectrofotométricas por lo que se debe tener en cuenta el tamaño celular. En el caso de *C. necator* se menciona que no se observaron cambios significativos en las dimensiones de las células de la cepa salvaje y de la mutante PHB (Mravec et al. 2016) por lo que el aumento en la dispersión de la luz se atribuyó a los gránulos de PHA. En *P. extremaustralis*, si bien se observaron algunas diferencias en las dimensiones de las células en condiciones de acumulación y no acumulación, estos análisis mostraron que no se puede descartar que los gránulos de PHA actúen también como un escudo protector frente a la radiación UVA (Tribelli et al., 2020). Estas observaciones sugieren que la protección conferida por el polímero podría involucrar varios mecanismos que actúan en forma simultánea.

En resumen, los resultados en conjunto indican que en *P. extremaustralis*, el papel protector de los PHA sobre la radiación UVA radica en varios factores como la mayor tolerancia al estrés oxidativo, probablemente relacionado con la movilización del polímero, sumado al efecto del polímero en la dispersión de luz que actuaría como escudo protector contra la radiación.

Este conocimiento podría promover el desarrollo de otras aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la exploración de las propiedades de estos bioplásticos como pantallas que dispersen la luz.

Efecto del pH en la producción de PHA

Las bacterias están constantemente expuestas a condiciones ambientales fluctuantes, incluidas las variaciones de pH. El pH es un factor importante que afecta la fisiología bacteriana provocando cambios en las macromoléculas y en la función de muchas enzimas, así como en la solubilidad de diferentes compuestos. La supervivencia frente a fluctuaciones en el pH dependerá de la capacidad que presenten los diferentes microorganismos para detectar y responder a las variaciones de este factor. Las bacterias han desarrollado mecanismos específicos, para adaptar su fisiología ante condiciones de estrés relacionadas con la acidez o alcalinidad, tales como la presencia de bombas de eflujo, modificaciones en los lípidos de membrana o la presencia de chaperonas (Lund et al., 2020). Además de estos mecanismos específicos, otras características podrían ayudar a hacer frente a los cambios del pH. Dado que los PHAs contribuyen a la resistencia a estrés se postula que también podrían proporcionar protección frente a los cambios de pH. Ha sido señalado que, junto a la temperatura y el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo, el pH es uno de los principales factores que influyen en la producción de PHA. Sin embargo, el estudio de la influencia de la variación del pH en la síntesis de PHA es limitado y principalmente está centrado en la optimización de las condiciones de cultivo para su producción. El pH óptimo para el crecimiento microbiano y el de la maquinaria enzimática para la formación de PHA no es necesariamente idéntica. En *Rhodobacter sphaeroides* RV condiciones subóptimas para el crecimiento resultan en valores más altos de producción del polímero (Suzuki et al. 1995). Normalmente pH más altos que el óptimo de crecimiento incrementan la producción de PHA y el polímero ayuda a resistir las condiciones desafiantes de pH. Estas observaciones fueron corroboradas en varias bacterias como *Nostoc muscorum* y *Sinorhizobium meliloti* (Sharma y Mallick 2005; Tombolini et al., 1995).

En un aislamiento de agua de mar de *Bacillus megaterium* se observó una mayor producción de PHB a pH 7 (Mohanrasu et al., 2020), sin embargo, en el caso de

bacterias Gram positivas la esporulación constituye un problema para la producción del polímero, ya que la máxima acumulación se da antes de la formación de esporas. En *Bacillus cereus* SPV fue posible suprimir la esporulación a pH ácido, entre 4,5 y 5,8 en medio no tamponado, lo que resultó en el aumento en el rendimiento de PHA (Valappil et al., 2007). Esto también se observó en *E. coli* recombinante productora de PHB en la cual la mayor producción de este polímero se detectó en condiciones ácidas (Wang et al., 2009). En *Microbacterium* sp. el pH resultó decisivo en la productividad del PHA (Khosravi-Darani et al., 2019). Por parte, cuando se utilizan cultivos microbianos mixtos para la producción de PHA, el pH es un factor muy relevante que afecta la diversidad bacteriana, permitiendo la manipulación de la composición del polímero (Kourmentza y Kornaros, 2016). El estudio de la producción en estos cultivos permitió determinar que, si bien a pH 7,5 la producción del polímero es mayor que a 9,5, el contenido de 3-hidroxivalerato (3HV) se duplicó a pH básico (Villano et al., 2010), lo que fue explicado por cuestiones metabólicas basadas en diferentes requerimientos energéticos. A valores de pH más altos, la acetil-CoA se consume predominantemente para la generación de energía, por aumento de la actividad ATP sintasa, y en menor medida para la generación de 3-hidroxi-butarato (3HB), con lo cual la generación 3HV por condensación de acetil-CoA con propionil-CoA se vuelve más probable.

Además, el pH tiene influencia en la actividad de la sintasa y la disminución de la actividad de esta enzima conduce a la producción de polímeros con mayor peso molecular, por lo que la modificación del valor de pH podría permitir modular el peso molecular del PHA obtenido (Obruca et al., 2021). La disminución de la actividad de la sintasa ha sido observada para algunas bacterias frente a otros factores de estrés, como por ejemplo cuando existe deficiencia en la transferencia de oxígeno (Gómez-Hernández et al., 2020). Para las sintasas en las que se ha estudiado, tanto de bacterias como de arqueas, el pH óptimo está en el rango de la neutralidad, como para la sintasa de clase I de *C. necator* (antes *R. eutropha*) (Zhang et al., 2000). Un estudio realizado con *E. coli* recombinante que lleva los genes *phaCAB* de *C. necator* (Kusaka et al., 1999)

mostró que una disminución en 0,5 unidades de pH significó un aumento considerable del peso molecular (Mw) del polímero.

Recientemente, un trabajo de revisión analizó la influencia de las fluctuaciones de pH en la producción de PHA estableciendo su importancia y proponiendo al estrés generado por el pH como un factor que podría resultar en un ajuste fino para modular el contenido y la composición del polímero (Obruca et al., 2021).

Además, el pH fue identificado como un factor decisivo para la productividad volumétrica de PHA y el rendimiento de conversión de sustrato a PHA (Mohanrasu et al., 2020). Todo esto señala la relevancia del conocimiento de la influencia del pH no solo en el crecimiento bacteriano sino también en la producción de PHA.

Los estudios sobre la producción de PHA en *P. extremaustralis* realizados previamente en nuestro laboratorio se realizaron en condiciones de pH que rondaron la neutralidad (7,5). En este trabajo se analizó el comportamiento de *P. extremaustralis*, cuando era inoculada en medio de cultivo con diferente pH inicial, observándose que fue capaz de desarrollarse a valores de pH comprendidos entre 6 y 10 mostrando acumulación de PHA. Resultados similares fueron hallados en *P. toyotomiensis*, una especie psicotolerante aislada de una fuente termal, que pudo crecer en un rango de pH de 6 a 10,5 (Hirota et al., 2011). A pH 5,5, *P. extremaustralis* mostró una abrupta disminución en la viabilidad celular, resultando en un crecimiento pobre también verificado por la ausencia de alcalinización del sobrenadante del medio de cultivo, sugiriendo que no fue capaz de contrarrestar la acidez del ambiente externo. En condiciones alcalinas a pH 10 el crecimiento fue levemente afectado, mientras que a pH 11 no fue capaz de crecer.

La síntesis y la degradación de los PHA constituyen procesos dinámicos integrados al metabolismo bacteriano que permiten la utilización de estos depósitos de carbono y poder reductor en condiciones de estrés (López et al., 2015, Velázquez-Sánchez et al., 2020). Las depolimerasas de PHA son las enzimas responsables de la movilización de las unidades monoméricas que componen estos polímeros. Los monómeros liberados son utilizados para el metabolismo bacteriano, pero también se ha señalado la liberación al medio extracelular de ácidos como el (R)-3-hidroxibutírico (3HB) y (R) -

3-hidroxiálcanoico (3HAcm) en varias bacterias productoras naturales de PHA como *Bacillus megaterium*, *Ralstonia eutropha*, *P. putida* y *Alcaligenes latus* y también en *Escherichia coli* recombinante dependiendo de las condiciones de cultivo (Ren et al. 2005, Lee et al.1999). En *P. putida*, se observó que la liberación de 3HAcm está favorecida en condiciones alcalinas, lo que se atribuyó a una mayor actividad de la depolimerasa intracelular de PHAcM (PhaZ) a ese pH (Ren et al., 2005). La secreción de ácido 3-hidroxióctanoico y 3-hidroxihexanoico, en *P. putida* GP01 a pH alcalinos provoca una fuerte disminución del pH, siendo la secreción de estos monómeros menos eficiente a pH neutro (Wang et al., 2007). Esta característica puede ser utilizada con fines biotecnológicos para la obtención de estos ácidos derivados de la depolimerización de PHA, como materia prima para síntesis de vitaminas, antibióticos, etc. (Yañez et al., 2020). En relación a esto, en *P. extremaustralis* se observó la modificación del pH extracelular al final del experimento con valores de pH en los sobrenadantes que rondaron 8,3 aproximadamente. Esto sugiere que para poder desarrollarse adecuadamente *P. extremaustralis* podría estar depolimerizando el PHA y liberando los monómeros para contrarrestar el efecto del pH extracelular en condiciones alcalinas. Por este motivo, *P. extremaustralis* podría ser una buena candidata para la producción de monómeros de 3 hidroxiácidos (3HAcc y 3HAcm).

P. extremaustralis mostró la máxima acumulación de PHA a pH 7,5 y 8. Valores similares fueron observados en condiciones de cultivo optimizadas en *P. pseudoalcaligenes* que mostraron que el pH es un factor relevante para la producción del polímero siendo el pH 8,6 el más favorable (Zihayat et al., 2019).

En cuanto a la tolerancia a la exposición a condiciones ácidas y alcalinas la cepa salvaje mostró mayor tolerancia que las mutantes deficientes en la producción de PHA polímero y se comprobó la mayor contribución del PHB en comparación con los PHAcM.

El conocimiento de los beneficios que confieren estos polímeros en la fisiología de las bacterias productoras puede ser de utilidad para diversas aplicaciones ambientales. Por ejemplo, la mayor resistencia conferida por los PHA podría contribuir a la obtención de inoculantes bacterianos mejorados para fines agrícolas o de biorremediación (López

et al. 2015), por lo que la capacidad de hacer frente al estrés derivado de cambios en el pH también podría ser útil para prosperar en suelos ácidos o alcalinos.

CAPITULO 2

Análisis comparativo de los genes relacionados con la biosíntesis de PHA en genomas de *Pseudomonas* pertenecientes a distintas especies

OBJETIVOS PLANTEADOS

En este capítulo se trabajó con el objetivo 2 de la tesis doctoral:

2- Analizar los genes relacionados con la producción los distintos tipos de PHA (PHAcc; PHAcM) en los genomas de *Pseudomonas* disponibles en base de datos. Comparar el contexto genómico en las distintas especies.

Las especies del género *Pseudomonas* son típicas productoras de PHAcM, aunque algunas especies como *Pseudomonas* sp. 61-3, *P. extremaustralis* y *P. pseudoalcaligenes* (Matsusaki et al. 1998; Ayub et al., 2006, Manso Cobos et al., 2015) son también capaces de producir PHAcc. En *P. extremaustralis*, los genes relacionados con la producción de PHB se encuentran en una isla genómica y probablemente fueron adquiridos por transferencia horizontal teniendo origen en las β -Proteobacterias (Ayub et al., 2007). Teniendo en cuenta el gran número de genomas de *Pseudomonas* disponibles en bases de datos se realizó la búsqueda de genes relacionados con la producción de PHAcc y el análisis de su entorno genómico a fin de poder detectar elementos genéticos que permitan evidenciar probables eventos de transferencia horizontal.

Para la búsqueda de genes PHB se utilizó como referencia la secuencia del gen *phbC* de *P. extremaustralis* y se analizó el entorno genómico.

En este análisis también se tuvo en cuenta el origen de las cepas analizadas, indicando la fuente de aislamiento para conocer su procedencia.

RESULTADOS

Búsqueda del gen *phbC* en los genomas de *Pseudomonas*

Los análisis realizados estuvieron enfocados en la base de datos de Pseudomonas.com, que es una base de datos muy completa de los genomas de este grupo de bacterias, la cual incluye tanto genomas completos, como incompletos (draft). La búsqueda se realizó sobre 14.283 secuencias depositadas (actualizado hasta el mes de junio de 2023). Teniendo en cuenta esto, se fijaron criterios para realizar el análisis. En el caso de *P. aeruginosa*, muy estudiada por su interés sanitario, existe un gran número de genomas secuenciados (7960) tanto completos y cerrados como abiertos con distinto grado de cobertura. Por este motivo, para el análisis se eligieron los genomas completos 495 según la base de datos Pseudomonas Genome DB (Pseudomonas.com) con acceso el 1/6/2023. Además, se excluyeron todos los genomas correspondientes a cepas no caracterizadas a nivel de especie que figuran en el registro como *Pseudomonas* sp.

A partir de estos análisis, se encontraron además de *P. extremaustralis* se encontraron 15 especies de *Pseudomonas* que presentaron en su genoma la sintasa *phbC*. El número de cepas analizadas para cada especie se muestra en la (Tabla 1). Entre las cepas anotadas como *Pseudomonas* sp. se hallaron más de 100 genomas conteniendo secuencias homólogas a la sintasa de PHB (Tabla 1).

Tabla 1. Número de cepas de cada especie de *Pseudomonas* que presentan en su genoma secuencias homólogas a la sintasa *phbC* de *P. extremaustralis*.

	Especies	Número de cepas
1	<i>P. aeruginosa</i>	25
2	<i>P. arsenicoxydans</i>	3
3	<i>P. brassicacearum</i>	2
4	<i>P. caspiana</i>	1
5	<i>P. fluorescens</i>	31
6	<i>P. frederiksbergensis</i>	8
7	<i>P. lini</i>	6
8	<i>P. mandelii</i>	11
9	<i>P. oleovorans</i>	6
10	<i>P. pelagia</i>	1
11	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	5
12	<i>P. putida</i>	1
13	<i>P. syringae</i>	1
14	<i>P. stutzeri</i>	7
15	<i>P. umsongensis</i>	6
16	<i>Pseudomonas</i> sp.	112
	TOTAL	226

Comparaciones interespecíficas

A continuación, se presenta el análisis de los genes de PHB y su entono genómico en diferentes especies de *Pseudomonas* en comparación con *P. extremaustralis* 14-3b. Se analizaron los genes *phbRBAC* que codifican el regulador transcripcional PhbR; la acetoacetyl-CoA reductasa, PhbB; la beta cetotilasa, PhbA y la sintasa PhbC. Además, se analizaron los genes *phbFPX*, que incluyen el regulador PhbF, el gen que codifica la phasina PhbP y un gen que codifica una proteína de función desconocida PhbX, encontrada en los gránulos de *P. extremaustralis* (Catone et al., 2014). También, se

analizaron los genes *fabI*, *ack*, *pta* que codifican una enoil-[acil-carrier-proteína] reductasa, un acetato quinasa y el fosfato acetiltransferasa, respectivamente. Estos genes han sido identificados también en otras bacterias asociados a los genes PHB (*Sznajder et al., 2015*). En la Fig. 1 se muestra la comparación de los genes *phbFPX* y *pta*, *ack*, y *fabI* con bacterias de otros géneros que poseen los genes PHB como *A. vinelandii* y *R. eutropha*. Se observa un alto grado de similitud con los genes de *P. extremaustralis* (Fig. 1), aunque el entorno genómico muestra algunas diferencias.

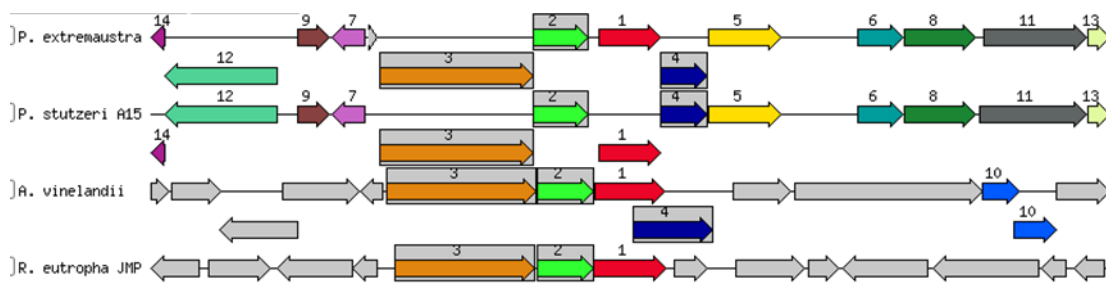
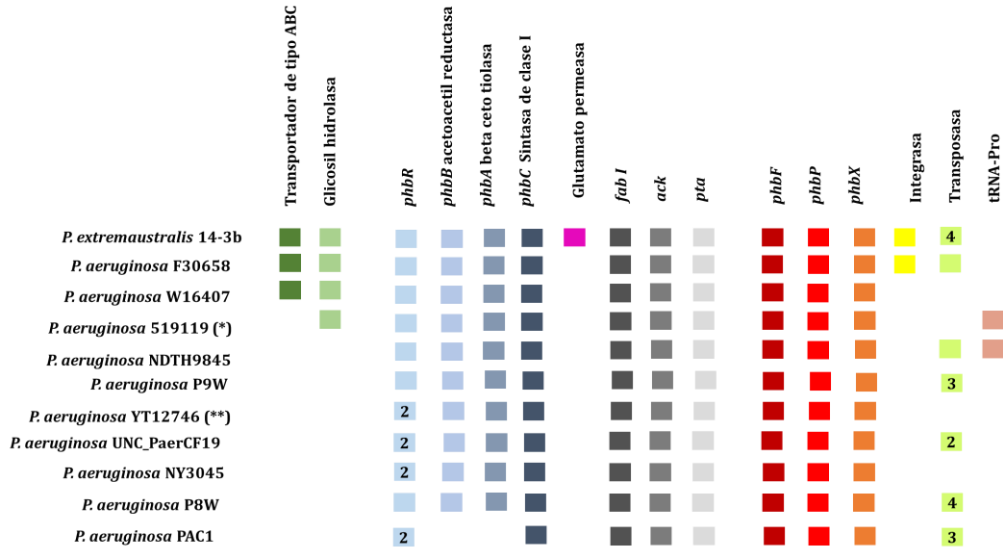


Fig. 1. Organización de los genes PHB y regiones adyacentes en *P. extremaustralis* y su comparación con otras bacterias. Referencias: 9: *phbF*, 7: *phbP*, 3: *phbX*, 2: *pta*, fosfato acetil transferasa (EC 2.3.1.8), 1: *ack*, acetato quinasa, 4: *fabI*, enoil-acil-carrier-proteína reductasa [NADH] (EC 1.3.1.9). Colores y números iguales significan genes homólogos.

P. aeruginosa

El análisis de los 495 genomas completos mostró que 25 genomas de diferentes cepas de *P. aeruginosa* presentaron el gen de la sintasa *phbC* correspondiendo al 5 % de cepas de esta especie con genoma completo depositadas en la base de datos. Los resultados del análisis de genes PHB y de su entorno genómico se muestran en la Fig. 1.



(*) *P. aeruginosa* R31; *P. aeruginosa* P33; *P. aeruginosa* P23; *P. aeruginosa* TL3773; *P. aeruginosa* PA2207; *P. aeruginosa* SRRSH1101; *P. aeruginosa* SRRSH1002; *P. aeruginosa* SRRSH1408; *P. aeruginosa* NDTH10366; *P. aeruginosa* SRRSH2790; *P. aeruginosa* SRRSH1120; *P. aeruginosa* QZPH21; *P. aeruginosa* QZPH16; *P. aeruginosa* NDTH7329.
 (**) *P. aeruginosa* KB-PA_3.

Fig. 2. Comparación de la región genómica que contiene el gen *phbC* en distintas cepas de *P. aeruginosa*. Se muestra la comparación con *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

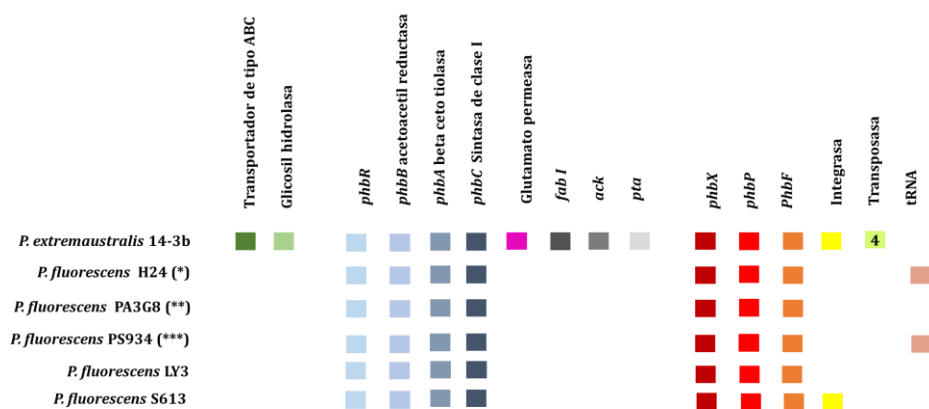
Las cepas de *P. aeruginosa* mostraron la presencia del grupo de genes *phbRBAC* y *phbFPX*, ambos asociados también a la producción de PHAcc. También se observó el grupo de genes, *fabI*, *ack*, *pta*. Cabe destacar que en la mayoría de los casos se observaron secuencias asociadas a elementos genéticos móviles tales como transposasas e integrasas y regiones que codifican tRNAs cercanas a los genes PHB (Fig. 2).

De las cepas analizadas de *P. aeruginosa* 24 provenían de aislamientos clínicos de pacientes con diferentes enfermedades incluyendo cáncer, infecciones urinarias, respiratorias, intestinales, de muestras de sangre y quemaduras. Una de las cepas no contaba con la información referida a la fuente del aislamiento.

P. fluorescens

Esta especie mostró un alto número de cepas (31) que presentaron el gen *phbC*. El análisis mostró que todas las cepas poseen ambos grupos de genes relacionados con el metabolismo del PHAcc, *phbRBAC* y *phbFPX* (Fig. 2). Cabe destacar que ninguna de las cepas presentó los genes que codifican *fabI*, *ack* y *pta* en *P. extremaustralis*. En algunas de las cepas se encontraron genes que codifican integrasas y en otras 2 tRNA (Fig. 3).

En su gran mayoría los aislamientos fueron obtenidos de muestras de suelo, 2 provienen de aguas subterráneas (FW300-N2E3, S613), mientras que una cepa (G20-18) fue aislada de una hierba ártica. La especie *P. fluorescens* incluye muchas cepas de interés como promotoras de crecimiento vegetal (Hol et al., 2013).



(*) *P. fluorescens* NCIMB 11764; *P. fluorescens* C3.

(**) *P. fluorescens* FW300-N2E3; *P. fluorescens* LY3.

(***) *P. fluorescens* PS900; *P. fluorescens* PS726; *P. fluorescens* PS861; *P. fluorescens* PS861; *P. fluorescens* PS704; *P. fluorescens* PS676; *P. fluorescens* PS858; *P. fluorescens* PS928; *P. fluorescens* PS723; *P. fluorescens* PS691; *P. fluorescens* PS874; *P. fluorescens* G20-18; *P. fluorescens* PS903; *P. fluorescens* PS943; *P. fluorescens* PS850; *P. fluorescens* PS838; *P. fluorescens* PS833; *P. fluorescens* PS914; *P. fluorescens* PS870; *P. fluorescens* PS710; *P. fluorescens* PS639; *P. fluorescens* PS862.

Fig. 3. Comparación de la región genómica que contiene el gen *phbC* en distintas cepas de *P. fluorescens* con *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

P. arsenicoxydans

Esta especie de *Pseudomonas* posee la capacidad de oxidar arsenito (Campos et al., 2010). El *cluster phbRBAC* se encontró completo en las 3 cepas analizadas, mientras que solo *P. arsenicoxydans* CECT 7543 presentó el *cluster phbFPX* (Fig. 4). Esta cepa posee duplicado el gen *phbR*. La cepa ACM1 también presentó dos copias de este regulador en su genoma. En ninguna de las comparaciones se encontraron los genes que codifican *fabI*, *ack* y *pta* presentes en *P. extremaustralis*. En las cepas CECT7543 y E3 presentaron un gen que codifica para tRNA en la región cercana a los genes PHB.

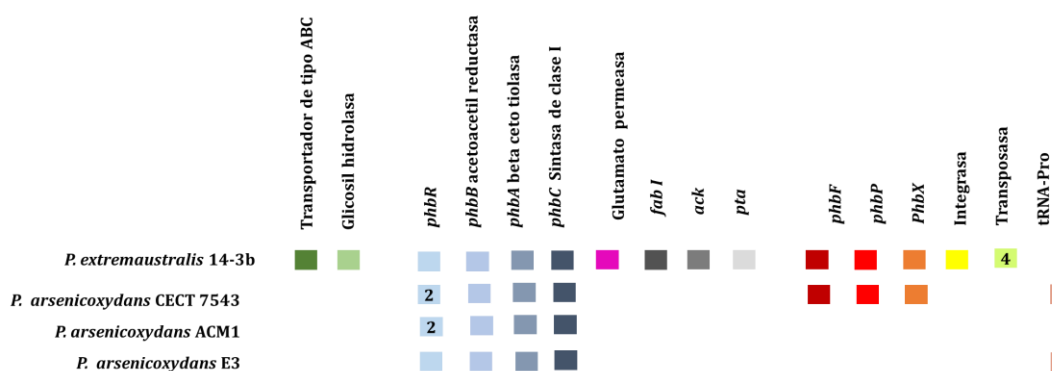


Fig. 4. Comparación del entorno de la sintasa *phbC* responsable de la síntesis de PHB entre *P. arsenicoxydans* y *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

P. pelagia, *P. putida*, *P. caspiana*, *P. brassicacearum*

En *P. pelagia* CL-AP6, se encontraron los dos *clusters* de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*). El entorno es bastante similar al de *P. extremaustralis*, presentando además de los genes vinculados a la síntesis de PHB los genes *fabI*, *ack* y *pta* (Fig. 5). No se detectaron transposasas o integrasas, pero si un tRNA. Llamativamente, *P. pelagia* CL-AP6 es una especie ambiental aislada del alga *Pyramimonas gelidicola* que crece en la Antártida.

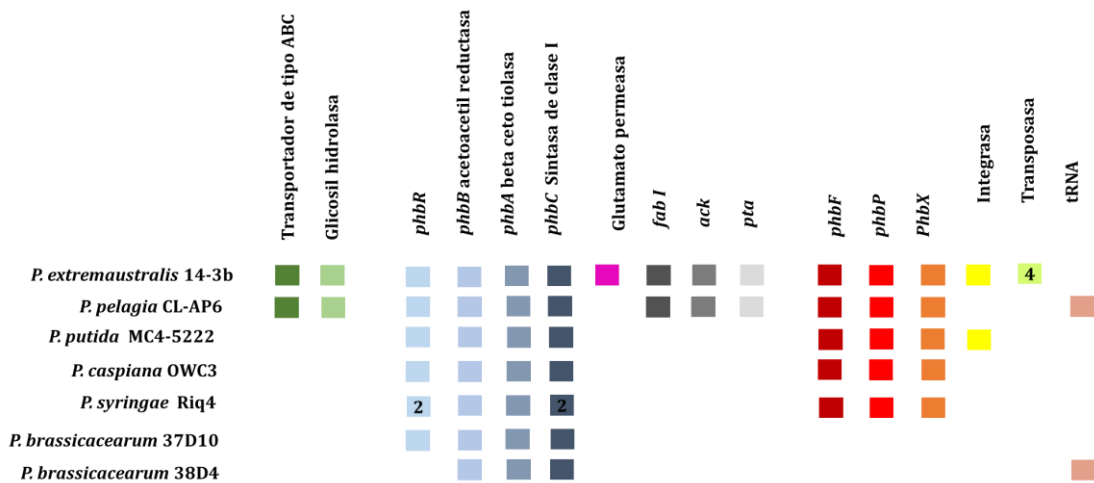


Fig. 5. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de varias especies de *Pseudomonas* con *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

P. putida MC4-5222 presentó los dos *clusters* de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y una integrasa en la región cercana (Fig. 5). Esta cepa fue aislada de suelo.

P. caspiana OWC3, aislada de hielo de la isla Axel Heiberg en Canadá y *P. syringae* Riq4, un aislamiento de suelo, presentaron los dos grupos de genes PHB completos (Fig. 5). En *P. syringae* Riq4, se observó la duplicación de los genes *phbR* y *phbC*.

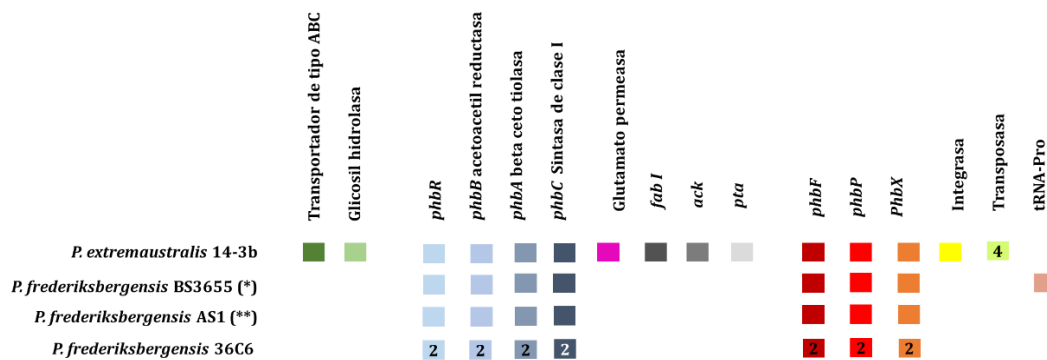
Las cepas de *P. brassicacearum* 37D10 y 38D4, aisladas de suelo de Wyoming, USA, solo mostraron el *cluster phbRBAC* relacionado con el metabolismo de PHB y en la cepa 38D4 no se detectó el *phbR*. Esta cepa también mostró un gen que codifica un tRNA en las cercanías (Fig. 5).

En las cepas pertenecientes a las especies *P. putida*, *P. caspiana*, *P. syringae* y *P. brassicacearum* en las que se encontraron los genes PHB, no se detectaron los genes *fabI*, *ack* y *pta* (Fig. 5).

P. frederiksbergensis

Las 8 cepas de *P. frederiksbergensis* mostraron los dos *clusters* de genes PHB, no así el resto del entorno genético (Fig. 6). Cabe mencionar que *P. frederiksbergensis* 36C6 se destaca por tener los genes involucrados en la síntesis de PHB duplicados (Fig. 6). Solo en la mitad de las cepas fue posible la detección de tRNA (Fig. 6).

En las cepas de esta especie analizadas no se encontraron los genes *fabI*, *ack* y *pta* (Fig. 5). Todos los aislamientos son provenientes de suelo.



(*) *P. frederiksbergensis* 37A10; *P. frederiksbergensis* 39A2; *P. frederiksbergensis* PgKB32

(**) *P. frederiksbergensis* 38F7; *P. frederiksbergensis* 94G2

Fig. 6. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de *P. frederiksbergensis* con *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

P. lini

Las 6 cepas de *P. lini* fueron aisladas de muestras de suelo. Se detecta una gran similitud entre ellas. Todas presentaron los dos *clusters* de genes relacionados con la producción de PHB completos (*phbRBAC* y *phbFPX*). No se detectaron en las cercanías elementos genéticos móviles (Fig. 7), ni tampoco los genes *fabI*, *ack* y *pta*.

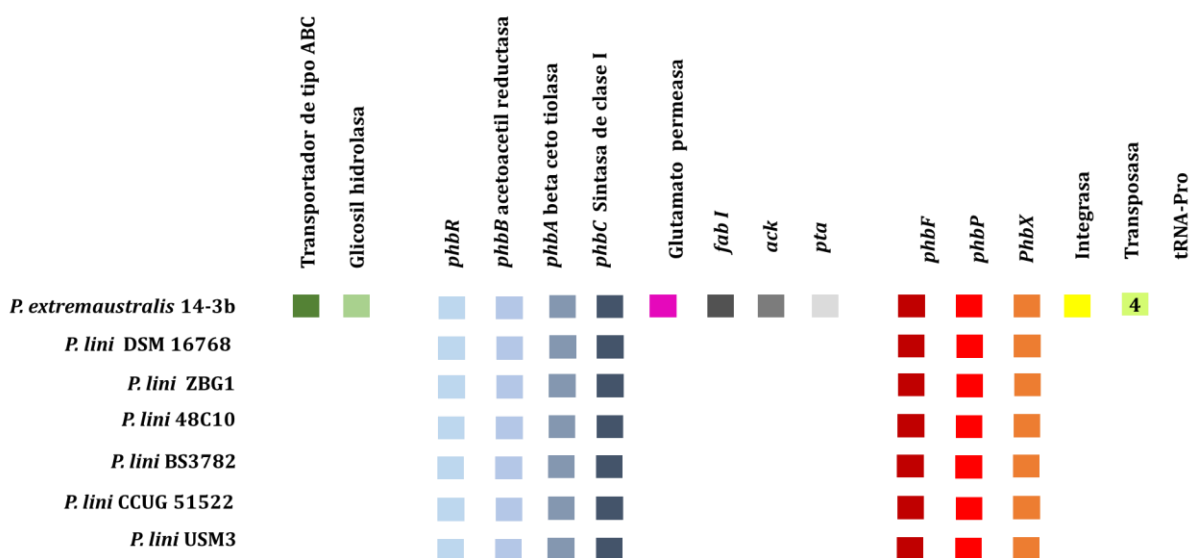
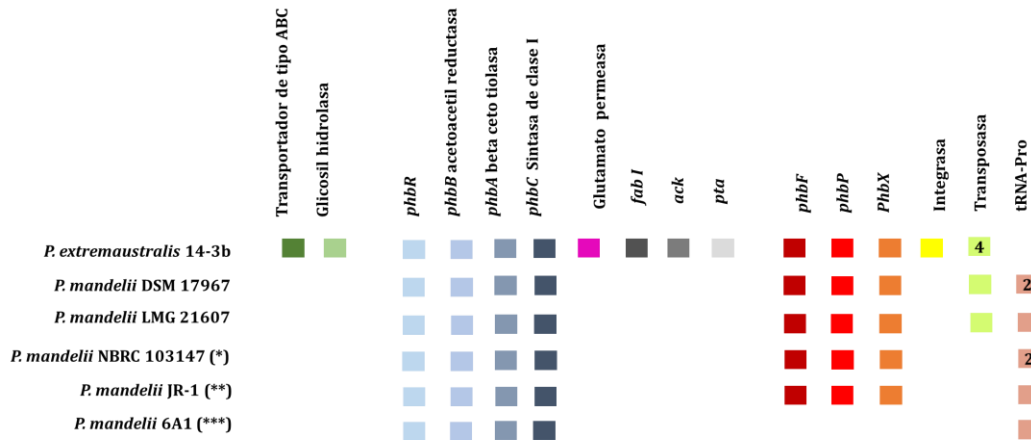


Fig. 7. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de *P. lini* con *P. extremaustralis*14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

P. mandelii

Se hallaron 11 cepas que poseen genes relacionados con la síntesis de PHB, 2 ellas fueron aisladas de agua mineral (JR-1, DSM 17967), 1 en leche (WS 5114), 1 de la isla King George en Antártida (KGI_MA19), 1 fue aislada sobre hielo (OWC5), 1 de sedimentos marinos (6A1), 1 del Potato Research Centre en Canadá (PD30), 1 agua subterránea de pozos cerca de un depósito de desechos radiactivos líquidos (B2/38-

Q-III) y en 3 de ellas no se reporta su procedencia (LMG 21607, NBRC 103147, YF10-2(1) 51), indicando que se encuentran en diversos hábitats.



(*) *P. mandelii* OWC5; *P. mandelii* KGI_MA19; *P. mandelii* WS 5114; *P. mandelii* B2/38-Q-III,

(**) *P. mandelii* PD30, *P. mandelii* YF10-2(1) 51;

(***) *P. mandelii* DSM 17967

Fig. 8. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de *P. mandelii* con *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

Nueve de estas cepas presentaron los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*), y en dos de ellas (DSM17967 y 6A1) no se detectó el cluster *phbFPX* (Fig. 8).

En cuanto a los genes que codifican elementos genéticos móviles, se encontraron transposasas en 2 de las cepas (DSM17967 y LMG 21607) y genes que codifican tRNAs en todas las cepas, encontrándose duplicados en algunas de ellas (Fig. 8). Como se mencionó, los tRNAs suelen encontrarse asociados a islas genómicas. En las cepas de esta especie analizadas no se encontraron los genes *fabI*, *ack* y *pta* (Fig. 8).

P. oleovorans

Las 6 cepas halladas mostraron una gran similitud con *P. extremaustralis* 14-3b en toda la región genómica. Se encontraron los dos clusters de genes PHB completos y el grupo de genes que comprende *fabI*, *ack* y *pta*. Además, se observaron genes que codifican un transportador de tipo ABC, que también se encuentra en las cercanías de los genes PHB en *P. extremaustralis* 14-3b y un gen que codifica una glicosil hidrolasa. También se encontró el gen que codifica la enzima glutamato permeasa en 4 de las cepas (Fig. 9). Se observaron genes que codifican integrasas y transposasas en varias de las cepas (Fig. 9). En cuanto a la fuente de aislamiento, 1 fue aislada de un río (East River isolate A), 4 son de origen desconocido (RS1, NBRC 13583, NCTC10692, DSM 1045) y 1 de un ambiente hospitalario (PO_271).

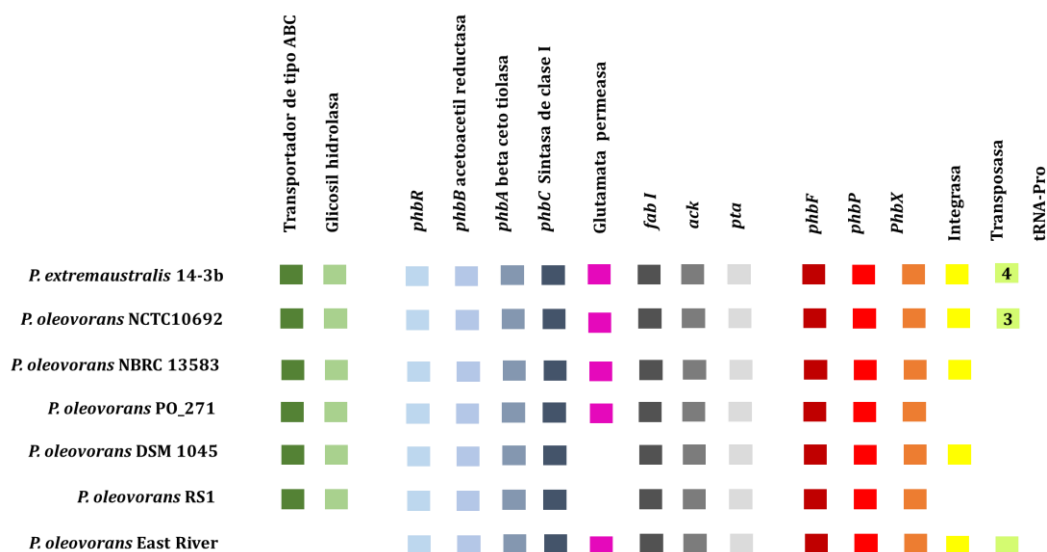


Fig. 9. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de *P. oleovorans* con *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

P. pseudoalcaligenes

Se encontraron en el análisis cinco cepas de *P. pseudoalcaligenes*, la procedencia de los aislamientos es diversa, dos de los cuales no se encontró información, una fue de saliva de mujer, aguas residuales, drenaje sinusal.

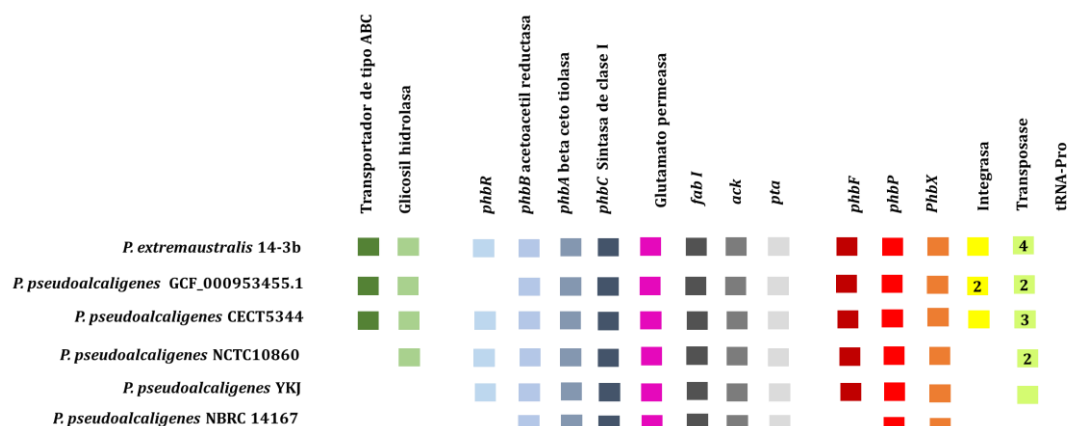


Fig. 10. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de *P. pseudoalcaligenes* con *P. extremaustralis*14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

Al igual que *P. oleovorans*, las 5 cepas de *P. pseudoalcaligenes* mostraron una gran similitud con *P. extremaustralis*. El análisis realizado permitió detectar los dos clusters de genes PHB completos y el grupo de genes que comprende *fabI*, *ack* y *pta*. En la cepa NBRC14167, sin embargo, no se detectaron secuencias homologas a *phbR* y *phbX* (Fig. 10). El regulador *phbR* tampoco se detectó en la cepa GCF_000953455.1 (Fig. 10). Además, se observó el grupo de genes que codifican el transportador de tipo ABC, y un gen que codifica una glicosil hidrolasa en algunas de las cepas. También se encontró el gen que codifica la proteína glutamato permeasa en todas las cepas (Fig. 10). Se observaron genes que codifican integrasas y transposasas en la mayoría de las cepas (Fig. 10). En cuanto a la fuente de las cepas 1 fue obtenida de saliva de mujer (GCF_000953455.1), 1 de un drenaje sinusal (NCTC10860), 1 de

aguas residuales (YKJ), 1 de sedimento de río (CECT5344) y 1 en las que no se reporta su procedencia (NBRC 14167). La cepa CECT5344 fue estudiada por su capacidad de degradar cianuro y producir PHA (Manso Cobos et al., 2015).

P. stutzeri

En la Fig. 10, puede observarse la comparación de *P. stutzeri* frente a *P. extremaustralis* 14-3b, se encontraron 7 cepas que presentaron la sintasa de *phbC* y el análisis del entorno mostro que la mayoría presentó los genes de *phbRBAC* y *phbFPX*. También se observó similitud con el gen que codifica el glutamato permeasa y los genes de *fabI*, *ack* y *pta* (Fig. 11). Se detectaron en casi todas las cepas genes que codifican elementos genéticos móviles como integrasas, transposasas y en algunos casos se detectaron 2, 3 y hasta 5 copias presentes.

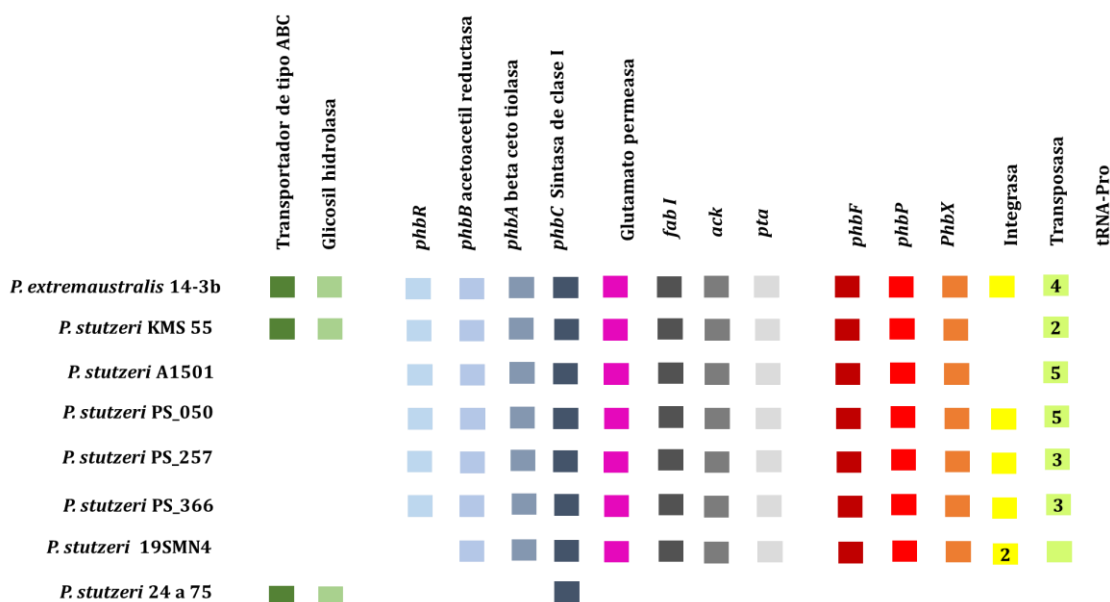


Fig. 11. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de *P. stutzeri* con *P. extremaustralis*14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

La cepa que mostró mayores diferencias fue *P. stutzeri* 24a75 en la que solo se detectó la sintasa *phbC* y secuencias homólogas a la glicosil hidrolasa (CXK94_RS20085) y a la proteína de unión a ATP del transportador ABC (multidrug ABC transporter ATP-binding protein, CXK94_RS20090) (Fig. 11). No se detectaron elementos genéticos móviles (Fig. 11).

Respecto a la naturaleza de los aislamientos en este caso son variados encontrándose en sedimentos marinos (19SMN4), en suelos contaminados con aceite (24a75), en suelo y raíces de cultivos de plantas de arroz como también en ambientes hospitalarios de cuidados intensivos (PS_050; PS_257; PS_366).

P. umsongensis

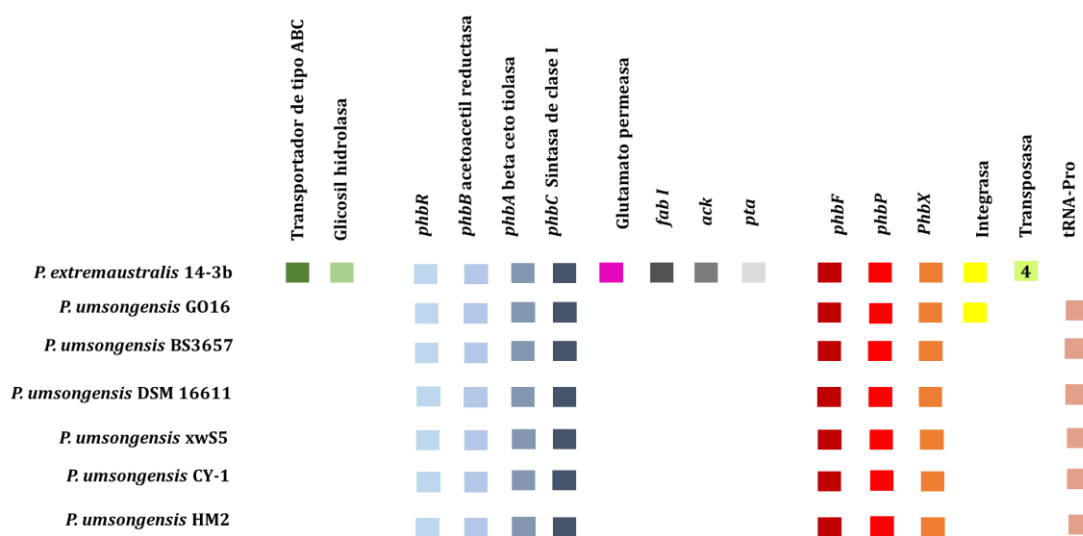


Fig. 12. Comparación del entorno genómico de genes involucrados en metabolismo de PHB de *P. umsongensis* con *P. extremaustralis* 14-3b. Se muestran los dos grupos de genes PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*) y otros genes de las regiones cercanas que codifican distintas funciones. La figura indica presencia o ausencia de genes y no su orientación o la distancia entre cada uno. Los asteriscos indican que en los genomas de varias cepas (que se detallan al pie de la figura) se detectan genes similares. Los números en el interior indican el número de copias del gen.

Se encontraron 6 cepas de *P. umsongensis* que presentaron los dos *clusters* relacionados con las síntesis de PHB (*phbRBAC* y *phbFPX*). El entorno genómico no se encontró conservado (Fig. 12). Sin embargo, en todos los casos fue posible detectar la presencia de tRNAs. Si bien no se reporta para todas las cepas el origen del aislamiento, tres se aislaron de muestras de suelos (GO16, xwS5, HM2). La cepa tipo de esta especie *Pseudomonas umsongensis* 3-10^T (=LMG 21317^T =KACC 10847^T) fue aislada de suelo agrícola de la región de Umsong en Korea (Kwon et al., 2003). Si bien su genoma está secuenciado no se detectaron los genes PHB.

Comparación intraespecífica *P. extremaustralis*

Se analizaron los 15 genomas de *P. extremaustralis* que se encuentran depositados en la base de datos NCBI. La comparación de los mismos en cuanto al tamaño, % de G+C, número de secuencias codificantes (CDS), así como el nivel alcanzado en la secuenciación (contigs, scaffolds o cromosoma) y la fuente de procedencia de cada cepa se detalla en la Tabla 2. En primer lugar, se realizó una comparación para ver la similitud genómica de las distintas cepas calculando el porcentaje de hibridización DNA-DNA *in silico* y la identidad de nucleótidos promedio (ANI). Ambos parámetros constituyen los criterios actualmente utilizados para la definición de especie. Para considerar que una cepa pertenece a la misma especie los valores utilizados son DDH>70% y ANI>96%. El % de hibridización DNA-DNA *in silico* se calculó utilizando la herramienta Genome-to-Genome Distance Calculator (ggdc) (Meier-Kolthoff et al., 2013; Meier-Kolthoff et al., 2022) disponible en la página de la colección alemana de cultivo de microorganismos (DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). La comparación se realizó entre la cepa 14-3b y todas las cepas utilizando la fórmula 2 que es la recomendada por la DSMZ. Se observó que el porcentaje de hibridización DNA-DNA (DDH) superó el 70% para la mayoría de cepas, con excepción de PgKB38 y LMO Bin1 cuyo %DDH fue del 35% (Tabla 2). En concordancia, la identidad de nucleótidos promedio (ANI), fue superior al 98% en las cepas con % DDH>70%, mientras que para PgKB38 y LMO

Bin1 el valor de ANI fue de 89 y 88,94%, respectivamente (Tabla 2). El análisis de los genomas de PgKB38 y LMO Bin1 con la cepa 14-3b o con la especie tipo DSM 17835 mostró que estas cepas no pertenecen a la especie *P. extremaustralis*, dado que tanto el porcentaje de hibridización DNA-DNA como ANI, presentaron valores menores que los establecidos para el criterio de especie, por lo que fueron excluidas del análisis. Por otro lado, los genomas de las 5 cepas (4-aug_S1_019, 2-no_aug_S1_021, 3-JJ_aug_S1_020, 1-no_shock_S1_024 y 5-aug_S3_015) que fueron reconstruidos a partir de metagenomas de digestores anaeróbicos (MAG), no están anotados (Tabla 2), por lo que tampoco fueron analizados.

Tabla. 2. Características de las cepas de *P. extremaustralis*.

<i>P. extremaustralis</i> cepas	Nivel	Tamaño (Mb)	GC%	Acceso	CDS	DDH (%)	ANI (%)	Fecha	Procedencia
14-3 substr. 14-3b	Contig (135)	6,59	60,7	AHIP01	5965	100	99,98	10/1/2012	Charca temporaria Antartida
DSM 17835 ^{T1}	Chromosome (1)	6,67	60,6	LT629689.1	5973	100	100	20/10/2016	Charca temporaria Antartida-DNA de cepa tipo
USBA 515	Scaffold (69)	6,14	60,9	FUYI01	5468	93	99,24	4/3/2017	Suelo de altura (Cordillera de los Andes colombianos)
DSM 17835 ^{T2}	Contig (152)	6,60	60,6	UYXU01	5963	100	99,99	28/1/2019	Cepa tipo-Charca temporaria Antartida
DSM 17835 ^{T3}	Contig (106)	6,60	60,6	VFET01	5954	99,9	99,99	6/8/2019	Cepa tipo-Charca temporaria Antartida
PgKB38	Contig (8)	7,07	60,5	VTFH01	6289	35,4	89,00	24/9/2019	Plántulas de <i>Panax ginseng</i>
LMO Bin1	Scaffold (77)	7,20	60,6	SPUY01	0	35,1	88,94	23/7/2020	Sedimento marino, fosa de Marianas, cultivado alta presión
4-aug_S1_019	Scaffold (133)	6,34	60,8	JALHGP01	0	91,2	99,09	8/4/2022	Digestores anaerobios-MAG
2-no_aug_S1_021	Scaffold (136)	6,43	60,6	JALHEE01	0	91,2	99,08	8/4/2022	Digestores anaerobios-MAG
3-JJ_aug_S1_020	Scaffold (136)	6,41	60,7	JALHFK01	0	91,2	99,07	8/4/2022	Digestores anaerobios-MAG
1-no_shock_S1_024	Scaffold (179)	6,58	60,6	JALHCZ01	0	90,8	99,06	8/4/2022	Digestores anaerobios-MAG
5-aug_S3_015	Scaffold (941)	6,21	60,8	JALHHY01	0	90,5	99,03	8/4/2022	Digestores anaerobios-MAG
2E-UNGS	Chromosome (1)	6,37	60,9	CP091043.1	5666	91,5	99,11	3/8/2022	Sedimentos de río Reconquista, Argentina
CSW01	Scaffold (184)	7,05	60	JAQKGS01	6538	91	99,06	28/1/2023	Lodos activados para degradación de paracetamol-Sevilla
1906	Contig (121)	6,30	60,5	JARIXU01	5709	92,5	99,17	18/3/2023	Estanques de relaves de arenas petrolíferas-Canadá
NQ5	Contig (95)	6,53	60,4	JARBJR01	5908	90,4	98,98	4/4/2023	Biorreactor de membrana

La información de los genomas fue obtenida del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). GC%: guanina más adenina % molar. ANI%: Identidad de nucleótidos promedio (Average nucleotide identity), MAG: Genoma ensamblado de metagenoma. DDH (%): Hibridización DNA-DNA calculado con las herramientas de la página DSMZ, utilizando fórmula 2 (recomendada). CDS: secuencias codificantes. Fecha: liberación para acceso público.

Se analizaron entonces 7 genomas de *P. extremaustralis* en comparación con la cepa 14-3b (DSM 25547) secuenciada en nuestro laboratorio. Existen 3 secuenciaciones realizadas en distintos países de la cepa DSM17835 (DSM 17835-Tipo¹: DOE - JOINT

GENOME INSTITUTE, USA; isolate DSM 17835^{T2}: CEBITEC Universidad de Bielefeld, Alemania y DSM 17835^{T3}: Technische Universitaet Muenchen, Alemania), aislada también en nuestro laboratorio de una charca temporaria de la Antártida y descripta como cepa tipo (López et al., 2009). Por lo que se utilizó la cepa DSM17835^{T1} (Tabla 2) que posee el genoma cerrado para futuros análisis.

Búsqueda de genes PHB

Se compararon los genes de producción de PHAcc y las regiones adyacentes tal como se hizo en la primera parte de este capítulo. Los resultados muestran que dichos genes sólo estuvieron presentes en los aislamientos procedentes de la Antártida (Tabla 3). Se observó un alto grado de conservación entre ambas cepas.

Tabla. 3. Comparación de la región genómica conteniendo los genes PHB entre cepas de *P. extremaustralis*

Gen o Producto génico	14-3b	DSM 17835 ^T
IS1182 transposase		
<i>arcD</i>		
YgdI/YgdR family lipoprotein		
ToIC		
Membrane protein		
Multidrug ABC transporter ATP-binding protein		
glycoside hydrolase family 43 (HylD)		
<i>phbC</i>	PE143B_0105720	BLR63_RS16090
<i>phbA</i>	PE143B_0105725	BLR63_RS16085
<i>phbB</i>	PE143B_0105730	BLR63_RS16080
<i>phbR</i>	PE143B_0105735	BLR63_RS16075
glutamate permease (<i>gltS</i>)		
enoyl-ACP reductase (<i>fabI</i>)		
acetate kinase		
phosphate acetyltransferase		
<i>phbX</i>	PE143B_0105760	BLR63_RS16050
<i>phbP</i>	PE143B_0105765	BLR63_RS16045
<i>phbF</i>	PE143B_0105770	BLR63_RS16040
Proteína hipotética		
Membrane protein		
Integrase		

Se indican los locus_tag que corresponden a los genes relacionados con la biosíntesis de PHB en cada cepa. Todos los genes mostrados son homólogos.

Búsqueda de genes relacionados con la producción de PHAcM

También se analizaron los genes involucrados en la producción de PHAcM en todas las cepas de *P. extremaustralis*. A diferencia de otras bacterias del género *Pseudomonas*, en *P. extremaustralis* el cluster de genes de PHAcM posee la particularidad de estar interrumpido por una inserción de genes relacionados con la producción de fimbrias (Catone et al., 2014). Esta inserción de 7 marcos abiertos de lectura (ORF-Open Reading Frames) se verificó en todas las cepas de *P. extremaustralis* (Tabla 4). Toda la región genómica está altamente conservada y presenta alto grado de sintenia, mostrando alta homología en los genes flanqueantes (Tabla 4). A diferencia de lo observado en relación con los genes PHB en este caso no se observaron secuencias que codifiquen elementos genéticos móviles en la proximidad de estos genes o asociados a los ORF relacionados con fimbrias.

Tabla 4. Organización genética de la región que contiene los genes relacionados con la producción de PHAcM en las distintas cepas de *P. extremaustralis*

Gen o producto génico	14-3b	DSM 17835 ^T	USBA 515	2E-UNGS	CSW01	1906	NQ5
<i>hslU</i>							
Proteína conservada dominio DUF							
<i>phaC1</i>	PE143B_0104515	BLR63_RS20670	B5D64_RS00260	L1A22_12815	PL026_06305	P3C26_25700	PUN49_02785
<i>phaZ</i>	PE143B_0104510	BLR63_RS20675	B5D64_RS00255	L1A22_12820	PL026_06310	P3C26_25695	PUN49_14300
<i>phaC2</i>	PE143B_0104505	BLR63_RS20680	B5D64_RS00250	L1A22_12825	PL026_06315	P3C26_25690	PUN49_14305
<i>phaD</i>	PE143B_0104500	BLR63_RS20685	B5D64_RS00245	L1A22_12830	PL026_06320	P3C26_25685	PUN49_14310
LuxR family transcriptional regulador							
fimbrial protein							
pilus assembly protein							
pilus assembly protein							
O-succinylbenzoate-CoA ligase /fimbrial biogenesis outer membrane usher protein							
fimbrial protein							
pilus assembly protein							
<i>phaF</i>	PE143B_0104460	BLR63_RS20625	B5D64_RS00205	L1A22_12870	PL026_06360	P3C26_25645	PUN49_14350
<i>phal</i>	PE143B_0104455	BLR63_RS20630	B5D64_RS00200	L1A22_12875	PL026_06365	P3C26_25640	PUN49_14355
proteína hipotética (probabl. <i>phal</i>)							
ubiquinone biosynthesis methyltransferase UbiE							

Se indican los locus_tag que corresponden a los genes relacionados con la biosíntesis de PHAcM en cada cepa. Toda la región presentó algo grado de similitud.

DISCUSIÓN

Adquisición de genes PHB por transferencia horizontal genética (THG)

La supervivencia bacteriana en ambientes desfavorables se basa en distintas estrategias y en la posesión de determinadas características para prosperar bajo condiciones de estrés, entre ellas la presencia de genes particulares. Muchos de estos genes pueden haber sido adquiridos a través de eventos de transferencia horizontal genética (THG) (Dobrindt et al., 2004) y se postula que se mantienen en el genoma si confieren alguna ventaja adaptativa al organismo receptor. En los procariotas se conocen al menos tres mecanismos que posibilitan la adquisición de material genético foráneo: transformación, transducción y conjugación, además de diferentes elementos genéticos móviles tales como transposones, integrones e islas genómicas. Como ha sido mencionado anteriormente, la capacidad de acumular PHA ha sido reconocida como una característica que contribuye a la adaptabilidad y la supervivencia bacteriana (Kadouri et al., 2005; López et al., 1995; Ruiz et al., 2001; Ruiz et al., 2004), lo que explicaría su mantenimiento en el genoma del organismo receptor. Varios estudios han puesto en evidencia eventos de THG asociados con genes relacionados con la biosíntesis de PHA en diferentes especies bacterianas (Pettinari et al., 2003, Ayub et al., 2007; Kadouri et al., 2005, Kalia et al., 2007). Estas evidencias incluyen: la observación de elementos genéticos móviles, tales como transposasas, integrasas o secuencias de inserción, en la misma región genómica, la detección de incongruencias entre los árboles filogenéticos basados en el gen que codifica el 16S rRNA en comparación con los árboles basados en secuencias involucradas en la biosíntesis de PHA, la variación en el contenido de G+C de los genes con respecto al resto del genoma, cambios en el uso de codones y la detección de islas genómicas. Por ejemplo, en *Azotobacter* sp. FA8 se detectaron de secuencias de inserción asociadas a los genes reguladores de biosíntesis de PHB (Pettinari et al., 2003). Asimismo, la construcción de árboles filogenéticos basados en secuencias de 16S rRNA versus las de PhaC en *Azotobacter vinelandii* y

Pseudomonas extremaustralis permitieron determinar que estas proteínas se agrupaban en forma anómala, relacionándose con las β -Proteobacteria, sugiriendo que probablemente deriven de *Burkholderiales* (Ayub et al., 2007; Kadouri et al., 2005). La construcción de árboles filogenéticos permitió también proponer la existencia de eventos de transferencia horizontal de genes involucrados en la producción PHAcc en 24 especies bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas (Kalia et al., 2007). En *P. extremaustralis*, se pudo determinar que los genes *phbBAC* responsables de la síntesis de PHB se ubican en una isla genómica y presentan una estructura en mosaico en la cual *phbB* y *phbC* derivaría de *Burkholderiales* mientras que el gen que codifica la tiolasa, *phbA* tiene su origen en *Pseudomonas* (Ayub et al., 2007). El análisis del genoma de *P. extremaustralis* permitió determinar que el grupo de genes *phbFPX* también podría estar relacionado con β -Proteobacterias y fue predicho como perteneciente a una isla genómica (Catone et al., 2014).

La comparación del genoma de varias cepas de una misma especie permite distinguir entre el genoma esencial (o *core*) y el genoma accesorio (o *pool flexible*), formado por elementos adquiridos que no son comunes a todos los integrantes de la especie. La suma del genoma esencial y el accesorio de todas las cepas de una especie constituye el pangenoma que se va incrementando a medida que se secuencian más genomas. Las islas genómicas, pertenecientes al pool genético flexible, codifican funciones que pueden ser útiles para incrementar la supervivencia y adaptabilidad del organismo portador (Hacker y Carniel, 2001). En *P. extremaustralis* los genes *phb* se encuentran en una isla de adaptabilidad, y ha sido demostrado que confieren a este microorganismo la capacidad de resistir múltiples factores de estrés (Ayub et al., 2007, 2009; Tribelli y López 2011). Por otro lado, como se señaló en el capítulo anterior de esta tesis el PHB también fue fundamental para la resistencia a la exposición UVA y para soportar el estrés derivado de los cambios de pH.

La incapacidad de producir PHB en *Pseudomonas* se utilizaba como un rasgo negativo de valor taxonómico (Kessler y Palleroni, 2000). La aparición de algunas especies capaces de producirlo y la gran cantidad de genomas disponibles llevaron a plantear como pregunta de esta tesis si la transferencia horizontal de genes PHB ocurre

frecuentemente en especies de *Pseudomonas* teniendo en cuenta que confieren ventajas adaptativas, basado sobre todo en las evidencias obtenidas del estudio de *P. extremaustralis*. La gran cantidad de genomas de *Pseudomonas* disponibles en bases de datos hizo posible una búsqueda exhaustiva. Los genes PHB fueron hallados en 15 especies bien caracterizadas, además de *P. extremaustralis* y si bien se excluyeron de este análisis, los genes PHB se encontraron también en los genomas de numerosas cepas de *Pseudomonas* aún no caracterizadas a nivel de especie (*Pseudomonas* sp.), lo que significa que los genes están aún más expandidos. La observación de secuencias que codifican elementos genéticos móviles cercanos a los genes PHB en muchas de esas especies sugiere que, al igual a lo observado en *P. extremaustralis*, estos genes podrían haber sido adquiridos por transferencia horizontal y permanecieron en el genoma debido a su capacidad de incrementar la supervivencia.

Los genes PHB se encontraron en varias cepas de *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista humano que se encuentra en el ambiente pero que puede causar infecciones agudas y crónicas y es el mayor agente causal de la morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística (FQ) o inmunocomprometidos (Gellatly y Hancock, 2013; Frimmersdorf et al., 2010). Este hallazgo puede ser de mucha relevancia ya que podría significar que las cepas de *P. aeruginosa* que poseen los genes PHB estarían mejor adaptadas y tendrían mayor resistencia a estrés en comparación con cepas modelo de *P. aeruginosa* como PA01 o PA14, que solo poseen los genes para la biosíntesis de PHAcM. Este hecho adquiere particular importancia dado que podría generar resistencia aumentando el *fitness* de la bacteria en el ambiente hospitalario o del hospedador, lo que podría generar complicaciones en tratamientos. En particular tendrían importancia el aumento de la resistencia a antimicrobianos o los problemas en dispositivos médicos, empeorando el cuadro clínico.

Un escenario similar se daría en *P. syringae*, un patógeno vegetal, en el que la habilidad de producir PHB podría conferir una ventaja para la supervivencia en el ambiente y la colonización, infección y en virulencia en plantas. Esto tendría entonces relevancia agrícola si la cepa en cuestión afecta cultivos de importancia comercial.

Por otra parte, la acumulación de PHB se ha identificado como una propiedad fisiológica clave que favorece la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en *Azospirillum brasilense*, contribuyendo también a la adaptación en la rizosfera y la colonización de raíces (Fibach-Paldi, Burdman y Okon, 2012; Dobbelaere et al., 2001). También se ha demostrado que inoculantes de *Azospirillum* preparados con células en condiciones de acumulación mostraron un aumento en el rendimiento de los cultivos vegetales (Dobbelaere et al., 2001). En este trabajo de tesis, el análisis de los genomas permitió determinar la presencia de genes para la biosíntesis de PHB en varias cepas de *P. fluorescens*. Esta especie y el grupo *P. fluorescens* en general, que comprende varias especies cercanamente relacionadas, alberga cepas que poseen la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Loper et al., 2012; Hol et al., 2013). Si bien la funcionalidad de los genes PHB debería ser probada experimentalmente, esto podría ser de utilidad para la selección de bacterias del grupo *P. fluorescens*, que son normalmente utilizadas como inoculantes en el agro, que posean capacidades mejoradas en cuanto a la supervivencia y colonización de la rizosfera.

Otra cuestión que podría ser relevante para otras aplicaciones es la detección de genes PHB en especies que podrían ser aplicadas en la biorremediación de contaminantes. En el caso de *P. arsenicoxydans*, una bacteria capaz de transformar el arsénico, la adquisición de estos genes por THG podría constituir una característica ventajosa para estas aplicaciones. En muchos casos la presencia del contaminante genera una situación de estrés que la bacteria tiene que enfrentar con maquinaria específica para la decontaminación del compuesto. Otros genes que favorezcan su supervivencia o tolerancia al estrés, como podría ser el caso de los genes PHB, podrían contribuir a mejorar el desempeño del microorganismo haciendo el proceso más eficiente.

Por otro lado, estas bacterias también podrían ser utilizadas para la producción de PHA a partir de residuos contaminantes. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha sido utilizada en un tratamiento biológico de las aguas residuales ricas en cianuro procedentes de la industria de la joyería acoplado a la producción de PHA como subproducto (Manso Cobos et al., 2015). Recientemente, ha sido señalado que *P.*

umsongensis puede degradar el tereftalato de polietileno (PET), un plástico derivado del petróleo y tiene los genes PHB y PHAcM (Narancic et al., 2021). La búsqueda de organismos degradadores de plástico derivado del petróleo ha sido un tema de gran interés en los últimos años, la utilización bacterias productoras de PHA combinando las dos estrategias podría contribuir a solucionar problemas ambientales de relevancia.

Genes PHAcc en *P. extremaustralis*

El análisis de los genomas de todas las cepas disponibles de *P. extremaustralis* mostró, al igual que lo observado para otras especies, que no todas las cepas han adquirido los genes de producción de PHB. El análisis de la procedencia de las distintas cepas mostró la presencia de esta especie en diversos ambientes tales como plantas de tratamiento de efluentes, digestores anaeróbicos, suelo de altura en los Andes, ríos contaminados, etc. Sin embargo, los genes PHB solo fueron encontrados en las cepas procedentes de la Antártida, lo que podría estar relacionado con la adaptabilidad a condiciones de baja temperatura.

Genes PHAcM en *P. extremaustralis*

Resultados previos del laboratorio mostraron que el genoma de *P. extremaustralis* 14-3b posee el grupo de genes PHB adquirido por THG, perteneciente al pool flexible y un grupo completo de genes PHAcM típico de *Pseudomonas* pertenecientes al denominado genoma “core” y que ambos grupos de genes son funcionales (Catone et al., 2014). Por otra parte, como se mencionó los genes de producción de PHAcM poseen la particularidad de estar interrumpidos entre los genes *phaD* y *phaF* por 7 ORF que codifican la producción de fimbrias y que poseen similitud con β - Proteobacterias (Catone et al., 2014). En este trabajo la disponibilidad de varios genomas de *P. extremaustralis* puso en evidencia la presencia de una alta conservación y sintenia y la presencia de la inserción de los 7 ORF relacionados con fimbrias en todas ellas. Esto

indica que esta inserción probablemente surgió más tempranamente en esta especie y que por lo tanto se encuentra más conservada. Es importante señalar que en las otras especies de *Pseudomonas* analizadas no se detectó la presencia de la inserción en los genes de PHAcM. Los genomas de cepas modelo de *P. aeruginosa* PAO1, *P. putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-01, *P. protegens* Pf-5 y *P. syringae* pv. *syringae* B728a poseen el típico cluster de genes PHAcM (*phaC1ZC2DFI*), sin la interrupción detectada en *P. extremaustralis*

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que los genes PHB se encuentran tanto en algunas cepas de *Pseudomonas* tanto ambientales como patógenas oportunistas humanas. En ambos casos la presencia de los genes PHB en su genoma podría otorgar una mayor supervivencia en condiciones extremas dentro de un ambiente inhóspito o poco propicio. Esto podría tener consecuencias sobre las actividades humanas que en un caso serían beneficiosas o favorables y en el otro desfavorables. En el caso de bacterias patógenas esta característica se debería tener en cuenta en el diseño de estrategias para el control de enfermedades, mientras que en las especies ambientales la presencia de genes PHB podría resultar favorable para diferentes aplicaciones tales como la depuración de contaminantes o la promoción de crecimiento vegetal.

CAPÍTULO 3

Análisis proteómico de *P. extremaustralis*14-3b en diferentes condiciones de crecimiento que conducen a la acumulación de polihidroxicanoatos.

OBJETIVOS PLANTEADOS

En este capítulo se trabajó con el objetivo 3 de la tesis doctoral:

- 3. Analizar el proteoma de *P. extremaustralis* en distintas condiciones de cultivo (relación C/N, fase de crecimiento y aireación) para determinar la relevancia en el metabolismo de los distintos tipos de PHA.**

La síntesis de diferentes tipos de PHA depende de las características de las PHA sintetasas que pueden utilizar distintos monómeros, dando una gran diversidad de polímeros que pueden ser producidos. Los monómeros para la biosíntesis pueden provenir de diferentes rutas metabólicas. Se sabe que las condiciones de crecimiento, los sustratos y otros factores influyen la producción de PHA, por lo que su producción depende de la fisiología en su conjunto que determina que vías metabólicas se activan. Las técnicas globales "ómicas", como el análisis proteómico, permiten el estudio de la fisiología bacteriana desde un punto de vista integral.

En este capítulo se analiza el proteoma de *P. extremaustralis* en distintas fases de crecimiento, condiciones de aireación y en medios de cultivo con distinta relación C/N, para evaluar la relevancia de estos factores en el metabolismo de los PHA y determinar también las características del entorno fisiológico que conducen a la producción de los distintos tipos de polímeros.

RESULTADOS

Cuantificación y composición de los monómeros de los diferentes tipos de PHA

El perfil proteómico de *P. extremaustralis* se analizó en distintas condiciones (Tabla 1) que fueron seleccionadas por su influencia en la producción de distintos tipos de PHA. La cuantificación y el análisis de la composición monomérica de los PHA se realizó por cromatografía gaseosa (GC) a partir de las mismas muestras utilizadas para el análisis proteómico.

Tabla.1. Condiciones de cultivo para el análisis proteómico de *P. extremaustralis*

Medio de Cultivo	Fase de Crecimiento	Condiciones de Aireación	Relación C/N
LBO	Estacionaria	Aeróbica	4,5
NEO	Exponencial	Aeróbica	8,5
NEO	Estacionaria	Aeróbica	8,5
NEOm	Estacionaria	Microaerobiosis	8,5

LBO: LB adicionado con octanoato de sodio, NEO: 0.5NE2 adicionado con octanoato de sodio, NEOm: NEO adicionado con octanoato de sodio y KNO₃ en microaerobiosis.

P. extremaustralis acumuló ambos tipos de polímeros, PHB y PHAcM, cuando se añadió octanoato de sodio al medio de cultivo (Fig. 1). La acumulación de PHAcM, compuestos por monómeros C6 y C8, fue menor en todos los medios de cultivo y condiciones analizadas en comparación con la acumulación de PHB (Fig. 1). La producción de PHB fue significativamente mayor en LBO 49,22 % que en cultivos NEO 29,34 % (test de Student, P<0,05). Se observó la tendencia opuesta para los

PHAcM que mostraron una mayor acumulación en medio NEO aeróbico respecto del LBO, tal como se mencionó en el capítulo 1. En condiciones de microaerobiosis (NEO) se observó una fuerte disminución en el contenido de PHB (14,15%) en comparación con las condiciones aeróbicas ($P < 0,05$). También se alcanzó un mayor contenido de PHAcM en NEO (4,71 %) en condiciones aeróbicas, mostrando diferencias significativas con la acumulación en condiciones microaerobias 1,63% ($P < 0,05$). La acumulación en fase exponencial en medio NEO fue mucho menor para ambos tipos de polímeros que para fase estacionaria (datos no mostrados). Los valores obtenidos resultaron similares a los reportados previamente en nuestro laboratorio para cultivos de *P. extremaustralis* de 8 h en medio NEO que correspondieron a $13,60 \pm 1,40$ % de peso seco celular de PHB y $3,40 \pm 0,30$ % de peso seco celular de PHAcM (Catone et al., 2014).

En resumen, las condiciones de aerobiosis generaron mayor acumulación de ambos tipos de polímeros que las de microaerobiosis. El contenido de PHAcM se incrementó al incrementar la relación C/N, mientras que la acumulación de PHB se vio favorecida en LBO con menor relación C/N. Si bien se obtuvieron diferencias significativas en los valores de PHB entre LBO y NEO, en ambos casos la acumulación fue alta lo que indica que la biosíntesis estuvo activa en ambas condiciones, pero el medio LBO favoreció su biosíntesis incrementando el contenido de este polímero.

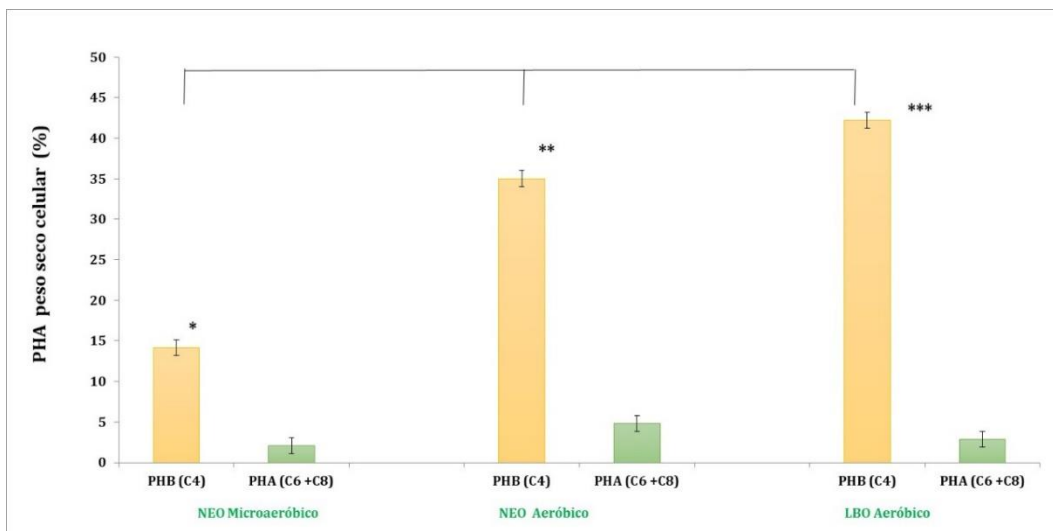


Fig. 1. Medición de PHA por cromatografía gaseosa en *P. extremaustralis* en condiciones de fase estacionaria. Las barras representan media \pm desviación estándar de 3 cultivos independientes.

Análisis comparativo de los perfiles proteicos de *P. extremaustralis* en diversas condiciones de cultivo

En base a los resultados relacionados con la producción de PHA se postula que las proteínas relacionadas con la biosíntesis de los distintos tipos de polímeros se expresarán en forma diferencial en las distintas condiciones de cultivo. Para caracterizar el estado fisiológico que conduce a la producción de PHA, se realizó un análisis proteómico en las diferentes condiciones de crecimiento. En el total de comparaciones realizadas se identificaron alrededor de 1650 proteínas que representan aproximadamente el 28% del total de secuencias que codifican proteínas en el genoma de *P. extremaustralis* 14-3b (total 5921 proteínas predichas según la base de datos NCBI). Las comparaciones se realizaron de a pares entre condiciones para identificar diferencias en los perfiles proteicos relacionadas con tres factores principales: 1. Relación C/N, 2. Fase de crecimiento y 3. Condiciones de aireación. Los datos se analizaron con el *software* Perseus para detectar las proteínas diferencialmente expresadas entre condiciones con sustento estadístico.

Se consideraron como proteínas diferencialmente expresadas en una condición con respecto a la otra todas aquellas que presentaron un cambio en los niveles de expresión de al menos 2 veces (Fold change >2) y un valor estadísticamente significativo ($P < 0,05$). También se incluyeron en el análisis proteínas detectadas en todas las réplicas biológicas de una condición, pero no detectadas en ninguna réplica biológica bajo la otra condición, denominadas como proteínas ON / OFF (Nilsson et al., 2019).

Análisis del proteoma en medio NEO vs. LBO en fase estacionaria de crecimiento y condiciones de aerobiosis

En primer lugar, se analizó el efecto de la relación C/N mediante la comparación entre y el medio NEO con baja concentración de N, que conduce a la acumulación del polímero en *Pseudomonas* (Huisman et al., 1991) y LBO un medio de cultivo con alto contenido de nutrientes adicionado con octanoato de sodio. Los cultivos se desarrollaron en las mismas condiciones de aireación y temperatura durante 24 h que corresponde a la fase estacionaria de crecimiento.

Las proteínas diferencialmente expresadas obtenidas del análisis realizado con el programa Perseus se muestran en las Tablas 1A y 2A del anexo. Se encontraron 115 proteínas que presentaron mayor expresión en NEO con respecto a LBO, representadas en el cuadrante derecho del Volcano Plot (Fig. 2). Además, se detectaron 18 proteínas dentro de las observadas en una sola condición (ON) resultando en un total de 133 proteínas sobre-expresadas en NEO (Tabla 1A del anexo), de las cuales 9,02 % corresponde a proteínas hipotéticas.

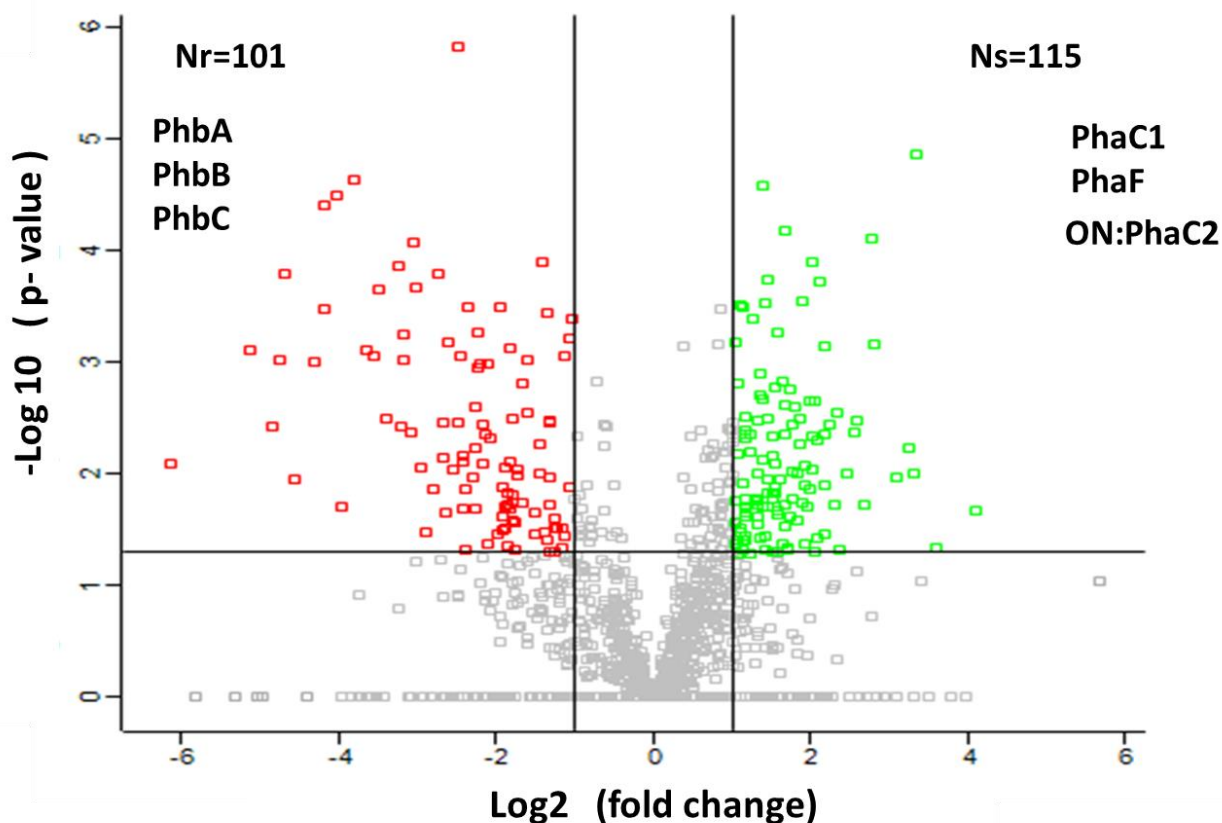


Fig. 2. Volcano Plot. Representa los niveles de expresión de proteínas de *P. extremaustralis* en medio NEO con respecto a LBO en condiciones aeróbicas y fase estacionaria de crecimiento. Ns: número de proteínas sobre-expresadas (verde). Nr: número de proteínas reprimidas (rojo). Cada punto del gráfico representa una proteína. En color gris proteínas sin cambio de expresión.

Entre las proteínas sobre-expresadas se identificó la polimerasa, PhaC1 (A0A023CFE4) con valores de log₂ de veces de cambio de 1,06. Además, se observó que la fasina, PhaF (A0A023CFL9) mostró expresión aumentada (log₂ de veces de cambio=1,16). Ambas proteínas están involucradas en la síntesis de PHAcM. Como el análisis puede interpretarse en los dos sentidos, la sobre-expresión en el medio NEO indica su represión o menor expresión en LBO.

Dentro de las proteínas con mayor expresión en NEO también se encontraron algunas relacionadas con el metabolismo central como las subunidades A y B del piruvato carboxilasa (A0A023C8G1, A0A023C8E2, Tabla 2A), enzimas que participan en reacciones anapleróticas.

El análisis de proteínas ON mostró que la PhaC2 se encuentra expresada en NEO y no expresada en LBO. Este análisis puso también en evidencia el cambio de expresión de algunas proteínas relacionadas con el metabolismo central o que involucran la provisión de sustratos intermediarios para la síntesis de polihidroxicanoatos. Entre ellas, la glucosa-6-fosfato1-deshidrogenasa (A0A023CB80), que es un tipo de oxidorreductasa que forma parte de la vía metabólica de las pentosas fosfato, catalizando la oxidación de glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, la 3-hidroxiacil deshidratasa, FabZ (A0A023CEF5), clasificada dentro de las liasas, interviniendo en la síntesis de ácidos grasos (EC 4.2.1.59) y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [NAD(P)+](A0A023CA93), involucrada en el metabolismo de los glicerofosfolípidos, que forma parte del metabolismo de los lípidos de membrana.

El análisis realizado permitió identificar además 101 proteínas (cuadrante superior izquierdo, Volcano Plot Fig. 2) con expresión disminuida en el medio NEO. Además, se detectaron 9 proteínas ausentes en esta condición (OFF) dando un total de 110 proteínas sobre-expresadas en LBO (Tabla 2A del anexo), de las cuales un 8,18 % corresponde a proteínas no caracterizadas aún (hipotéticas).

Entre las proteínas reprimidas relacionadas con el metabolismo de los PHAcc se detectaron la sintasa PhbC (A0A023CED3) con una razón de cambio $\log_2 = -1,59$, lo que significa una disminución en su expresión de 3,01 veces con respecto a la otra condición, la proteína Acetil-CoA acetiltransferasa o tiolasa PhbA (A0A023CEB7) con un valor \log_2 de veces de cambio igual a -2,14 y otra acetil-CoA acetiltransferasas o tiolasa (AtoB). Estas enzimas condensan 2 moléculas de acetil-CoA dando acetoacetil-CoA. Además, se detectó sobreexpresada en esta condición la acetoacetil-CoA reductasa, PhbB (A0A023CE26) $\log_2 = -1,04$ (Tabla 1A).

También se encontró con expresión disminuida un componente de la enzima piruvato deshidrogenasa (A0A023CB15). Entre las OFF se detectaron dos proteínas (A0A023C1Q2 y A0A023CB79) correspondientes a distintos componentes de la enzima piruvato deshidrogenasa.

Estos análisis apoyan los resultados obtenidos por cromatografía gaseosa donde se observó que el incremento en la relación C/N en los medios de cultivo, favorece la producción de PHAcM. Los resultados también muestran que en LBO se favorece la síntesis de PHB. Con respecto a las vías metabólicas centrales la disminución de varios componentes de la enzima piruvato deshidrogenasa sugieren que la síntesis de acetil-CoA necesaria para la síntesis de PHB estaría desfavorecida en medio NEO lo que indica que estaría aumentada en LBO.

Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas

Las proteínas que presentaron expresión diferencial se analizaron con el *software* Panther (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships). Este análisis se basa en la denominada ontología génica (en inglés *Gene Ontology* cuya sigla es *GO*) y fue diseñado para clasificar las proteínas (y genes) en cualquier organismo. Esta clasificación se basa en conceptos clave en biología molecular, como son la función molecular de los productos génicos, su rol en los procesos biológicos y los tipos de proteínas. La clasificación por categorías se basó en *P. aeruginosa*, por ser una de las especies más estudiadas, justamente está también incluida en la mayoría de los programas para realizar este tipo de análisis. *P. extremaustralis* presenta algunas características diferenciales con respecto a *P. aeruginosa*, por lo que el análisis en algunos casos no permite incluir todas las secuencias, por este motivo posteriormente se realizó una clasificación manual. En todos los casos se filtraron mediante una función del programa las proteínas a las que no se les pudo asignar una función dentro de cada uno de los grupos analizados. Si bien las categorías obtenidas del análisis son muy amplias, permitieron obtener una primera aproximación y el panorama general de las funciones de interés para ordenar los resultados obtenidos.

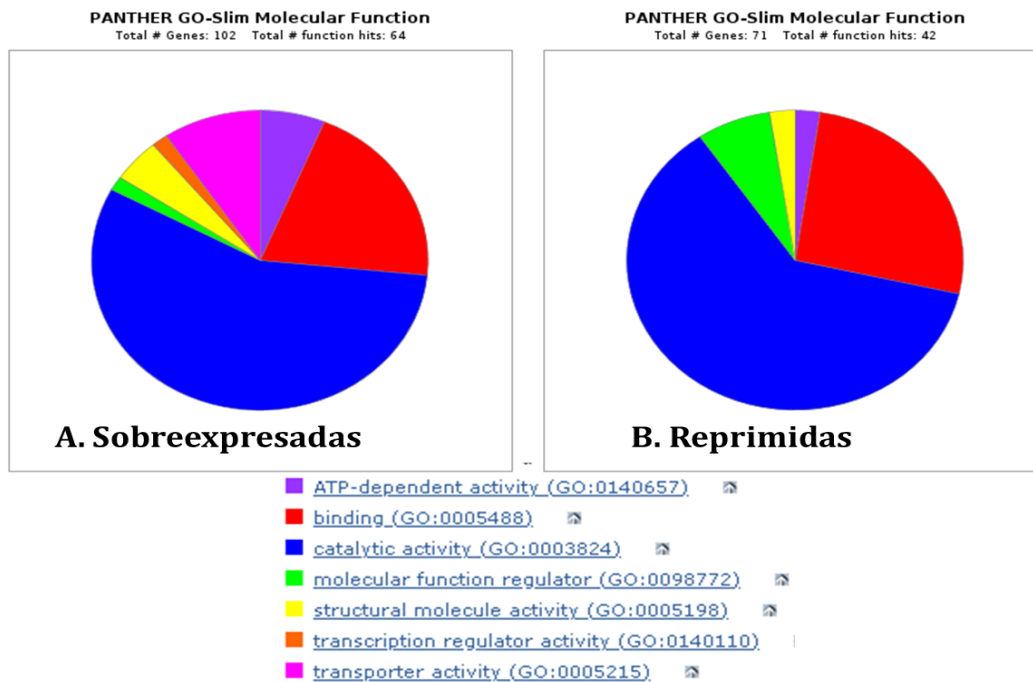


Fig. 3. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO vs. LBO en fase estacionaria de *P. extremaustralis* por función molecular. A. Sobre-expresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther.

En el análisis por Función molecular (Fig. 3) se observó que la categoría que agrupó un mayor número de proteínas correspondió a actividad catalítica (*catalytic activity*) representando un 58,9 % entre aquellas proteínas con expresión aumentada en NEO y 61,9% entre las con expresión disminuida. La siguiente categoría con mayor representación correspondió a proteínas de unión a DNA (*binding*) tanto entre las sobre-expresadas como entre las reprimidas (Fig. 3). Es interesante mencionar que entre con expresión aumentada se encontró la categoría que involucra transporte (*transporter activity*) sugiriendo la mayor activación de sistemas relacionados con la captación de nutrientes en el medio que posee mayor desbalance C/N.

La clasificación por procesos biológicos (*biological process*) realizada mostró que la mayor cantidad de proteínas se pudieron clasificar en las categorías procesos celulares (*cellular process*) y procesos metabólicos (*metabolic process*) representando el 44,8% para ambas categorías entre las sobre-expresadas y 46% y

44%, respectivamente, entre las reprimidas (Fig. 4). Se observó también que la categoría localización se encontró presente solo entre las sobre-expresadas incluyendo el citocromo c oxidasa, ubicado en la membrana celular y entre las reprimidas la categoría respuesta a estímulos que incluye por ejemplo la catalasa.

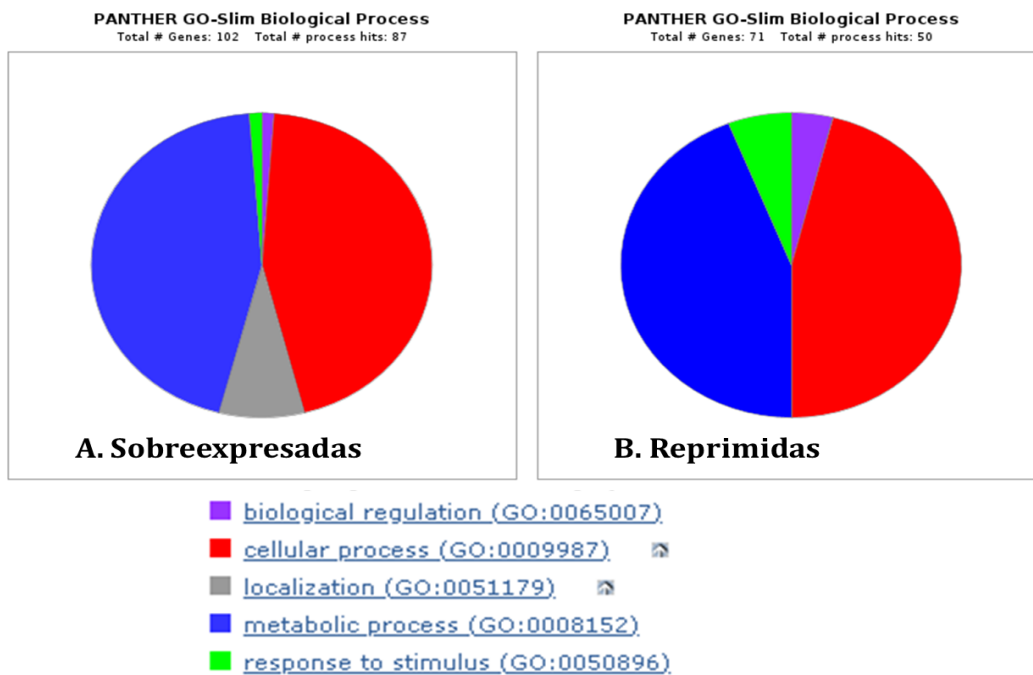


Fig. 4. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO vs. LBO de *P. extremaustralis* por procesos biológicos. A. Sobre-expresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther.

El tercer análisis corresponde a la clasificación de tipos de proteínas representadas dentro de las diferencialmente expresadas en medio NEO.

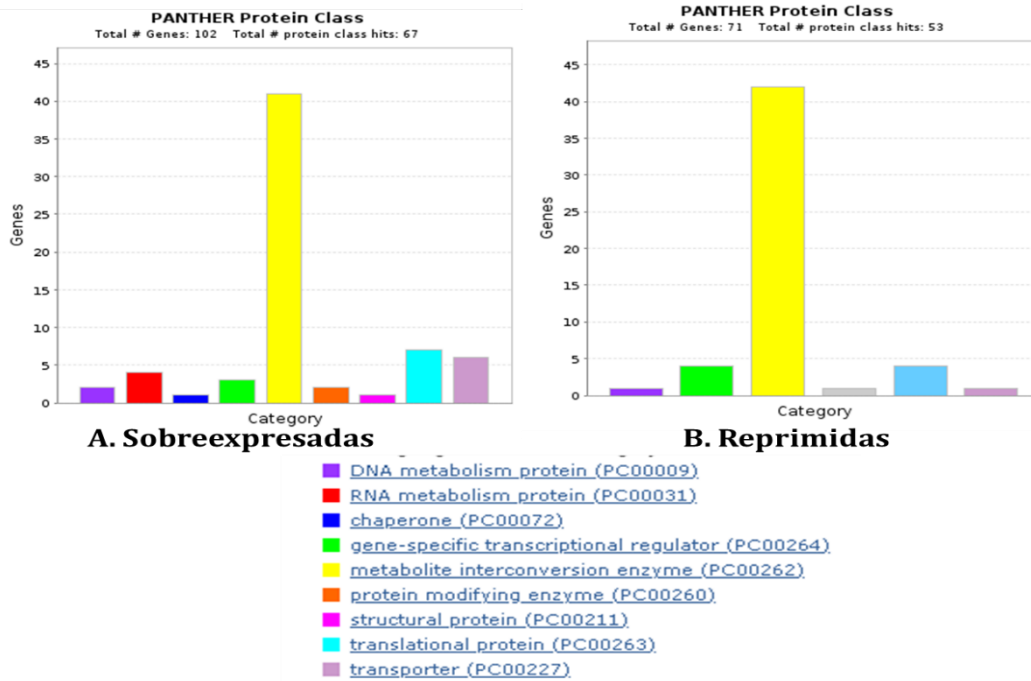


Fig. 5. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO vs. LBO de *P. extremaustralis* por clase de proteína. A. Sobre-expresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos obtenidos de Panther DB.

La categoría con mayor representación correspondió a enzimas que participan en la interconversión de metabolitos (*metabolite interconversion enzyme*) tanto entre las con expresión aumentada como entre las disminuidas en NEO (Fig. 5). Se observó un mayor número de categorías entre las sobre-expresadas y nuevamente mayor representación de proteínas involucradas en transporte y chaperonas (Fig. 5).

Análisis del proteoma en medio NEO en fase estacionaria y exponencial de crecimiento y condiciones de aerobiosis

En segundo lugar, se analizaron las diferencias en la expresión de proteínas utilizando el medio de cultivo NEO en diferentes etapas de crecimiento, la fase estacionaria (NEO-est.) en comparación con fase exponencial (NEO-exp.). Como se mencionó en Materiales y Métodos, los cultivos en fase exponencial se cosecharon aproximadamente a las 7 h de crecimiento y alcanzaron una $DO_{600nm} = 0,5-0,6$. Los cultivos en fase estacionaria (24 h) presentaron valores de DO_{600nm} comprendidos entre 4 y 4,5 para las 3 réplicas analizadas.

En la Fig. 6 se puede observar el análisis de proteínas diferencialmente expresadas entre condiciones. Se hallaron 109 proteínas que estuvieron sobre-expresadas en fase estacionaria en comparación con exponencial. Además, se identificaron 110 proteínas ON dando un total de 219 proteínas con expresión aumentada en fase estacionaria en relación a la fase exponencial, de las cuales el 7,80 % correspondieron a proteínas hipotéticas (Tabla 3A del anexo). Entre las proteínas sobre-expresadas se encontraron proteínas asociadas a la biosíntesis de ambos tipos de polímeros (PHAcc y PHAcM) que incluyeron la polihidroxicanoato sintasa, PhbC, las fasinias, PhbP y PhaF, también la Acetil-CoA acetiltransferasa (A0A023CEB7), 3-cetoacil-ACP reductasa /acetoacetyl CoA reductasa (A0A023CE26), 3-cetoacil-CoA tiolasa y Enoil-CoA hidratasa que participa en la β oxidación de ácidos grasos (Fig. 6; Tabla 3A del anexo).

También encontramos dentro de los genes asociados con la síntesis de PHB, el gen que codifica PhbX, denominada así en *P. extremaustralis* porque aún se desconoce su función (Catone et al., 2014). En otras bacterias este gen está anotado como polimerasa o depolimerasa. También se encontraron 3 proteínas codificadas por genes conservados (mencionados en el capítulo 2, ubicados en la misma región genómica que *phbX*): *pta* que codifica la enzima fosfato acetiltransferasa (EC 2.3.1.8), el gen *ackA*, que codifica un acetato quinasa y finalmente un gen que codifica la enoil-ACP reductasa [NADH] (EC 1.3.1.9), involucrada en la biosíntesis de ácidos

grasos FAS II. La fosfato acetil transferasa y la enoil ACP reductasa estuvieron sobre-expresadas en fase estacionaria (Tabla 3A del anexo). También se encontraron entre las proteínas ON la PhaC1 y PhaC2 (Fig. 6; Tabla 3 del anexo),

Por otra parte, se determinaron 104 proteínas con expresión disminuida en NEO-est. con respecto a exponencial (Tabla 4A del anexo) y 2 proteínas OFF, dando un total de 106 proteínas. De éstas, sólo el 2,83% de proteínas se encontraron entre las hipotéticas. Entre las proteínas con expresión disminuida se encuentran numerosas proteínas ribosomales indicando la menor actividad de síntesis de proteínas en fase estacionaria (Tabla 4A).

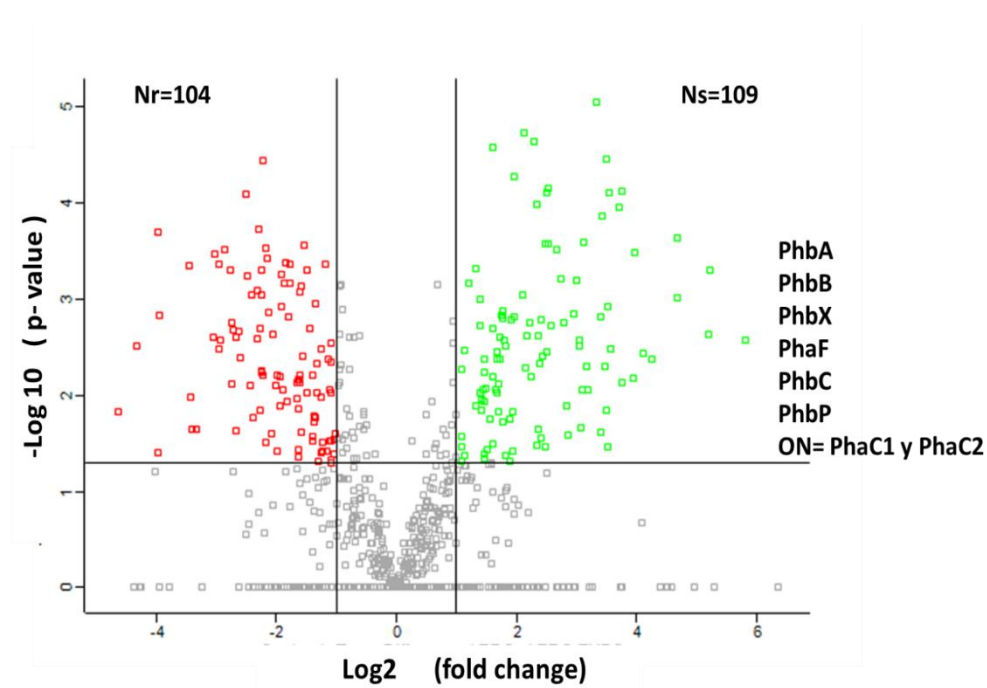


Fig. 6. Volcano Plot. Representa los niveles de expresión de proteínas de *P. extremaustralis* en medio NEOest. con respecto a NEOexp. en condiciones aeróbicas. Ns: número de proteínas sobre-expresadas (verde). Nr: número de proteínas reprimidas (rojo). Cada punto del gráfico representa una proteína. En color gris proteínas sin cambio de expresión.

Los datos obtenidos fueron consistentes con estudios previos de producción del polímero que señalan que la síntesis de los polihidroxialcanoatos no ocurre en etapas tempranas de crecimiento, por lo cual se detectó mayor abundancia de proteínas relacionadas a la síntesis de ambos tipos de PHA en fase estacionaria (NEO-est.).

Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEOest. vs. NEOexp.

Como en la condición anterior, se analizaron las proteínas diferencialmente expresadas (aumentadas y disminuidas con respecto a fase exponencial).

Por función molecular las proteínas fueron clasificadas en 7 categorías, la más representada entre las detectadas con expresión aumentada correspondió a actividad catalítica (*catalytic activity*) con el 71%, seguida por proteínas de unión (*binding*) con un 18,8% (Fig. 7). Entre las proteínas con expresión disminuida la categoría más representada correspondió a la denominada actividad estructural de las moléculas (*structural molecule activity*) con el 38,6 % que incluye proteínas ribosomales tanto relacionadas con la subunidad 30S como 50S, tales codificadas por los genes *rplB*, *rplC*, *rplN*, *rplS*, *rpsB*, *rpsG*, entre otras (Fig. 7). Siguieron en importancia proteínas de unión (*binding*) con el 30,1 % y finalmente las de actividad catalítica (*catalytic activity*) con el 19,3 % (Fig. 7).

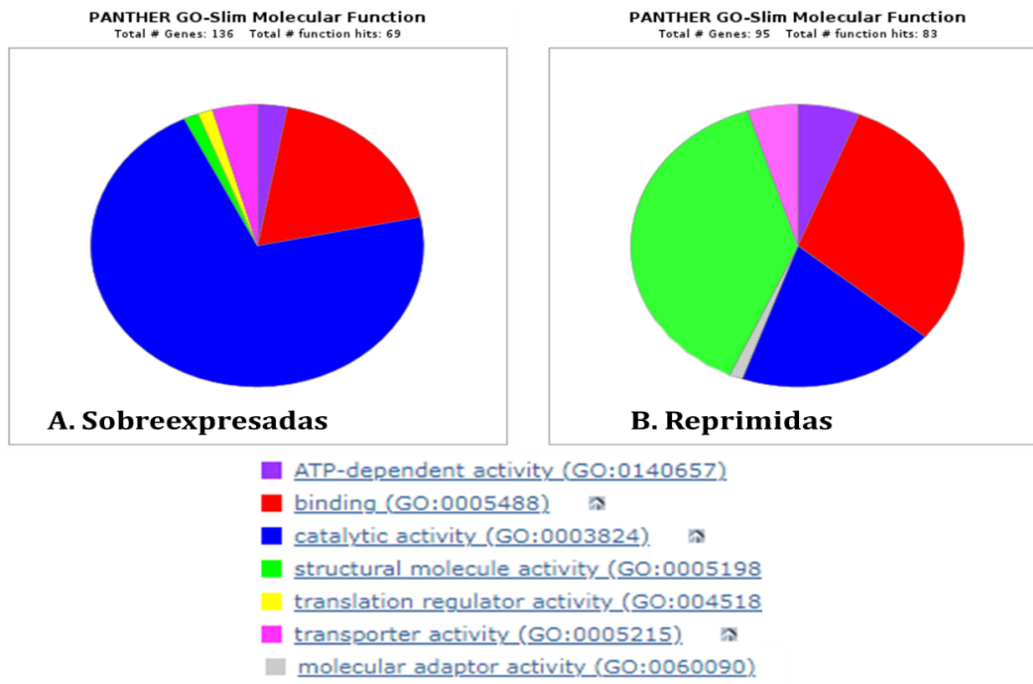


Fig. 7. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO en fase estacionaria vs. exponencial de *P. extremaustralis*. Función Molecular de proteínas. A. Sobreexpresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther.

El mismo análisis se realizó para los procesos biológicos que comprendió 5 categorías. Las proteínas que mostraron sobre-expresión para el medio NEO-est, se agruparon con igual proporción en procesos celulares y metabólicos (44,7%) agrupando muchas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos como glutamato, arginina y triptófano.

En el caso de las proteínas con expresión disminuida la categoría que comprendió los procesos celulares (*cellular process*) agrupó el mayor número con un 50% e incluyó por ejemplo muchas proteínas ribosomales, la subunidad A de la girasa y chaperonas como DnaJ y GroS, entre otras. Siguió en importancia la categoría procesos metabólicos (*metabolic process*) con el 35,3% agrupando también varias proteínas ribosomales (Fig. 8). En esta condición también se observó una mayor proporción de proteínas con una localización particular como citocromos o proteínas de membrana externa.

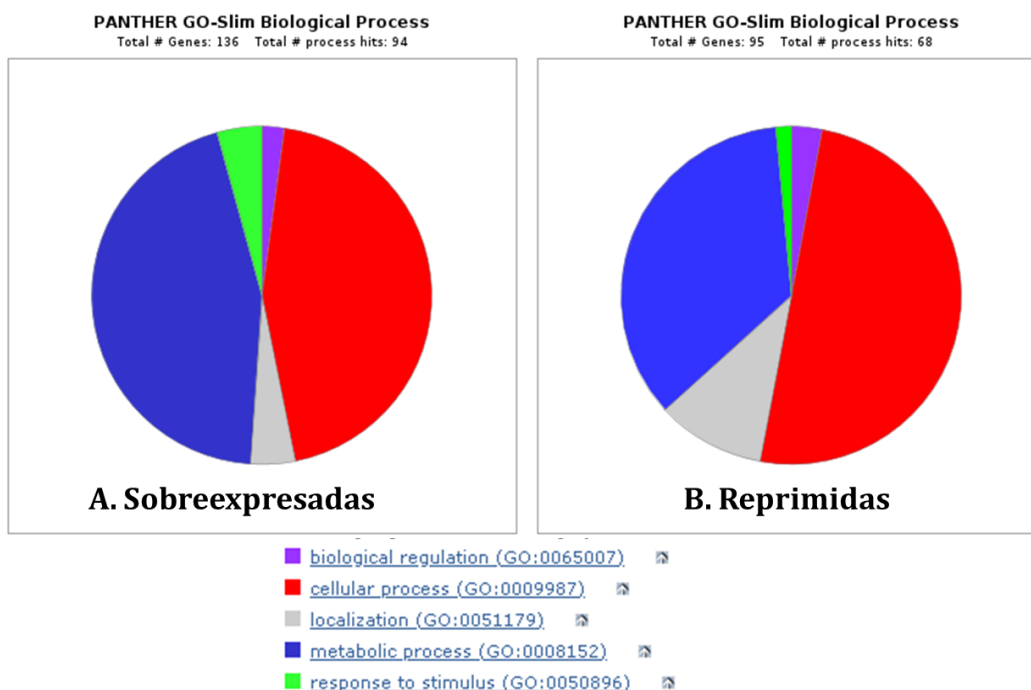


Fig. 8. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO en fase estacionaria vs. exponencial de *P. extremaustralis*. Procesos Biológicos en el que participan las proteínas. A. Sobre-expresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther

El análisis del tipo de proteínas presentes en NEO en fase estacionaria mostró 8 categorías entre las con expresión aumentada y 9 entre las con expresión disminuida en fase estacionaria. Entre las proteínas sobre-expresadas la categoría que agrupó un mayor número fue la relacionada con la transformación de metabolitos (*metabolite interconversion enzyme*) (Fig. 9). Entre las reprimidas o con menor expresión en medio NEO-est. estuvieron aquellas vinculadas a la traducción (*translational protein*) indicando que la síntesis de proteínas es más activa en fase exponencial, luego le siguió la categoría *metabolite interconversion enzyme* (Fig. 9). También se observó en esta comparación la categoría que agrupa las proteínas con función chaperona (Fig. 9).

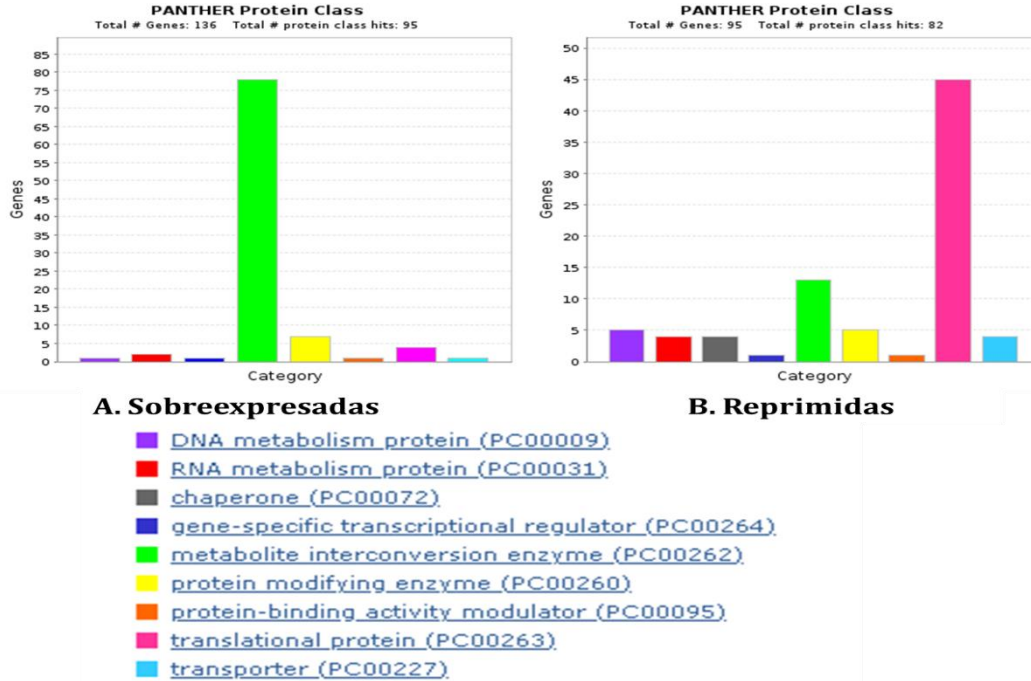


Fig. 9. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO en fase estacionaria vs. exponencial de *P. extremaustralis*. Clase de proteínas. A. Sobre-expresadas, B. Reprimadas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther.

Análisis del proteoma en medio NEO en aerobiosis y microaerobiosis (NEOA vs NEOM) en fase estacionaria

A fin de determinar el efecto de la aireación sobre la expresión de proteínas en medio NEO se compararon los perfiles proteicos en condiciones de aerobiosis, que fueron logradas como se describió en materiales y métodos, variando la relación medio de cultivo/volumen del recipiente y agitación en cultivos aeróbicos y microaeróbicos.

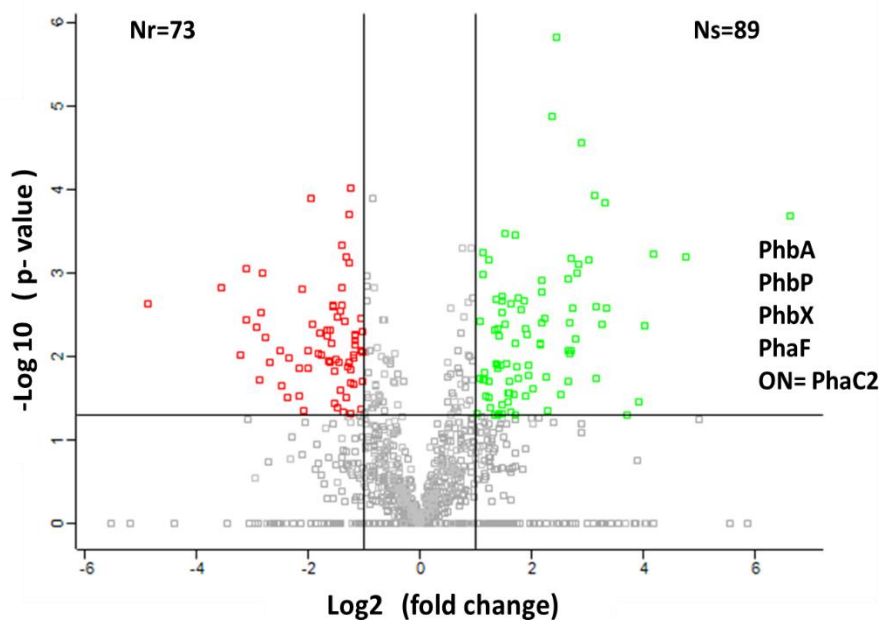


Fig. 10. Volcano Plot. Representa los niveles de expresión de proteínas de *P. extremaustralis* en medio NEO en condiciones de aerobiosis vs. microaerobiosis. Ns: número de proteínas sobre-expresadas (verde). Nr: número de proteínas reprimidas (rojo). Cada punto del gráfico representa una proteína. En color gris proteínas sin cambio de expresión.

Se observa en la Fig. 10 del Volcano Plot la distribución de proteínas de acuerdo a su expresión. En el cuadrante superior derecho superior se detectaron 89 proteínas, las que se encuentran en mayor abundancia en aerobiosis (NEOA) con respecto a microaerobiosis (NEOM). También se detectaron 31 proteínas ON dando un total de 120 proteínas totales con expresión aumentada en aerobiosis. De ellas el 10,83 % correspondió a proteínas hipotéticas (Fig. 10, Tabla 5A del anexo). Dentro del set de datos de proteínas que presentaron un mayor nivel de expresión, se encontraron a la sintasa PhbX \log_2 de veces de cambio= 1,37 (A0A023CE49), la fasina PhbP (A0A023CE85) \log_2 de veces de cambio= 2,17 de PHAcc como también a la fasina (proteína asociada al gránulo) PhaF (A0A023CFL9) \log_2 de veces de cambio= 2,20, la tiolasa PhbA y la Enoil-ACP [acil-carrier-proteína] reductasa (A0A023CED8) \log_2 de veces de cambio= 1,42. Entre las proteínas ON se encontró a la enzima sintasa PhaC2 (A0A023CFQ0), sintasa que interviene en la síntesis de PHAccm y una 3-

cetoacil-ACP reductasa que puede proveer intermediarios para la biosíntesis (Tabla 5A).

En el cuadrante izquierdo superior se ubicaron 73 proteínas con nivel de expresión significativamente menor. Se hallaron también 4 proteínas OFF dando un total de 77 proteínas con menor expresión en aerobiosis, donde el 2,6% (solo 2 proteínas) correspondieron a proteínas hipotéticas (Fig. 10, Tabla 6A del anexo). Entre las con expresión disminuida se encontró el regulador de crecimiento anaeróbico Anr indicando su activación en microaerobiosis (Tabla 6 del anexo). Entre las proteínas OFF se encontraron una ornitina monooxigenasa (A0A023C8A9) y una péptido sintasa (A0A023C6H5) que también se observaron cómo OFF cuando NEOest fue comparada con exponencial indicando que esas proteínas presentan expresión disminuida cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria en condiciones aeróbicas tanto al comparar con fase exponencial como con microaerobiosis.

Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas

Los análisis para este conjunto de datos utilizando Phanter, por función molecular permitió caracterizar a las proteínas con expresión aumentada en NEOA vs. NEOM en 3 niveles. Las proteínas con actividad catalítica fueron mayoritarias representando el 72,7 % (Fig. 11). Las proteínas con expresión disminuida fueron agrupadas 7 categorías y se encontraron mayoritariamente representadas proteínas categorizadas en actividad molecular estructural (Structural Molecule Activity) con un 42,2 %. Otras funciones representadas fueron las proteínas de unión (Binding) y con actividad catalítica (Catalytic Activity) con el 32,8 % y 17,2%, respectivamente (Fig. 11).

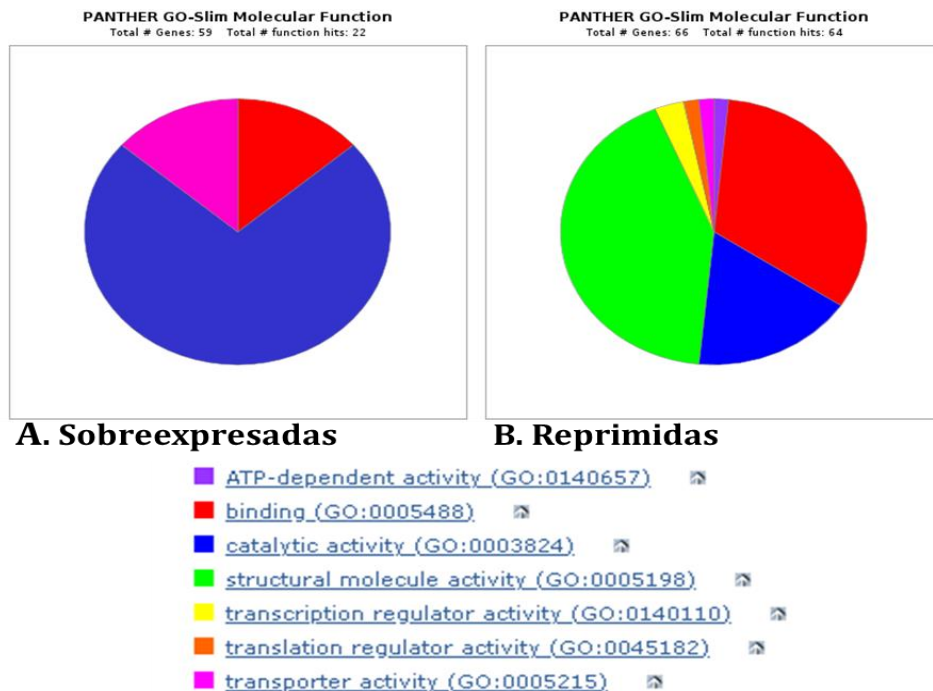


Fig. 11. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO en condiciones aeróbicas vs. NEO en condiciones microaeróbicas de *P. extremaustralis*. Función Molecular de proteínas. A. Sobre-expresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther.

El siguiente análisis se realizó para Procesos Biológicos donde las proteínas sobre-expresadas fueron categorizadas en 3 grupos. Los mayores porcentajes correspondieron a procesos metabólicos (*metabolic process*) y procesos celulares (*cellular process*) ambos con el 44,4% (Fig. 12). Entre las reprimidas las proteínas se categorizaron en 4 niveles. El porcentaje mayor fue para procesos celulares (*cellular process*) con un 50,9%, luego procesos metabólicos (*metabolic process*) con un 39,6% (Fig. 12).

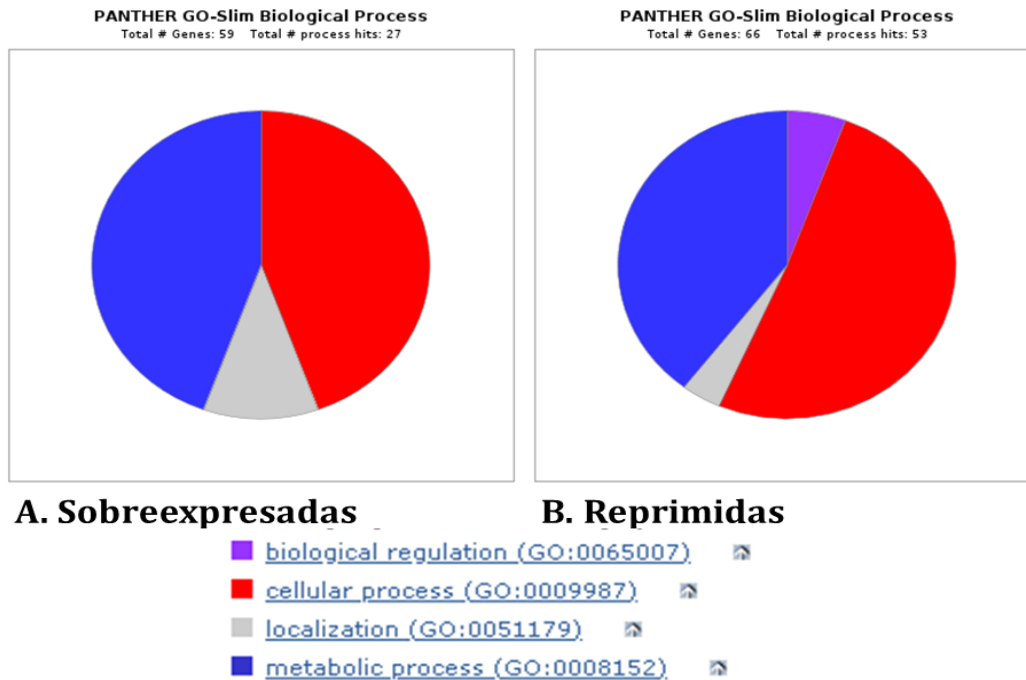


Fig. 12. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO en condiciones aeróbicas de *P. extremaustralis*. Procesos Biológicos. A. Sobre-expresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther.

El siguiente análisis correspondiente a clases de proteínas entre las sobre-expresadas en medio NEO aeróbico encontró un mayor porcentaje de proteínas categorizadas en conversión de metabolitos (*metabolite interconversion enzyme*), le siguen en importancia las proteínas relacionadas con el transporte con mucha menor proporción (Fig. 13). Entre las proteínas reprimidas se identificó un mayor número de categorías (8), siendo las más representadas las relacionadas con la traducción (*translational*), seguidas por proteínas del tipo de conversión de metalitos (*metabolite interconvrersion enzyme*) y luego otras categorías con un porcentaje mucho menor (Fig. 13).

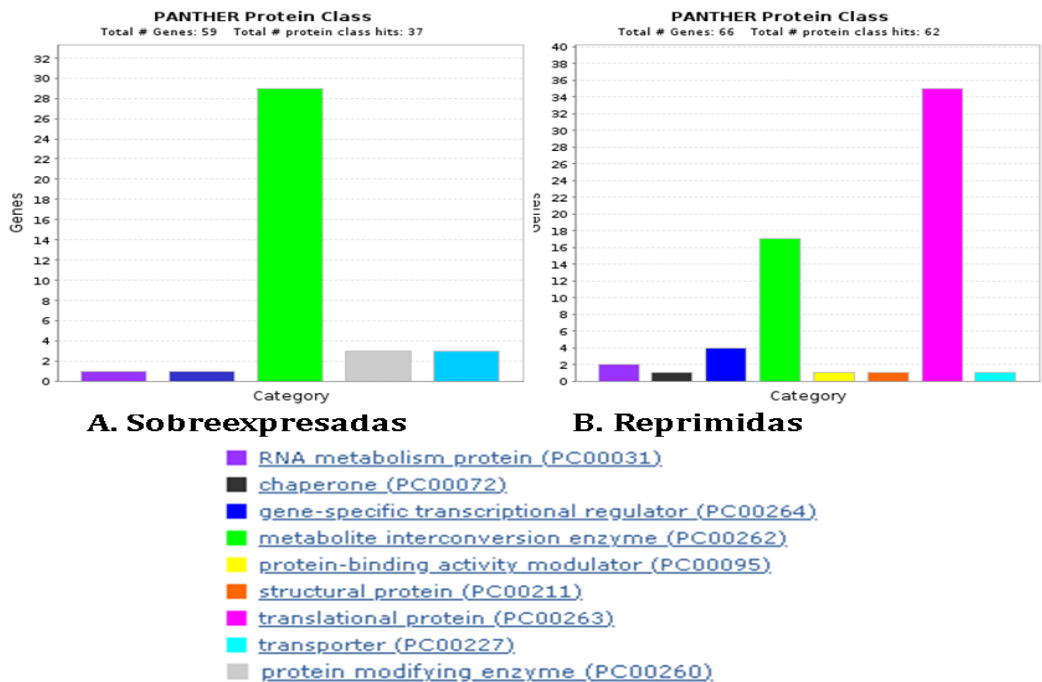


Fig. 13. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en NEO en condiciones aeróbicas vs. microaeróbicas de *P. extremaustralis*. Clase de proteína. A. Sobreexpresadas, B. Reprimidas. Referencias de las categorías y términos GO obtenidos de Panther.

Expresión de genes relacionados con la producción de PHAcc y PHAcM en todas las condiciones analizadas

El análisis de los resultados en conjunto permitió visualizar la expresión de proteínas relacionadas con la biosíntesis de ambos tipos de PHA en las distintas condiciones analizadas en *P. extremaustralis* (Fig. 14).

Con respecto a las enzimas involucradas en la producción de PHAcc se observa que todas las enzimas estuvieron presentes en todas las condiciones con excepción de la fasina PhbF una proteína regulatoria asociada al gránulo. Las proteínas relacionadas directamente con la biosíntesis PhbA, PhbB y PhbC estuvieron reprimidas en NEO con respecto a LBO, indicando que se expresan más en este último lo que explicaría la coincidencia con la mayor producción de PHB observada (Fig. 1). En las otras dos condiciones se observa que varias proteínas estuvieron sobreexpresadas tanto con

respecto a fase exponencial como con respecto a microaerobiosis. El regulador transcripcional PhbR fue detectado sin cambio entre condiciones (Fig. 14).

Tipos de PHA	Proteínas	NEO. vs. LBO	NEOest. vs. NEOexp.	NEOA vs. NEOM
PHAcc	PhbR	Blue	Blue	Blue
	PhbB	Red	Green	Blue
	PhbA	Red	Green	Green
	PhbC	Red	Green	Blue
	PhbF	Yellow	Yellow	Yellow
	PhbP	Blue	Green	Green
	PhbX	Blue	Green	Green
PHAcM	PhaC1	Green	Green	Blue
	PhaZ	Yellow	Yellow	Yellow
	PhaC2	Green	Green	Green
	PhaD	Yellow	Yellow	Yellow
	PhaF	Green	Green	Green
	PhaI	Yellow	Yellow	Yellow
	PhaJ1	Blue	Green	Blue
	PhaJ2	Red	Green	Blue
	PhaJ3	Blue	Blue	Blue
	PhaJ4	Green	Blue	Blue
	PhaG	Yellow	Yellow	Yellow

Fig. 14. Expresión de las proteínas relacionadas con la biosíntesis de PHAcc y PHAcM en todas las condiciones analizadas. Rojo: Reprimida; Amarillo: no detectada; Verde: Sobre-expresada; Azul: detectada sin diferencias significativas.

Las proteínas involucradas en la producción de PHAcM PhaC1, PhaC2 y la fasinina PhaF, mostraron expresión aumentada en las 3 comparaciones en NEO en fase estacionaria y aerobiosis con excepción de la PhaC1 en la cual la condición de microaerobiosis no pareció afectar la expresión que fue similar que en condiciones aeróbicas (Fig. 14).

El análisis *in silico* del genoma de *P. extremaustralis* permitió predecir 4 genes candidatos con probable función (R)-enol-CoA hidratasa codificadas por *phaj*

(Catone 2013). El análisis proteómico realizado mostró 4 proteínas que se expresan entre las identificadas con esa función (Fig. 14). Se observó que las 4 proteínas muestran distinto grado de expresión en las condiciones analizadas. Estas proteínas son las encargadas de suministrar los intermediarios de la beta oxidación de ácidos grasos a las sintetas. En este caso no se detectaron el regular transcripcional PhaD y la fasina PhaI, como estas proteínas cumplen función regulatoria, quizás su expresión sea menor y el análisis proteómico realizado permitió solo detectar las proteínas mayoritarias. Tampoco se detectó en el análisis la depolimerasa de cadena media PhaZ sugiriendo que la degradación no fue muy relevante en las condiciones analizadas (Fig. 14). Por el contrario, PhaG encargada de proveer los intermediarios desde la síntesis de novo de ácidos grasos, no fue detectada en este estudio.

Los resultados indican que el cultivo en medio desbalanceado con bajo contenido de nitrógeno que conduce a la acumulación de PHA en otras bacterias del género *Pseudomonas* (Huisman et al., 1992) y la fase de crecimiento estacionario resultaron en la sobreexpresión de un mayor número de proteínas asociadas a la biosíntesis de ambos tipos de polímeros (Fig. 14). Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó esa condición para analizar en profundidad las proteínas que participan en vías metabólicas relacionadas con la producción de estos polímeros como se detalla a continuación.

Análisis de proteínas expresadas diferencialmente en fase de crecimiento estacionario en vías metabólicas centrales relacionadas con la producción de PHA

Se analizaron todas las proteínas de *P. extremaustralis* involucradas en vías metabólicas clave del metabolismo central mediante búsqueda y clasificación manual para obtener un panorama global del estado fisiológico del microorganismo fase estacionaria de crecimiento en medio NEO y en aerobiosis, condiciones que conducen a la acumulación de los distintos tipos de PHA.

La síntesis de estos polímeros está relacionada con vías metabólicas esenciales para la célula debido a que la obtención de los precursores necesarios involucra rutas como la glucólisis, el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), la β oxidación y la síntesis *de novo* de ácidos grasos, le involucra metabolitos centrales tales como acetyl-CoA y cofactores como NADPH/NADH. También se incluyó el ciclo del metil citrato identificado como relevante a través de los análisis realizados con el programa Panther.

El catabolismo de la glucosa en *Pseudomonas* involucra el camino de Enter Doudoroff (ED), la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) que en *Pseudomonas* se encuentra incompleta por la ausencia del gen que codifica la enzima Fosfofructoquinasa (Pfk) (Nikel et al., 2015) y su conexión con la vía de las pentosas fosfato (PP). La vía de ED comprende varias enzimas, entre las que encontramos a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Edd) y 2-ceto-3 deoxi- 6-fosfogluconato aldolasa (Eda o KdpgA). De esta manera se obtiene energía en forma de ATP, equivalentes de reducción y metabolitos para varios procesos celulares esenciales. A continuación, se muestran estas vías metabólicas y las proteínas con expresión diferencial en las condiciones analizadas (Fig. 15). El medio de cultivo utilizado 0.5NE2 (Huisman et al., 1992) es un medio semisintético que contiene una baja proporción de extracto de levadura y fue suplementado con octanoato de sodio, no conteniendo ningún azúcar agregado. Sin embargo, el extracto de levadura puede contener trazas de estos compuestos y la degradación de aminoácidos y ácidos grasos pueden proveer intermediarios que ingresen en distintos puntos de estas vías.

En la Fig. 15.A se muestran en color verde las proteínas sobre-expresadas pertenecientes a la vía de EMP, como la Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa Fba, gliceraldehido fosfato deshidrogenasa GapA, PgK fosfoglicerato quinasa y piruvato quinasa (PyK). En cuanto a la vía de ED y PP (Fig. 15B) se detectaron todas las enzimas, algunas sin cambio entre fases de crecimiento (mostradas en color azul) y otras con expresión aumentada (mostradas en verde).

A. Embden-Meyerhof-Parnas



B. Enter Doudoroff

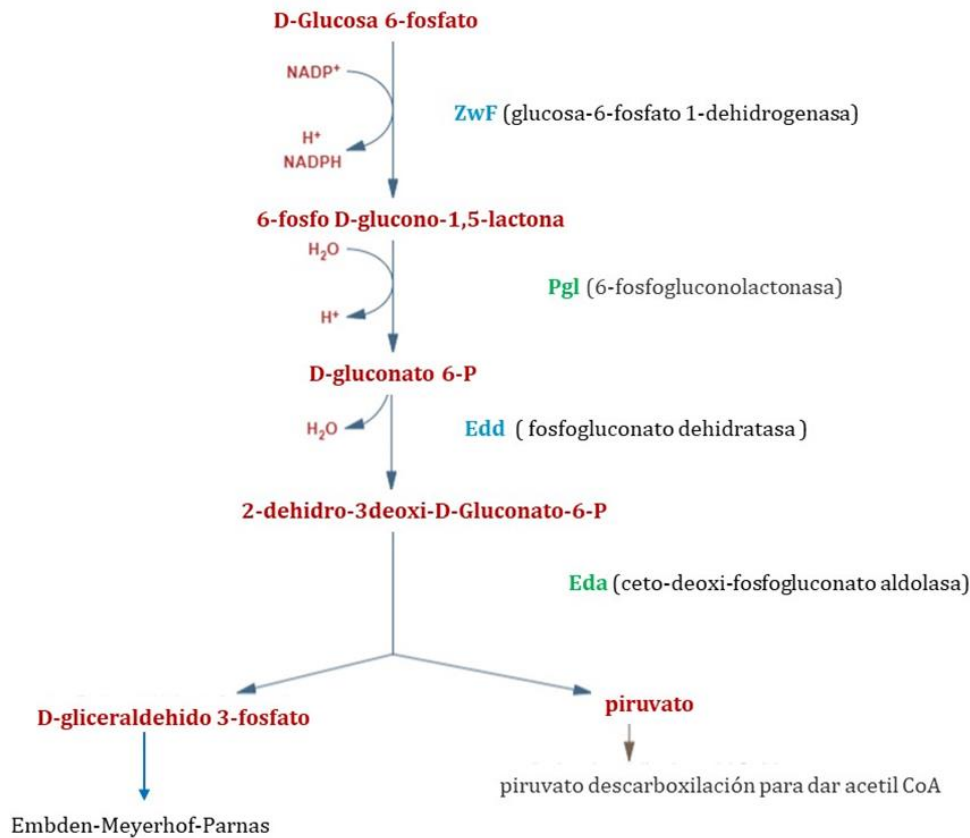


Fig. 15. Transformación de glucosa a piruvato por los caminos de Embden-Meyerhof-Parnas (A), Enter Doudoroff con algunas conexiones con el ciclo de las pentosas fosfato(B) y su expresión en fase estacionaria en *P. extremaustralis*. Se muestran los sustratos y las enzimas involucradas. En color verde enzimas con expresión aumentada en fase estacionaria, en azul sin cambio entre fase exponencial y estacionaria, en negro no detectada entre las encontradas como mayoritarias en este estudio. Esquema modificado de BioCyc (Karp et al., 2019).

Otra de las rutas analizadas fue el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) esta ruta metabólica que implica 8 pasos enzimáticos que degradan/oxidan acetil-CoA a CO₂ para obtener energía (Fig.16). Todas las enzimas pertenecientes a esta vía fueron detectadas en el análisis proteómico y también las 2 enzimas pertenecientes al ciclo del glioxilato. Algunas de ellas se observaron con expresión aumentada en fase estacionaria (Fig. 16).

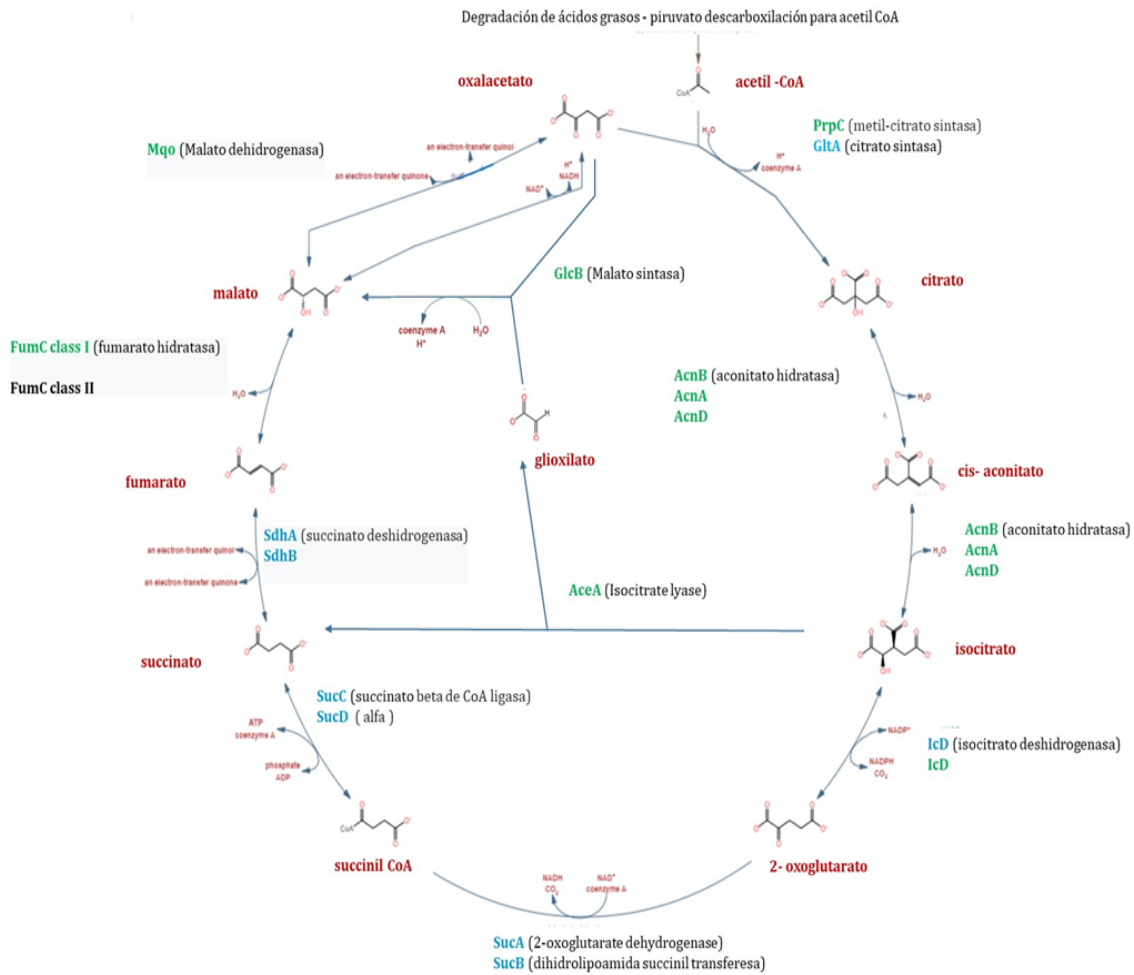


Fig. 16. Ciclo de Krebs y su expresión en fase estacionaria en *P. extremaustralis*. Se muestran los sustratos y las enzimas involucradas. En color verde enzimas con expresión aumentada en fase estacionaria, en azul sin cambio entre fase exponencial y estacionaria, en negro no detectada entre las encontradas como mayoritarias en este estudio. Esquema modificado de BioCyc (Karp et al., 2019).

Entre las proteínas sobre-expresadas se detectaron aconitato hidratasa (3 proteínas) algunas de ellas bifuncionales participando en otras vías metabólicas, Icd: isocitrato deshidrogenasa una de las enzimas, la fumarato hidratasa (FumC) y Mqo, malato deshidrogenasa lo cual indica que el ciclo se encuentra activo (Fig. 16). También se observaron sobre-expresadas la isocitrato liasa y la malato sintasa que

a través del ciclo del glioxilato posibilitan el acortamiento del ciclo de Krebs obteniendo succinato y malato a partir de isocitrato y acetil CoA (Fig. 16).

En el caso de la beta oxidación de ácidos grasos, todas las enzimas fueron encontradas en el análisis (Fig. 17). Presentaron expresión aumentada en fase estacionaria enoil CoA hidratasa, FadA cetoacil CoA tiolasa, FadE y FadD (Fig. 17), mientras que FadB que participa en varios pasos de este ciclo fue detectada sin cambios significativos entre fase exponencial y estacionaria. No se detectó la enzima Phaj que deriva los monómeros para la síntesis de PHA, debido a las características del análisis proteómico.

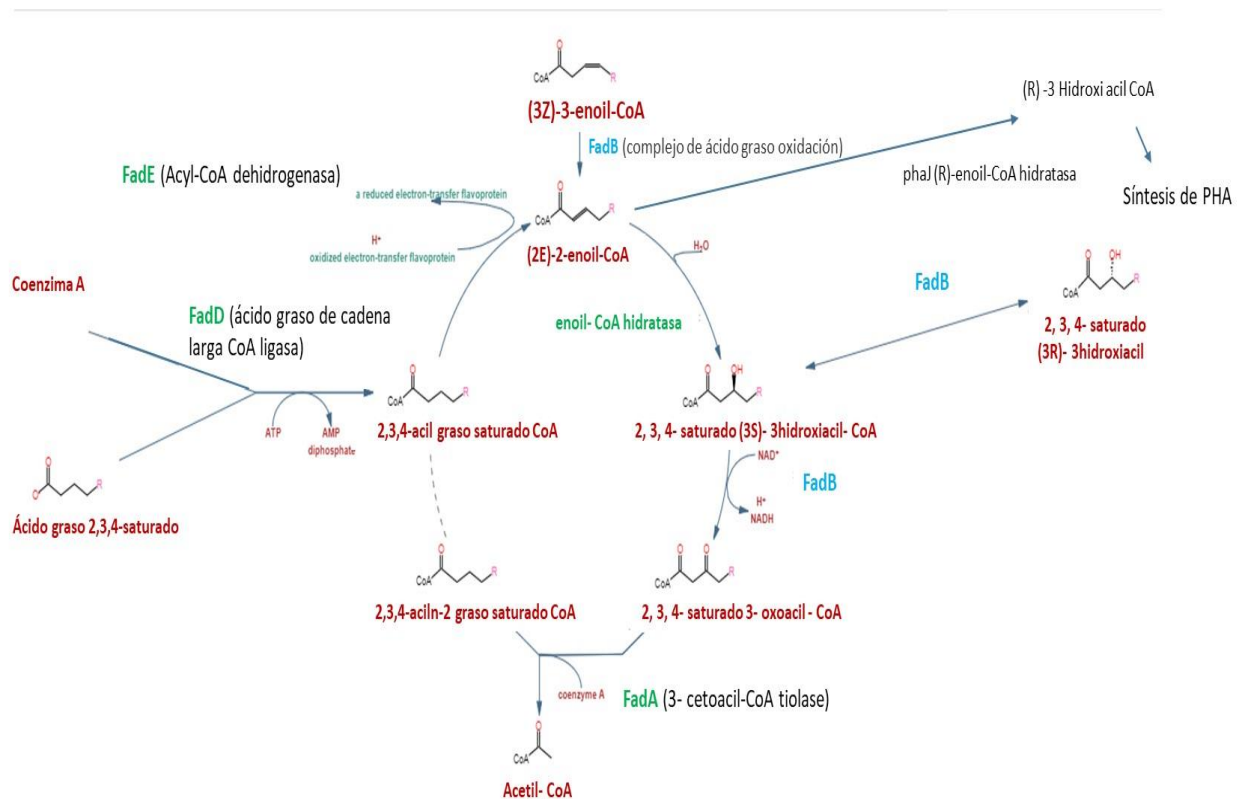
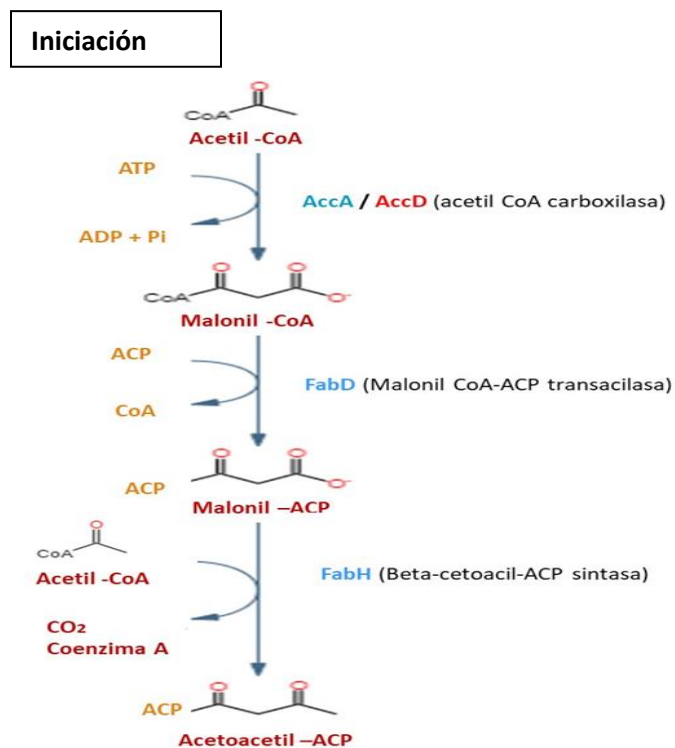


Fig. 17. Beta oxidación de ácidos grasos y su expresión en fase estacionaria en *P. extremaustralis*. Se muestran los sustratos y las enzimas involucradas. En color verde enzimas con expresión aumentada en fase estacionaria, en azul sin cambio entre fase exponencial y estacionaria, en negro no detectada entre las encontradas como mayoritarias en este estudio. Esquema modificado de BioCyc (Karp et al., 2019).

La siguiente ruta metabólica analizada a través de los datos proteómicos fue la síntesis *de novo* de ácidos grasos en *P. extremaustralis*. Esta vía comprende dos etapas: 1)- iniciación y 2)- elongación. A su vez, cada ciclo de elongación requiere 4 pasos (Hoang y Schweizer, 1997). Todas las enzimas involucradas fueron detectadas en el análisis proteómico. Las enzimas involucradas en los pasos de iniciación estuvieron expresadas en igual proporción en fase exponencial y estacionaria (Fig. 18). En la fase de elongación las enzimas FabG que codifica la cetoacil ACP reductasa se detectó con expresión aumentada (Fig. 18). Esta enzima proporciona los sustratos 3-hidroxicil-ACP que pueden continuar el ciclo o ser transformados por la PhaG en el sustrato adecuado para la PHA sintasa. Si bien PhaG no fue detectada en el análisis, se debe tener en cuenta que por las características del estudio proteómico realizado solo se detectan las proteínas mayoritarias.



Elongación

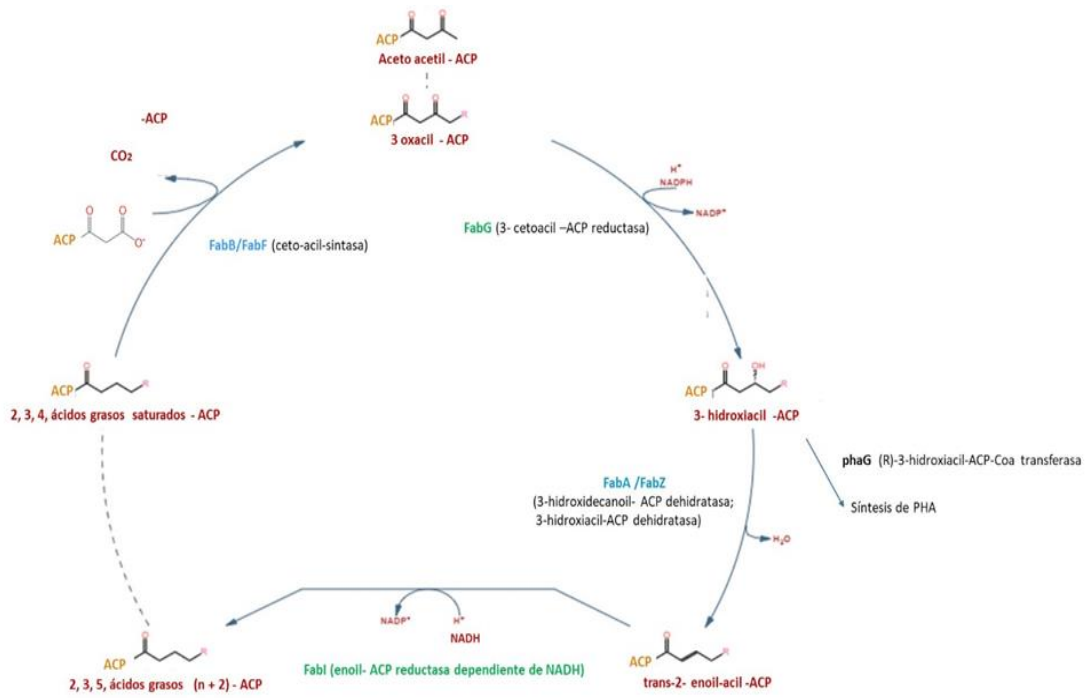


Fig. 18. Síntesis *de novo* de ácidos grasos y su expresión en fase estacionaria en *P. extremaustralis*. Se muestran los sustratos y las enzimas involucradas. En color verde enzimas con expresión aumentada en fase estacionaria, en azul sin cambio entre fase exponencial y estacionaria, en negro no detectada entre las encontradas como mayoritarias en este estudio. Esquema modificado de BioCyc (Karp et al., 2019).

Una de las vías novedosas identificadas a partir del análisis realizado con el programa Panther fueron las proteínas involucradas en el ciclo del metil citrato que convierte el propionato en piruvato. Dado que este metabolismo no había sido previamente analizado en *P. extremaustralis*, en primer lugar, se buscaron en el genoma los genes que componen esta vía y se realizó un análisis comparativo con otras especies de *Pseudomonas*.

La vía comprende los genes *prpBCDE*, *acnB* y *acnD* (Suvorova et al., 2012). Estos últimos codifican aconitato hidratatas. *AcnB* es bifuncional también pertenece al ciclo TCA y al del glioxilato (Suvorova et al., 2012). El análisis del genoma de *P.*

extremaustralis mostró la presencia de todos los genes involucrados en esta transformación, incluyendo también *prpF* que codifica la 3-metilitaconitate isomerasa (Fig. 19). La región presentó alto grado de sintenia y similitud con varias especies de *Pseudomonas* modelo (Fig. 19), incluyendo 3 cepas pertenecientes a la especie *P. fluorescens* (SBW25, Pf-01 y Pf-5, esta última actualmente se denomina *P. protegens*) con las que *P. extremaustralis* posee alta similitud; *P. aeruginosa*, la especie tipo del género y patógena oportunista humana, *P. putida* KT2440 una especie muy estudiada en biotecnología considerada GRAS (Generally Recognized As Safe) y *P. syringae* pv. *syringae* B728a, un patógeno vegetal. En esta especie se observó la ausencia de *prpD* (Fig. 19), mostrando diferencias con el resto de las especies analizadas. En algunas especies como en *P. putida* KT2440 el gen que codifica la aconitasa, *acnB* se encuentra a continuación de los genes que participan en la vía del metil citrato, rio abajo de *prpD*. En otras, como en *P. extremaustralis*, este se encuentra ubicado en otra región genómica.

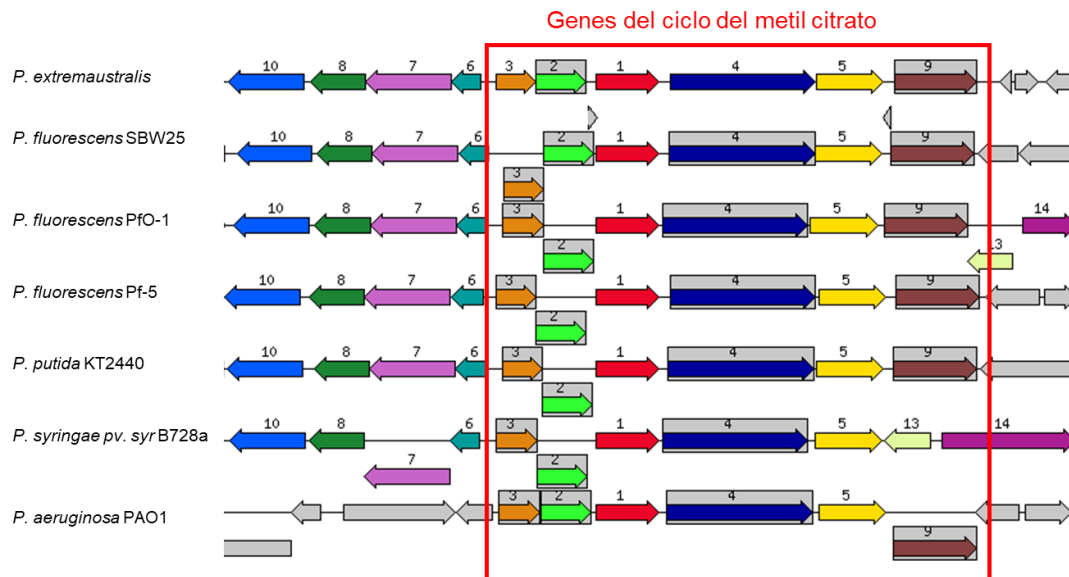


Fig. 19. Genes del ciclo del metil citrato. Las flechas representan la orientación y tamaño del gen a escala. Con el mismo color se representan genes homólogos. Se recuadran en rojo los genes involucrados en esta vía. 1: *prpC* (codifica metilcitrato sintasa; PE143B_0107790); 2: *prpB* (codifica 2-methylisocitrate lyase; PE143B_0107780); 3: codifica un probable regulador transcripcional de la familia GntR (PE143B_0107775); 4: *acnD* (codifica aconitase hidratase /Fe/S dependent methylisocitrato dehidratase PE143B_0107795) 5: *prpF* (codifica 3-methylitaconitate isomerase; PE143B_0107800); 9: *prpD* (2- methylcitrate dehidratase; PE143B_0107805)

La vía del metil citrato está íntimamente relacionada con el ciclo de Krebs (Fig. 20). Se encontraron varias proteínas con expresión aumentada en fase estacionaria de crecimiento. La enzima ácido graso CoA ligasa (PE143B_0117750, fatty acid--CoA ligase) que cataliza la transformación de propionato a propionil CoA estuvo sobre-expresada en fase estacionaria, además también mostró expresión aumentada PrpC que cataliza el paso siguiente transformando ese sustrato y oxalacetato en 2-metilcitrato. La transformación de este sustrato a 2-metil aconitato involucra las enzimas PrpD, PrpF y AcnD según si involucran los intermediarios metil cis o trans aconitato. Si bien PrpD y PrpF no fueron detectadas, la sobreexpresión AcnD que también participa en el paso siguiente sugiere que toda la vía se encuentra activada y con expresión aumentada con respecto a fase exponencial. La aconitasa bifuncional AcnB mostró también expresión aumentada. Esta enzima también fue mencionada al describir las enzimas del ciclo de Krebs, está codificada en el locus_tag PE143B_0116660. Fue identificada entre las proteínas denominadas ON en el ciclo del metil citrato y transforma el 2-metilaconitato en 2-metilisocitrato (Fig. 20). Finalmente, PrpB, que participa en el último paso de esta vía, transforma este sustrato en piruvato y succinato (Fig. 20).

La expresión aumentada de esta vía metabólica puede tener relevancia en la síntesis de PHA dado que involucra transformaciones del propionato, importante para la producción de copolímeros. El propionil-CoA puede utilizarse para la síntesis de monómeros de C5 al combinarse con acetil-CoA. Esto podría explicar la presencia de levulinato detectado por GC en *P. extremaustralis*, mencionado en el capítulo 1. Por otra parte, la vía del propionato se relaciona con la del malonato. La enzima metil malonato-semialdehído deshidrogenasa (GN=PE143B_0120340; A0A023C6Z0; *methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase-CoA acylating*) participa en varias vías metabólicas. En el metabolismo del inositol (denominada IolA) y en el de la beta-alanina transformando el malonato-semialdehído en acetil CoA (E.C. 1.2.1.18). También a partir de malonato-semialdehído permite la obtención de propionil-CoA a través de la vía de degradación de valina, leucina e isoleucina y del metabolismo del propionato (E.C. 1.2.1.27). Esta enzima fue encontrada sobre-expresada (Tabla

3A) y resulta interesante para la síntesis de PHAcc por su importancia en la obtención de acetil-CoA y propionil-CoA, lo que posibilitaría otra forma de obtención de compuestos de C5. El metabolismo de valina, leucina e isoleucina también está relacionado con la obtención de compuestos de C5.

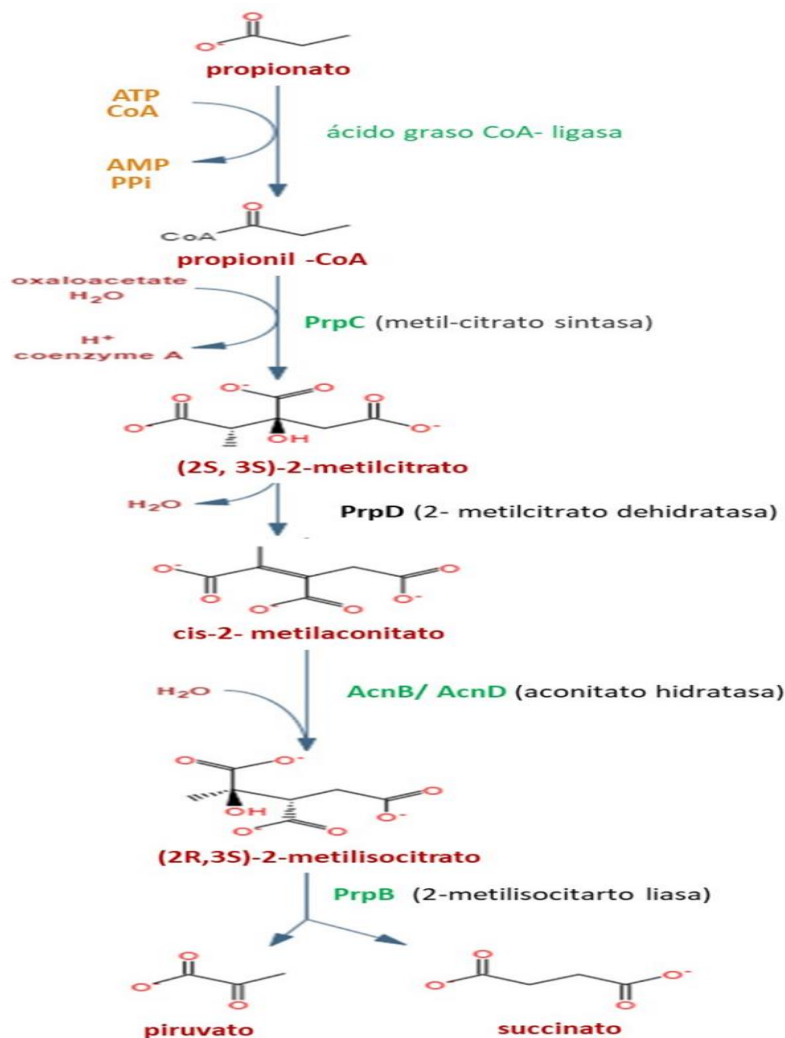


Fig. 20. Vía del metil citrato y su expresión en fase estacionaria en *P. extremaustralis*. Se muestran los sustratos y las enzimas involucradas. En color verde enzimas con expresión aumentada. Esquema modificado de BioCyc (Karp et al., 2019)

Además de la provisión de intermediarios necesarios para la biosíntesis de PHA, algo interesante para destacar es que en esta condición (NEO fase estacionaria de crecimiento y aerobiosis) también se observó el aumento de la expresión de la subunidad Alpha de la enzima NADP transhidrogenasa (codificada en el locus_tag: PE143B_0123160), que cataliza la transhidrogenación de NADH a NADP suministrando NADPH, fuente de poder reductor necesaria para la biosíntesis (Tabla 3.A del anexo).

Análisis de proteínas diferencialmente expresadas en presencia de octanoato de sodio con distinta relación C/N

Para determinar que proteínas presentaron expresión diferencial en común en LBO y NEO en fase estacionaria de crecimiento se realizó una comparación de las proteínas obtenidas en cultivos de *P. extremaustralis* en fase estacionaria de crecimiento en LB sin el agregado de octanoato de sodio. La comparación entre LBO vs. LB podría mostrar las diferencias relacionadas con el agregado de octanoato de sodio en un medio rico en nutrientes, mientras que la comparación de NEO vs. LB pondría en evidencia diferencias relacionadas con la presencia de octanoato de sodio y el desbalance en la relación C/N. Las tres condiciones corresponden a fase estacionaria de crecimiento en aerobiosis. Los análisis se realizaron con el programa Perseus.

Se detectaron 90 proteínas sobre-expresadas en LBO y 98 en NEO. Con ellas se realizó un diagrama de Venn, utilizando la herramienta disponible *on line* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) y se estudiaron tanto las proteínas compartidas (28) como las propias para cada condición, dando un total de 160 proteínas distintas entre ambas comparaciones (Fig. 21).

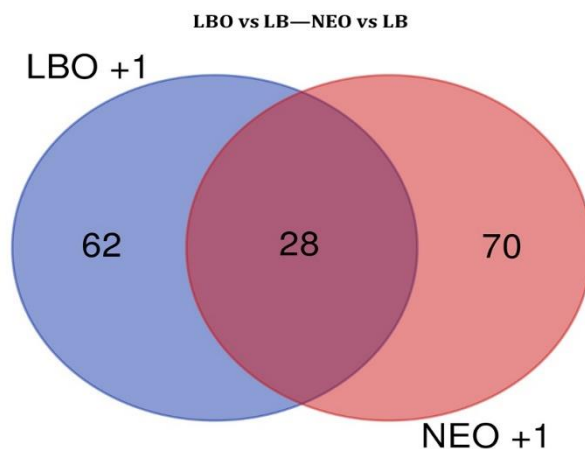


Fig. 21. Diagrama de Venn de proteínas sobre-expresadas en *P. extremaustralis* en condiciones aeróbicas a 28°C con distinta relación C/N. Se analizan proteínas que aparecieron en +1 en Volcano plot (veces de cambio mayor que 2) y con diferencias significativas $\text{Log}_2(P) > 1,3$.

Como se observa en la Fig. 21 del grupo de proteínas sobre-expresadas se encontraron 28 de ellas que son comunes tanto en medio LBO como en medio NEO. Dentro de este análisis fue posible observar una proteína de choque frío (*cold shock*, A0A023C7B7) y el glutatión reductasa (A0A023CGX4) que podrían relacionarse con la resistencia al estrés oxidativo en condiciones aeróbicas con una agitación vigorosa, ya que se trata de una chaperona y las transformaciones del glutatión se relacionan con las defensas antioxidantes.

Además, se encontraron presentes a la proteína PhbX (A0A023CE49), la fasina PhbP (A0A023CE85) correspondientes al cluster de PHB. Además, se encontraron el acetato quinasa codificada por *ackA* (A0A023CEC1), fosfato aciltransferasa codificada por *pta* (A0A023CE31). Como se mencionó, los genes que codifican estas proteínas se encuentran en la misma región genómica que el cluster de PHB por lo que podría hipotetizarse que se transcriben conjuntamente y también se traducen, y aunque se desconoce su rol en el metabolismo del PHB su detección podría indicar que las condiciones de producción favorecen su expresión. También se encontraron proteínas que participan en la beta oxidación de ácidos grasos (Fig. 17) la proteína FadB (A0A023CFC7) la cual participa en la degradación aeróbica y anaeróbica de los

ácidos grasos de cadena larga, la enoil-CoA hidratasa (A0A023CDE8), 3-Cetoacil-CoA tiolasa FadA (A0A023CFA7).

Por otra parte, se observaron aproximadamente el mismo número de proteínas (62 vs. 70) sobre expresadas propias de cada condición (Fig. 21) individualmente para cada condición. Dentro de las proteínas del medio LBO se observó que entre las 62 se encontraron la proteína PhbC correspondiente a la sintasa encargada de la síntesis de polihidroxibutirato (C4) y a PhbA que es la tiolasa que interviene en el proceso de síntesis del polímero antes mencionado.

En el medio con alta relación C/N (NEO) de las 70 sin compartir frente a LBO sobreexpresadas, en relación a la síntesis de los polímeros se detectó la PhaF fasina de los PHAcM. Además, en esta condición fue posible detectar la presencia de dos copias de la enzima Glutamato sintetasa (A0A023CFG5; A0A023CFQ3), que son oxidoreductasas que participan en el metabolismo del glutamato, siendo relevantes en relación al nitrógeno. También se encontró una nitroreductasa (A0A023CF49) y una nitrito/sulfito reductasa (A0A023CBA5) enzimas que están involucradas con la reducción de compuestos nitrogenados.

Este mismo análisis se realizó para las proteínas del medio LBO reprimidas (104) en comparación con las 105 que provienen del análisis del medio NEO reprimidas. Se puede observar en el diagrama de Venn que 33 proteínas son comunes para ambos medios.

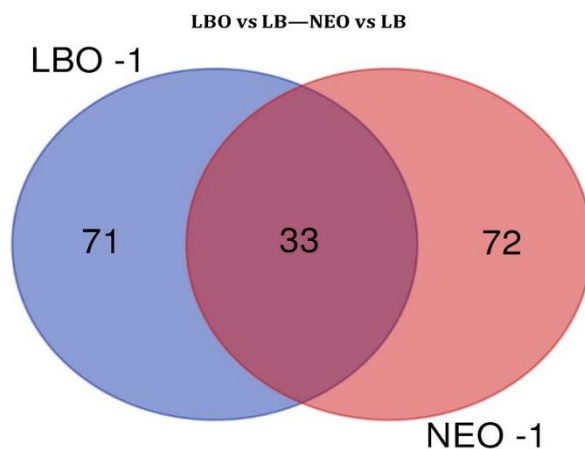


Fig. 25. Diagrama de Venn de proteínas reprimidas en *P. extremaustralis* en condiciones aeróbicas a 28°C con distinta relación C/N. Se analizan proteínas que aparecieron en -1 en Volcano plot (veces de cambio mayor que 2) y con diferencias significativas $\text{Log}_2(P) > 1,3$.

En este análisis fue posible observar distintos tipos de chaperonas que como se conoce su función es la de asistir tanto al ensamblaje como desensamblaje de otros polipéptidos como de moléculas de RNA, entre ellas se detectaron GroS (A0A023C9X8), DnaK (A0A023CHS1) y ClpB (A0A023C960). Dentro del grupo encontramos una alquilhidroperoxido reductasa C (A0A023CG46) la cual cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos desempeñando un papel de protección en la célula contra el estrés oxidativo mediante la desintoxicación de peróxidos. Perteneciente a esta familia se observó la peroxiredoxina Prxs (A0A023CDF8) el hecho de encontrar este tipo de enzimas reprimidas en ambos medios adicionados con octanoato de sodio, respecto al LB puede deberse a la presencia de PHA que se sabe proporciona defensas frente al estrés.

También fue posible analizar la presencia de otras enzimas como aconitato hidratasa (A0A023CF65) involucrada en el ciclo de TCA, proteínas relacionadas con el metabolismo de degradación de aminoácidos como la glicina deshidrogenasa GcvP o la histidina amoniaco liasa (A0A023CFB2) involucrada en la degradación de histidina en glutamato.

En las proteínas que solo están presentes en LBO se ve presente la glicerol quinasa GlpK involucrada en el metabolismo de los glicerolípidos (EC 2.7.1.30), también a la proteína de ensamblaje de LptD (A0A023C6V7) que actúa de manera conjunta con la LptE en el ensamblaje de lipopolisacárido (LPS) en la superficie de la membrana externa. Fue posible detectar a parte del complejo de piruvato deshidrogenasa a las A0A023C1Q2, A0A023CGA1 relacionada con la vía metabólica de gluconeogénesis EC 1.2.4.1 y la AceE piruvato deshidrogenasa E1 component. La disminución de la expresión de todas estas enzimas podría estar relacionada con la presencia de octanoato de sodio que activaría la beta oxidación.

En las proteínas reprimidas para el caso del medio de acumulación NEO en el análisis se encontraron proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos como la glutamina sintetasa (A0A023CC87) EC 6.3.1.2 que cataliza la condensación del glutamato y el amoniac para formar glutamina. Lo que podría indicar que en este medio con bajo nitrógeno se favorece la presencia de glutamato y el ahorro de amoniac en un medio con bajo N. Se observó también la represión de otras proteínas relacionadas con el estrés oxidativo específicamente la superóxido dismutasa (A0A023C5D2) encargada de detoxificar el radical O_2^- y transformándolo a una molécula sencilla de O_2 y peróxido de hidrógeno, así como la glutarredoxina (A0A023CD52, glutaredoxin, *grxD*), que forma parte de un sistema de defensas antioxidantes que como se mencionó su expresión disminuida podría sugerir que su función podría ser en parte cubierta por la presencia de PHA.

DISCUSIÓN

P. extremaustralis posee las 3 PHA polimerasas (PhbC, PhaC1 y PhaC2) involucradas en la síntesis PHAcc y PHAcM, sin embargo, esta bacteria produce grandes cantidades de PHB y menor proporción de PHAcM, lo que fue asociado a la expresión diferencial de los genes que codifican las sintasas (Catone et al., 2014). El análisis proteómico realizado en este trabajo permitió determinar que las enzimas PHA sintasas mostraron una expresión aumentada en fase estacionaria de crecimiento en comparación con la fase exponencial. Con respecto a las otras proteínas relacionadas con el metabolismo de los PHA, se ha demostrado que las fasinas son las proteínas más numerosas que recubren la superficie de los gránulos. En particular, la fasina PhaP, relacionadas con la biosíntesis de PHB, puede alcanzar altos niveles de cobertura de los gránulos (Tian et al., 2005). La fasina PhbP mostró sobre-expresión en medio NEO en casi todas las condiciones analizadas, si bien se detectó sin cambios en expresión entre los medios NEO y LBO. Con respecto a las fasinas relacionadas con la producción de PHAcM solo se detectó PhaF. Estudios previos del proteoma de los gránulos de *P. extremaustralis* mostraron a la fasina PhbP como mayoritaria y también detectaron la fasina de PHAcM PhaI (Catone et al., 2014) que no fue identificada en este estudio global. La proteína PhbX, de función desconocida en *P. extremaustralis*, mostró el mismo patrón de expresión que PhbP. Esta proteína también fue identificada previamente en el proteoma de los gránulos (Catone et al., 2014). En *R. eutropha* H16 la proteína codificada por B1632, homóloga a PhbX, es una probable α / β -hidrolasa con dominios similares a los presentes en P (3HB) sintasas / despolimerasas (Sznajder et al., 2015). Como se mencionó, toda la región genética flanqueante es similar entre ambas bacterias (*Ralstonia eutropha* y *P. extremaustralis*) e incluye las enzimas fosfato acetil transferasa codificada por *pta* y acetato quinasa codificada por *ackA*. En *R. eutropha* estos genes forman un operón (B1629 a B1632) completo el cual podría transformar 3HB-CoA a 3HB-fosfato (a través de Pta1), y posteriormente, el ATP podría generarse a través de la AckA, asumiendo que ambas enzimas aceptan sustratos mayores a C2, lo que daría 3HB

como producto de excreción (Sznajder et al., 2015). Esto está apoyado por la observación de la excreción de 3HB en *R. eutropha* (Vollbrecht y Schlegel, 1979). Alternativamente, el PHB podría degradarse y ser deshidratado a crotonil-CoA, y posteriormente reducido a butiril-CoA a través de FabI2 (enoil-ACP reductasa también presente en esa región) o mediante una acil-CoA deshidrogenasa, cuyos genes codificantes también están presentes en el genoma de *R. eutropha*. Análogamente a lo descrito para el 3-hidroxi-butiril-CoA, el butiril-CoA podría convertirse en butiril-fosfato (vía Pta1), dando finalmente, ATP y butirato en la reacción catalizada por AckA. El butirato también es un producto de excreción en *R. eutropha* (Sznajder et al., 2015). Si bien desconocemos la función de PhbX en *P. extremaustralis*, la expresión diferencial observada en este trabajo junto con la expresión de Pta1 y AckA podrían sugerir un papel similar al descrito en *R. eutropha*.

Ha sido señalado que los microorganismos capaces de sintetizar PHA pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo a las condiciones en que se realiza la biosíntesis. El primer grupo es capaz de sintetizar PHA bajo limitación de nutrientes como oxígeno, nitrógeno o fósforo y la acumulación no se produce durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que en el segundo grupo estos biopolímeros se acumulan durante la fase de crecimiento y sin el requerimiento de la limitación de nutrientes (Muhammadi et al., 2015). En este trabajo, la combinación de medición de los PHA producidos en distintas condiciones de cultivo junto con el análisis proteómico permitió determinar que en *P. extremaustralis* la producción de PHAc se ve favorecida por el desbalance en la relación C/N, mientras que la producción de PHB puede ser llevada a cabo en medios de cultivo sin limitación de N. La síntesis de diferentes tipos de PHA es posible debido a la especificidad de sustrato de las PHA polimerasas o sintasas, que son divididas en distintas clases. Las sintasas de clase I usan monómeros de cadena corta, mientras que las de clase II, a las que pertenecen las de la mayoría de las especies de *Pseudomonas*, usan monómeros de longitud de cadena media (Mozejko-Ciesielska et al., 2019). Esos monómeros pueden provenir de diferentes vías metabólicas y el tipo de PHA producido depende de la vía

metabólica utilizada y de la fuente de carbono. Las *Pseudomonas* utilizan dos vías metabólicas para generar precursores para la síntesis de PHAcM. Cada vía usa un sustrato diferente para proporcionar precursores de 3-hidroxiacil (3HA), que luego son utilizados para sintetizar PHAcM. Los ácidos grasos, como el octanoato de sodio utilizado en este trabajo, son degradados por β -oxidación. Esta vía está involucrada en la oxidación de ácidos grasos en enoil-CoA, (S)-3-hidroxiacil-CoA y (R) -3-cetoacil-CoA que luego se convierten en (R) -3-hidroxiacil-CoA. En el análisis proteómico realizado todas las proteínas relacionadas con estas transformaciones se encontraron sobre-expresadas al igual que PhaJ que constituye el nexo entre los intermediarios de la beta oxidación y las polimerasas de PHAcM. Con respecto a esta enzima se encontraron 4 copias del gen en *P. extremaustralis* (Catone, 2013). Los resultados de este trabajo permitieron confirmar la expresión de las 4 enzimas PhaJ verificando los resultados previos del laboratorio basados en el análisis *in silico* de motivos característicos de estas proteínas.

Las especies de *Pseudomonas* también pueden utilizar la síntesis *de novo* de ácidos grasos para sintetizar monómeros para PHAcM a partir de fuentes de carbono no relacionadas, como glucosa, gluconato, acetato o etanol (Madison y Huisman, 1999). En este proceso, los sustratos se oxidan a acetyl-CoA y luego se convierten por una serie de reacciones en malonil-CoA y activando por transacilación a (R) -3HA-proteína portadora de acilo (ACP). Los intermediarios de acil-ACP y malonil-ACP resultantes son transformados en (R) -3-hidroxiacil-ACP que aumenta en longitud por la incorporación de sucesivas unidades de dos carbonos. En la mayoría de las *Pseudomonas*, la transacilasa PhaG específica transforma los intermediarios acil-ACP en (R) -3-hidroxiacil-CoA (Hoffman et al., 2000).

Existen pocos estudios proteómicos realizados para analizar el metabolismo en su conjunto en condiciones de acumulación de PHA. En relación con la producción de PHAcM, en *P. putida* KT2440 se llevaron a cabo análisis proteómicos utilizando geles de electroforesis en 2D seguido por MALDI TOF/TOF en presencia de ácido oleico como fuente de carbono y condiciones de limitación de nitrógeno y fósforo para

analizar su influencia en la síntesis de estos polímeros (Mozejko-Ciesielska y Mostek, 2019, Mozejko-Ciesielska y Serafim, 2019). El análisis proteómico reveló que las condiciones de cultivo con bajos niveles de nitrógeno eran beneficiosos para la síntesis de PHAcM pero que la limitación de nitrógeno afectaba las proteínas asociadas con el metabolismo del carbono. Se observó la inducción de proteínas involucradas en el metabolismo del nitrógeno, la síntesis de ribosomas y el transporte. También se observó expresión disminuida de proteínas involucradas en la β -oxidación de ácidos grasos FadA y FadB (Mozejko-Ciesielska y Mostek, 2019), contrariamente a lo observado en *P. extremaustralis* donde FadA mostró expresión aumentada, que puede ser probablemente atribuido al mayor estrés generado por condiciones de limitación de nitrógeno más severas y mayor tiempo de cultivo en comparación con este trabajo. El proteoma de *P. putida* también fue analizado bajo condiciones de limitación de carbono y fósforo. Se observó que la mayoría de las actividades metabólicas cesaron en esas condiciones, sin embargo, la abundancia de proteína PhaF, asociada a gránulos del polímero, se incrementó a las 24 y 48 h de cultivo y se detectó también la activación de proteínas pertenecientes al regulón fosfato (Mozejko-Ciesielska y Serafim, 2019). Esto último, relacionado con la limitación de fósforo.

En relación a la síntesis de PHB, se han realizado algunos trabajos globales de transcriptómica y/o proteómica que analizaron principalmente el efecto de distintas fuentes de carbono sobre el metabolismo y la síntesis de estos polímeros. En una mutante capaz de utilizar glucosa de *R. eutropha* se observó, a través de la combinación de transcriptómica con proteómica, que la degradación de este compuesto está estimulada por el aumento de la expresión de las enzimas involucradas en la vía del 2-ceto-3-desoxigluconato-6-fosfato (KDPG) y en reacciones posteriores dando piruvato que es luego transformado a acetil-CoA, por el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa. La acetil-CoA es utilizada para la síntesis de poli (3-hidroxibutirato) que se evidencia también por la sobreexpresión de varias enzimas del metabolismo del PHB y la mayor cantidad de NADPH requerida para la síntesis de este polímero que proviene del aumento de la

expresión de NAD (P) transhidrogenasas (Raberg et al., 2011). El proteoma de *Cupriavidus necator* H16 (anteriormente *R. eutropha*) también se evaluó en cultivos discontinuos utilizando subproductos derivados del biodiésel como fuentes de carbono, incluyendo glicerol con distinto grado de refinamiento y pureza y ácidos grasos. Para este análisis se utilizó la técnica de cromatografía líquida unidimensional (1D) seguida de espectroscopia de masas (LC/MS/MS). Se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de dos fasinas involucradas en la acumulación de PHB, y de proteínas de la vía de β oxidación de ácidos grasos, el ciclo del glioxilato y las vías de síntesis de hidrógeno (Sharma et al., 2016).

En este trabajo de tesis, a diferencia de los mencionados, se analiza por primera vez la producción de PHAcc y PHAccm utilizando una técnica global en una en la misma bacteria, *P. extremaustralis*. Los resultados mostraron la activación de proteínas específicas involucradas en la síntesis de estos polímeros, así como de vías metabólicas centrales relacionadas con la producción. Un hallazgo interesante fue la observación de activación de la vía del metil citrato una vía periférica altamente relacionada con el ciclo de Krebs a través de la cual se cataboliza el propionato un sustrato interesante para la síntesis de PHAcc que puede proveer sustratos de C5. Por otra parte, si bien el propionato ha sido un sustrato utilizado para la producción de copolímeros de hidroxibutirato e hidroxivalerato, es un compuesto tóxico y la posibilidad de degradación es también una forma de detoxificación (Dolan et al. 2018). Esto podría ser interesante para la incorporación de propionato al medio de cultivo y la exploración de obtención de diferentes copolímeros a través del análisis y optimización de las condiciones de producción.

CONCLUSIONES GENERALES

1. En esta tesis analiza por primera vez el metabolismo de distintos tipos de polihidroxicanoatos en una misma bacteria, *P. extremaustralis*.
2. *P. extremaustralis* fue capaz de producir PHAcc compuesto por unidades de hidroxibutirato, detectándose también la presencia de levulinato (C5) y PHAcM compuesto por hexanoato y octanoato.
3. El desbalance nutricional afectó más marcadamente la producción de PHAcM que la producción de PHAcc (PHB). EL PHB pudo ser producido en un medio de cultivo no limitado en nitrógeno.
4. El PHB resultó más relevante para sobrellevar la exposición a la radiación UVA y a los cambios de pH en comparación con los PHAcM, mostrando el papel clave del PHB en la fisiología de esta bacteria.
5. Los estudios realizados también permitieron determinar que el pH moderadamente alcalino (alrededor de 8) resulto más adecuado para la producción de estos polímeros. La manipulación del pH del medio de cultivo puede ser de utilidad para estrategias de producción del polímero o de sus monómeros.

6. El análisis comparativo de los genes relacionados con el metabolismo del PHB y su entorno mostró la presencia de los mismos en varias especies de *Pseudomonas* en las que no habían sido reportados previamente.

7. El análisis de las regiones adyacentes sugiere que los genes PHB en otras *Pseudomonas* podrían haber sido adquiridos por transferencia horizontal genética y la permanencia en el genoma otorgaría una ventaja adaptativa.

8. El análisis proteómico global del metabolismo de los PHA y de rutas metabólicas centrales que contribuyen con precursores para su biosíntesis en distintas condiciones de cultivo mostró que:

a. Las enzimas relacionadas con la producción de PHAc_m se sobre-expresan en condiciones desbalanceadas de C/N.

b. La fase estacionaria y la aireación favorecieron la expresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de ambos tipos de PHA.

c. La producción de PHB no requiere de condiciones de desbalance de C/N.

d. Se observó la activación de algunas enzimas que participan en glucólisis (vías de Embden Meyerhof Parnas y Entner Doudoroff), ciclo de Krebs, de las pentosas fosfato, síntesis de novo y β -oxidación de ácidos grasos que contribuyen con precursores para la biosíntesis y poder reductor.

e. Se detectó la activación de la vía periférica del metil citrato que permite la transformación de propionil-CoA sustrato interesante para la obtención de monómeros de C5. Esto podría explicar la presencia de levulinato en el PHAcc producido por esta bacteria.

9. En conjunto a través de distintas aproximaciones se pudieron identificar las condiciones que favorecen la producción de los distintos tipos de PHA en *P. extremaustralis*, así como su relevancia en la fisiología y la respuesta a estrés. Los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas para estrategias de producción de los distintos polímeros, sus monómeros o para el empleo de proteínas que participan en su biosíntesis en aplicaciones industriales.

10. Los análisis de la resistencia a estrés conferida por los PHA puede resultar de interés para el uso de microorganismos productores en aplicaciones ambientales tales como la biorremediación o la promoción de crecimiento vegetal. Asimismo, la detección de genes de producción de PHB en especies patógenas oportunistas humanas o patógenas de vegetales debe ser tenida en cuenta por sus potenciales efectos negativos para la salud humana y actividades agrícolas.

ANEXO TABLAS

Los códigos de identificación UniProt cambiaron recientemente. Los códigos unificados pueden obtenerse de la base de datos UniParc (www.uniprot.org/uniparc)

Tabla 1A. Lista de proteínas diferencialmente sobre-expresadas en NEO vs. LBO en fase estacionaria y condiciones aerobias.

N	Uniprot	Descripción	Log2 (veces de cambio)	Log10 (P)
1	A0A023C609	Ribonuclease E, GN= <i>rne</i>	1,60	1,95
2	A0A023CD72	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0108910	1,10	1,51
3	A0A023C8Z7	Uncharacterized protein, GN=PE143B_0117740	1,18	2,39
4	A0A023CFK1	Glutamine synthetase, GN= <i>glnA</i>	1,59	3,27
5	A0A023CII1	Carbamoyl-phosphate synthase large chain, GN= <i>carB</i>	1,78	1,78
6	A0A023C734	Serine/threonine protein kinase, GN=PE143B_0121055	2,03	2,33
7	A0A023C519	Isocitrate lyase, GN=PE143B_0123985	1,90	3,54
8	A0A023C9X5	Phosphoribosylformylglycinamide synthase, GN= <i>purL</i>	1,74	1,62
9	A0A023CE87	Flagellin, GN=PE143B_0108635	2,24	2,45
10	A0A023CEI7	Multidrug transporter, GN=PE143B_0106710	1,27	3,39
11	A0A023CE99	Multidrug transporter AcrB, GN=PE143B_0106130	3,59	1,35
12	A0A023CCD3	Aldehyde dehydrogenase, GN=PE143B_0110930	1,46	1,82
13	A0A023CCS5	Ligand-gated channel, GN=PE143B_0110340	2,17	3,15
14	A0A023C8V6	Uncharacterized protein, GN=PE143B_0117645	1,55	1,83
15	A0A023CID9	Endopeptidase La, GN=PE143B_0101230	1,82	1,59
16	A0A023CIM9	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)), GN= <i>ilvC</i>	1,69	2,36
17	A0A023C2E6	Channel protein TolC, GN=PE143B_0129405	3,09	1,97
18	A0A023CHR1	Nuclease, GN=PE143B_0100110	1,32	1,54
19	A0A023C9F4	Universal stress protein UspA, GN=PE143B_0116650	3,32	2,01
20	A0A023C3T1	Virulence factor SrfB, GN=PE143B_0127920	1,18	1,78
21	A0A023CAR2	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein, GN=PE143B_0113280	1,37	2,89
22	A0A023CB37	Peptidylprolyl isomerase, GN=PE143B_0113560	1,07	2,18
23	A0A023C8G1	Pyruvate carboxylase subunit A, GN=PE143B_0118795	1,12	3,51

24	A0A023CER6	Outer membrane protein assembly factor Bama, GN= <i>bamA</i>	1,52	2,17
25	A0A023CBK6	Chemotaxis protein, GN=PE143B_0112980	2,03	2,05
26	A0A023CBF6	Saccharopine dehydrogenase, GN=PE143B_0111640	1,85	2,27
27	A0A023C8E2	Pyruvate carboxylase subunit B, GN=PE143B_0118800	1,85	2,49
28	A0A023C816	Tryptophan synthase beta chain, GN= <i>trpB</i>	2,02	3,90
29	A0A023CI47	Leucine--tRNA ligase, GN= <i>leuS</i>	1,36	1,43
30	A0A023CF95	GTP-binding protein TypA, GN=PE143B_0104255	1,80	2,60
31	A0A023C4A6	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP), GN= <i>pckA</i>	1,68	4,19
32	A0A023CEC3	Adenylate kinase GN= <i>adk</i>	1,41	3,53
33	A0A023C4K5	Peptidase GN=PE143B_0125300	1,36	2,70
34	A0A023CAT0	ATP-dependent RNA helicase DeaD GN= <i>deaD</i>	1,38	1,71
35	A0A023CE84	Lysine--tRNA ligase GN= <i>lysS</i>	1,22	2,20
36	A0A023C4M4	3-isopropylmalate dehydrogenase GN= <i>leuB</i>	2,59	2,48
37	A0A023C4B6	Uncharacterized protein GN=PE143B_0125520	1,44	2,49
38	A0A023CAV8	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0113315	1,69	2,62
39	A0A023C4N6	Peptidoglycan-binding protein GN=PE143B_0124640	1,30	1,78
40	A0A023CFB9	Glucans biosynthesis protein G GN= <i>opgG</i>	1,06	1,77
41	A0A023C8C6	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] GN= <i>glmS</i>	1,54	1,88
42	A0A023CAZ4	Uncharacterized protein GN=PE143B_0113300	1,09	2,81
43	A0A023CEM9	Efflux pump membrane transporter GN=PE143B_0106715	2,13	3,72
44	A0A023CET0	Antibiotic transporter GN=PE143B_0106720	1,23	2,36
45	A0A023CBA5	Sulfite reductase GN=PE143B_0112755	1,10	1,48
46	A0A023CA74	Uncharacterized protein GN=PE143B_0115075	1,83	2,00
47	A0A023CAN7	Thiosulfate transporter subunit GN=PE143B_0114130	2,05	2,65
48	A0A023CFL9	Poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein PhaF GN=PE143B_0104460	1,16	1,70
49	A0A023CFF5	Alpha-1,4 glucan phosphorylase GN=PE143B_0104265	2,80	3,15
50	A0A023CG54	Chromosome segregation protein SMC GN=PE143B_0102565	1,69	1,54
51	A0A023CHQ9	Dynamin GN=PE143B_0101650	1,07	1,41
52	A0A023C4K3	Long-chain fatty acid--CoA ligase GN=PE143B_0125180	1,52	2,33
53	A0A023CI41	Cyclic nucleotide-binding protein GN=PE143B_0100880	1,04	1,37

54	A0A023C9A1	Amidase GN=PE143B_0116610	1,72	1,33
55	A0A023C9K3	Transporter GN=PE143B_0115865	3,24	2,23
56	A0A023CAP8	Membrane protein GN=PE143B_0113275	1,06	1,56
57	A0A023CCM9	Exopolyphosphatase GN=PE143B_0111465	1,76	2,02
58	A0A023C677	Membrane protein GN=PE143B_0121735	2,32	1,72
59	A0A023C4H0	Glutathione S-transferase GN=PE143B_0125135	1,34	2,48
60	A0A023C7Y0	ATP-dependent RNA helicase RhlE GN=rhlE	1,76	2,44
61	A0A023C6Q8	Acyl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0120895	1,18	2,51
62	A0A023CIT6	Acetolactate synthase 3 regulatory subunit GN=ilvH	2,35	2,55
63	A0A023C6W2	Anthranilate synthase component 1 GN=trpE	1,44	3,73
64	A0A023C581	UvrABC system protein A GN=uvrA	1,39	2,67
65	A0A023CDM9	Uncharacterized protein GN=PE143B_0107595	1,32	2,00
66	A0A023C6C1	NADP transhydrogenase subunit alpha GN=PE143B_0123160	3,33	4,87
67	A0A023CFE4	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase GN=PE143B_0104515	1,06	3,17
68	A0A023C6V0	Indole-3-glycerol phosphate synthase GN=trpC	1,53	1,78
69	A0A023CEC0	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase GN=cheB	1,58	1,68
70	A0A023C7K7	Histidine kinase GN=PE143B_0119465	1,18	1,40
71	A0A023C8G4	Fis family transcriptional regulator GN=PE143B_0118105	1,15	1,92
72	A0A023C9Q5	Outer membrane protein assembly factor BamB GN=bamB	1,14	3,50
73	A0A023C1J9	30S ribosomal protein S9 GN=rpsI	1,18	1,71
74	A0A023C2Y5	Serine/threonine protein kinase GN=PE143B_0127905	1,19	2,33
75	A0A023C4I1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase GN=zwf	1,39	2,13
76	A0A023C9C0	RND transporter GN=PE143B_0116790	1,32	1,62
77	A0A023CDR7	RNA helicase GN=PE143B_0108265	1,17	1,65
78	A0A023C420	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC GN=PE143B_0125605	1,32	1,73
79	A0A023C9G3	Sulfotransferase GN=PE143B_0115855	1,19	1,45
80	A0A023CAK3	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase GN=fabA	1,55	2,78
81	A0A023C388	Acyl-CoA synthetase GN=PE143B_0127670	1,16	1,63
82	A0A023CAY4	GfdT protein GN=PE143B_0113245	1,94	1,38
83	A0A023CGD5	Iron ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0105200	2,00	1,86

84	A0A023CI80	Carbon starvation protein A GN=PE143B_0101110	1,98	2,65
85	A0A023C5E9	3-isopropylmalate dehydratase large subunit GN=leuC	1,46	1,71
86	A0A023CHV9	DEAD/DEAH box helicase GN=PE143B_0100105	2,19	1,45
87	A0A023C234	Hemolysin secretion protein D GN=PE143B_0129395	1,13	1,41
88	A0A023CHF7	Acyl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0100730	1,66	1,37
89	A0A023C4U2	Chemotaxis protein GN=PE143B_0126060	1,92	1,90
90	A0A023CEH4	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0105970	2,18	2,36
91	A0A023CE62	Chemotaxis protein CheA GN=PE143B_0108805	1,95	1,71
92	A0A023CCY4	Glucose dehydrogenase GN=PE143B_0109220	2,55	2,38
93	A0A023C5R2	Uncharacterized protein GN=PE143B_0123075	1,52	1,83
94	A0A023CI20	Acetolactate synthase GN=PE143B_0101980	2,69	1,72
95	A0A023CGF1	DNA topoisomerase 4 subunit A GN=parC	1,69	1,73
96	A0A023CGE1	Channel protein TolC GN=PE143B_0105020	2,08	2,31
97	A0A023CHN2	Glutamate dehydrogenase GN=PE143B_0101200	2,10	1,43
98	A0A023C2Q0	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B GN=gatB	2,37	1,33
99	A0A023CE66	Ferredoxin-NADP reductase GN=PE143B_0105900	1,55	2,09
100	A0A023C4Z0	Acetylglutamate kinase GN=argB	1,47	1,95
101	A0A023C3Z1	Chemotaxis protein CheY GN=PE143B_0126075	1,63	2,82
102	A0A023CFB3	ATPase AAA GN=PE143B_0107400	1,39	4,59
103	A0A023C5A9	30S ribosomal protein S12 GN=rpsL	1,15	1,33
104	A0A023C1K2	Cell division protein ZapE GN=zapE	1,94	2,08
105	A0A023CG24	Alcohol dehydrogenase GN=PE143B_0102310	1,57	1,64
106	A0A023CD37	Amino acid ABC transporter permease GN=PE143B_0108915	2,47	2,01
107	A0A023C4U7	Phosphate-binding protein GN=PE143B_0124360	1,73	2,75
108	A0A023C7Z4	HTH-type transcriptional regulator BetI GN=betI	1,42	1,33
109	A0A023C6U7	SpoVR family protein GN=PE143B_0121045	2,19	1,90
110	A0A023CHF6	ShIB family hemolysin secretion/activation protein GN=PE143B_0103565	2,79	4,11
111	A0A023C5N4	Cytochrome c oxidase subunit 2 GN=PE143B_0122895	1,91	1,74
112	A0A023C558	Uncharacterized protein GN=PE143B_0123600	1,34	1,77
113	A0A023C6W0	Prephenate dehydratase GN=PE143B_0121880	1,16	2,36

114	A0A023C5M8	Uncharacterized protein GN=PE143B_0122965	1,42	1,44
115	A0A023C961	NAD-dependent dehydratase GN=PE143B_0117225	4,11	1,66
116	A0A023CF92	DNA-binding transcriptional regulator NtrC	ON	
117	A0A023CAX8	Phenylhydantoinase	ON	
118	A0A023CFS7	IMP dehydrogenase	ON	
119	A0A023C265	Uncharacterized protein	ON	
120	A0A023C4D1	CbbBc protein	ON	
121	A0A023C6S2	UPF0229 protein	ON	
122	A0A023CFW2	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	ON	
123	A0A023CDJ0	Uncharacterized protein	ON	
124	A0A023CHJ7	HecA family adhesin/hemagglutinin	ON	
125	A0A023C208	Allophanate hydrolase	ON	
126	A0A023CCA7	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	ON	
127	A0A023CGP7	Uncharacterized protein	ON	
128	A0A023CCW1	ABC transporter substrate-binding protein	ON	
129	A0A023CB54	Nitrate reductase	ON	
130	A0A023CEF5	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	ON	
131	A0A023CEU3	Enoyl-CoA hydratase	ON	
132	A0A023CA93	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	ON	
133	A0A023CB80	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	ON	
134	A0A023CFE4	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase (PhaC2) GN=PE143B_0104515	ON	

Table 2A. Lista de proteínas diferencialmente reprimidas en LBO vs. NEO en fase estacionaria y condiciones aerobias.

N	Uniprot	Descripción	Log2 (veces de cambio)	Log10 (P)
1	A0A023C7I3	Arginine deiminase GN=arca	-2,72	3,79
2	A0A023C7N8	Acetyl-CoA acetyltransferase GN=PE143B_0119495	-2,12	2,98
3	A0A023C9H7	4-aminobutyrate aminotransferase GN=PE143B_0116055	-2,36	3,49
4	A0A023C7K2	Ornithine carbamoyltransferase GN=PE143B_0120165	-2,50	5,83
5	A0A023CEB7	Acetyl-CoA acetyltransferase GN=PE143B_0105725	-2,14	2,36
6	A0A023CD56	Homogentisate 1,2-dioxygenase GN=hmgA	-6,14	2,10
7	A0A023CCV3	Fumarylacetoacetase GN=PE143B_0109020	-3,65	3,11
8	A0A023CAZ2	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase GN=PE143B_0113705	-4,75	3,03
9	A0A023C9N8	Succinate-semialdehyde dehydrogenase GN=gabD	-3,25	3,87
10	A0A023C5S4	Acyl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0123170	-3,05	4,08
11	A0A023CAP5	Branched-chain-amino-acid aminotransferase GN=PE143B_0113205	-1,13	3,05
12	A0A023CAT7	Dihydrolipoyl dehydrogenase GN=PE143B_0113210	-4,04	4,49
13	A0A023C4S1	Glutaminase GN=PE143B_0124820	-2,07	2,32
14	A0A023CAN8	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha GN=PE143B_0113225	-5,13	3,12
15	A0A023CGI6	Alcohol dehydrogenase GN=PE143B_0103270	-2,45	3,05
16	A0A023CB25	Isovaleryl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0113710	-4,70	3,79
17	A0A023C4T9	Aspartate ammonia-lyase GN=aspA	-1,87	2,06
18	A0A023C6Z0	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase GN=PE143B_0120340	-1,67	2,82
19	A0A023CB64	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase GN=PE143B_0113695	-4,86	2,42
20	A0A023C384	Sugar ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0127385	-2,28	1,97
21	A0A023CDX8	Aminotransferase GN=PE143B_0108575	-2,60	3,19
22	A0A023CB15	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex GN=PE143B_0113215	-3,80	4,63
23	A0A023CE26	3-ketoacyl-ACP reductase GN=PE143B_0105730	-1,04	3,39
24	A0A023C7K5	Succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase GN=PE143B_0119485	-1,94	3,49

25	A0A023CAX6	Gamma-carboxygeranoyl-CoA GN=PE143B_0113700	hydratase	-3,39	2,49
26	A0A023C6W1	3-hydroxyisobutyrate GN=PE143B_0120345	dehydrogenase	-3,03	3,66
27	A0A023CGE9	Probable phosphoketolase GN=PE143B_0103150		-2,78	1,86
28	A0A023CCY6	Methionine gamma-lyase GN=PE143B_0110375		-2,24	3,27
29	A0A023C422	Thiol peroxidase GN=tpx		-1,37	1,47
30	A0A023CD34	Dipicolinate synthase GN=PE143B_0109105		-1,90	1,50
31	A0A023C463	Aldehyde dehydrogenase GN=PE143B_0125635		-1,46	2,00
32	A0A023CGI8	Aldehyde dehydrogenase, GN=PE143B_0105310		-2,43	1,69
33	A0A023CE41	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0105710		-1,31	2,48
34	A0A023CGD1	Universal stress protein GN=PE143B_0103075		-2,42	2,12
35	A0A023CG92	4-hydroxyphenylpyruvate GN=PE143B_0102520	dioxygenase	-4,56	1,95
36	A0A023C8W7	Cell division protein FtsZ GN=ftsZ		-1,40	3,90
37	A0A023C8Y8	Cell envelope biogenesis protein OmpA GN=PE143B_0117665		-1,35	3,44
38	A0A023C4P2	Gamma-glutamylputrescine GN=PE143B_0124710	oxidoreductase	-2,39	1,32
39	A0A023CEG0	Membrane protein GN=PE143B_0106060		-4,17	4,41
40	A0A023C6Q4	Arginine N-succinyltransferase GN=PE143B_0122445		-1,24	1,60
41	A0A023C5D2	Superoxide dismutase GN=PE143B_0125285		-1,32	2,46
42	A0A023CGE4	Phosphoribosyl transferase GN=PE143B_0103070		-1,81	3,13
43	A0A023CGC4	Crotonase GN=PE143B_0102695		-1,87	1,51
44	A0A023CBA6	Uncharacterized protein GN=PE143B_0112550		-1,88	1,70
45	A0A023CED3	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase GN=PE143B_0105720		-1,60	3,02
46	A0A023CGH8	Universal stress protein GN=PE143B_0103275		-2,17	2,09
47	A0A023C4C1	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase GN=PE143B_0125325		-1,80	1,80
48	A0A023CAN4	Chemotaxis protein GN=PE143B_0114540		-1,05	3,21
49	A0A023C7A4	Uncharacterized protein GN=PE143B_0119945		-1,33	1,72
50	A0A023CBP3	Rhizopine-binding protein GN=PE143B_0113000		-1,07	1,88
51	A0A023CH72	Uncharacterized protein GN=PE143B_0103165		-2,42	2,16
52	A0A023C7G4	Carbamate kinase GN=PE143B_0120160		-2,16	2,45
53	A0A023C6D0	AMP-dependent synthetase GN=PE143B_0122545		-1,15	1,51
54	A0A023CEL1	Alcohol dehydrogenase GN=PE143B_0106840		-1,79	2,50

55	A0A023C6R1	Amino acid transporter GN=PE143B_0122470	-1,22	1,51
56	A0A023CCX1	Maleylacetoacetate isomerase GN=PE143B_0109025	-3,98	1,70
57	A0A023C705	GTPase Obg GN=obgE	-1,84	1,83
58	A0A023C9Y2	Carbon-nitrogen hydrolase GN=PE143B_0115340	-1,85	1,36
59	A0A023C5Q3	Catalase GN=katE	-4,17	3,47
60	A0A023C6D1	CDP-glucose 4,6-dehydratase GN=PE143B_0121940	-1,76	1,56
61	A0A023C4B5	Porphobilinogen deaminase GN=hemC	-1,12	1,45
62	A0A023CGF7	ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0105345	-1,26	1,30
63	A0A023C6T0	Amine oxidase GN=PE143B_0120965	-3,20	2,42
64	A0A023CE24	Putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase GN=phhB	-2,19	2,99
65	A0A023CBL4	5-dehydro-2-deoxygluconokinase GN=PE143B_0113030	-1,83	1,70
66	A0A023C7Y8	Rieske (2Fe-2S) protein GN=PE143B_0119165	-2,25	2,24
67	A0A023CGJ4	Uncharacterized protein GN=PE143B_0103055	-3,49	3,65
68	A0A023CG65	Enoyl-CoA hydratase GN=PE143B_0102685	-1,25	1,51
69	A0A023C7Z1	MFS transporter GN=PE143B_0118960	-1,60	2,55
70	A0A023CDE2	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0109440	-1,50	1,65
71	A0A023C453	50S ribosomal protein L28 GN=rpmB	-2,27	2,59
72	A0A023C1E2	Uncharacterized protein (Fragment), GN=PE143B_0130810	-4,32	3,01
73	A0A023CH66	Ornithine aminotransferase, GN=PE143B_0103140	-3,18	3,24
74	A0A023C596	30S ribosomal protein S17 GN=rpsQ	-1,71	1,98
75	A0A023C673	Peroxiredoxin OsmC GN=PE143B_0122830	-1,85	1,72
76	A0A023CBF3	ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0113095	-3,54	3,06
77	A0A023CFX7	30S ribosomal protein S6 GN=rpsF	-1,77	1,33
78	A0A023CF88	Uncharacterized protein GN=PE143B_0103925	-2,63	1,66
79	A0A023C1T1	Peptidase M24 GN=PE143B_0130085	-1,36	1,42
80	A0A023C7Z7	Ferredoxin GN=PE143B_0119170	-1,45	2,27
81	A0A023CHV5	Fis family transcriptional regulator GN=PE143B_0101895	-1,71	2,03
82	A0A023CDW7	Coproporphyrinogen-III oxidase GN=PE143B_0108075	-3,19	3,02
83	A0A023C871	Uncharacterized protein GN=PE143B_0118335	-1,99	1,47
84	A0A023CEP6	2-dehydro-3-deoxyphosphoactonate aldolase GN=kdsA	-1,52	1,47

85	A0A023C4D0	NAD-dependent dehydratase GN=PE143B_0125540	-1,93	1,88
86	A0A023C460	D-amino acid dehydrogenase GN=dadA	-2,68	2,46
87	A0A023C4W6	ATP-dependent DNA helicase RecG GN=recG	-2,24	2,95
88	A0A023CAB4	Peroxiredoxin GN=PE143B_0113965	-2,09	1,37
89	A0A023C3C6	Uncharacterized protein GN=PE143B_0127160	-1,15	1,33
90	A0A023CAN6	Uncharacterized protein GN=PE143B_0113900	-1,32	1,96
91	A0A023CEI5	ATP-dependent DNA helicase RecG GN=PE143B_0105830	-2,68	2,15
92	A0A023C470	Alanine racemase GN=alr	-3,08	2,37
93	A0A023C9S3	GTPase Der GN=der	-2,40	1,86
94	A0A023C5A4	50S ribosomal protein L29 GN=rpmC	-2,26	1,70
95	A0A023CC43	ATPase GN=PE143B_0111115	-1,83	2,12
96	A0A023C813	(Fe-S)-binding protein GN=PE143B_0119085	-2,47	2,47
97	A0A023C6Y7	LysR family transcriptional regulator GN=PE143B_0120335	-1,90	1,61
98	A0A023C4X3	LysR family transcriptional regulator GN=PE143B_0124465	-1,77	1,59
99	A0A023CGR9	Glycogen debranching protein GN=PE143B_0102100	-1,66	1,75
100	A0A023C4X9	Biopolymer transporter ExbB GN=PE143B_0124480	-2,90	1,47
101	A0A023CEF0	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase GN=dxr	-1,17	1,52
102	A0A023CGE8	60 kDa chaperonin	OFF	
103	A0A023C3E5	Asparagine synthase	OFF	
104	A0A023CBV3	Malonate decarboxylase subunit beta	OFF	
105	A0A023CE79	Phenylalanine 4-monooxygenase	OFF	
106	A0A023CB10	ABC transporter substrate-binding protein	OFF	
107	A0A023C1Q2	Pyruvate dehydrogenase E1 component	OFF	
108	A0A023CC60	Malonate decarboxylase subunit gamma	OFF	
109	A0A023CB79	Pyruvate dehydrogenase	OFF	
110	A0A023C4I3	Aldehyde dehydrogenase	OFF	

Tabla 3A. Lista de proteínas sobre-expresadas en fase estacionaria en medio de acumulación de PHA (NEO). Comparación en aerobiosis. NEOest. vs NEOexp.

N	Uniprot	Descripción	Log2 (veces de cambio)	Log10 (P)
1	A0A023CAQ4	Quinonprotein alcohol dehydrogenase, GN=PE143B_0113305	3,47	2,30
2	A0A023C9B3	Aconitate hydratase B, GN=PE143B_0116660, <i>acnB</i>	1,10	1,57
3	A0A023CAS1	Aldehyde dehydrogenase, GN=PE143B_0113335	2,40	2,33
4	A0A023CE49	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase, GN=PE143B_0105760	2,30	4,64
5	A0A023C7C0	Porin, GN=PE143B_0119975	2,13	4,73
6	A0A023C7I3	Arginine deiminase, GN= <i>arcA</i>	3,57	2,48
7	A0A023C584	Membrane protein GN=PE143B_0123645	2,47	3,58
8	A0A023C6P3	Malate synthase G, GN= <i>glcB</i>	3,05	2,52
9	A0A023CDI0	Electron transfer flavoprotein subunit beta, GN=PE143B_0107560	1,71	1,83
10	A0A023CE85	Phasin, GN=PE143B_0105765	1,78	2,80
11	A0A023C365	Acyl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0127635	2,18	2,62
12	A0A023C6R3	Acetyl-coenzyme A synthetase GN= <i>acsA</i>	2,40	1,55
13	A0A023CDE8	Enoyl-CoA hydratase GN=PE143B_0107660	3,77	4,12
14	A0A023CFF3	Malate dehydrogenase GN=PE143B_0104565	1,46	1,94
15	A0A023CEB7	Acetyl-CoA acetyltransferase GN=PE143B_0105725	1,48	1,39
16	A0A023C8Z7	Uncharacterized protein GN=PE143B_0117740	5,81	2,58
17	A0A023C519	Isocitrate lyase GN=PE143B_0123985	1,47	2,37
18	A0A023C734	Serine/threonine protein kinase GN=PE143B_0121055	5,22	3,31
19	A0A023CD39	Probable cytosol aminopeptidase GN= <i>pepA</i>	1,51	1,43
20	A0A023C3T0	Ethanol-active dehydrogenase/acetaldehyde-active reductase GN= <i>adhP</i>	4,69	3,01
21	A0A023CEE7	Elongation factor Ts GN= <i>tsf</i>	1,08	1,46
22	A0A023C7N8	Acetyl-CoA acetyltransferase GN=PE143B_0119495	1,96	2,81
23	A0A023CDC8	Electron transporter RnfB GN=PE143B_0107555	2,11	3,04
24	A0A023C9K3	Transporter GN=PE143B_0115865	2,66	3,52
25	A0A023CH10	Acetyl-CoA acetyltransferase GN=PE143B_0102675	1,96	4,27

26	A0A023CH52	Aldehyde dehydrogenase GN=PE143B_0100470	4,25	2,38
27	A0A023CFA7	3-ketoacyl-CoA thiolase GN=fadA	1,40	2,02
28	A0A023C670	Acetylornithine aminotransferase GN=argD	1,89	1,75
29	A0A023CG47	NADP-dependent oxidoreductase GN=PE143B_0102535	2,34	1,48
30	A0A023C8W9	Uncharacterized protein GN=PE143B_0117745	3,97	3,48
31	A0A023CEQ3	Leucine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0106585	5,21	2,63
32	A0A023CDT8	2-methylisocitrate lyase GN=prpB	3,09	2,06
33	A0A023CD72	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0108910	3,49	4,45
34	A0A023C743	Thioredoxin reductase GN=PE143B_0120505	3,11	3,59
35	A0A023C2Z2	Uncharacterized protein GN=PE143B_0127915	2,42	2,79
36	A0A023CE31	Phosphate acetyltransferase GN=PE143B_0105755	3,50	1,85
37	A0A023C9W8	2-isopropylmalate synthase GN=leuA	3,05	2,58
38	A0A023C8R8	Porin GN=PE143B_0116845	2,14	2,29
39	A0A023CE78	Glycoside hydrolase family 43 GN=PE143B_0105715	1,69	2,03
40	A0A023C4A6	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) GN=pckA	3,71	3,95
41	A0A023CED3	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase GN=PE143B_0105720	2,58	2,72
42	A0A023CAP5	Branched-chain-amino-acid aminotransferase GN=PE143B_0113205	1,47	2,24
43	A0A023C791	Fumarate hydratase class I GN=PE143B_0119840	1,45	2,05
44	A0A023CDA1	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase GN=PE143B_0107550	1,14	2,46
45	A0A023C404	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0127650	1,40	2,72
46	A0A023C698	Phosphoserine aminotransferase GN=serC	2,48	1,47
47	A0A023CDV4	Phosphoenolpyruvate synthase GN=PE143B_0107865	1,61	2,70
48	A0A023C6V0	Indole-3-glycerol phosphate synthase GN=trpC	1,71	2,11
49	A0A023CE26	3-ketoacyl-ACP reductase GN=PE143B_0105730	3,53	4,11
50	A0A023CG80	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA GN=arnA	1,61	2,20
51	A0A023C1M4	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase GN=argC	1,60	4,57
52	A0A023CFQ3	Glutamate synthase GN=gltB	2,37	1,65
53	A0A023C7K2	Ornithine carbamoyltransferase GN=PE143B_0120165	2,83	1,89
54	A0A023C960	Chaperone protein ClpB GN=clpB	1,41	1,84

55	A0A023CFL9	Poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein PhaF GN=PE143B_0104460	2,95	2,85
56	A0A023CFT0	Adenylosuccinate synthetase GN=purA	1,41	3,00
57	A0A023C3T1	Virulence factor SrfB GN=PE143B_0127920	1,92	2,78
58	A0A023C2Y5	Serine/threonine protein kinase GN=PE143B_0127905	2,79	2,75
59	A0A023CC97	Porin GN=PE143B_0111250	1,19	3,16
60	A0A023CHN2	Glutamate dehydrogenase GN=PE143B_0101200	1,81	1,37
61	A0A023CGJ5	Uncharacterized protein GN=PE143B_0105365	2,53	4,15
62	A0A023CCH7	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0111180	2,99	3,19
63	A0A023C7F0	Pyruvate kinase GN=PE143B_0119850	2,24	2,19
64	A0A023CID9	Endopeptidase La GN=PE143B_0101230	1,47	1,35
65	A0A023CEU1	ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0106440	3,34	5,06
66	A0A023C7X7	Phosphoglycerate kinase GN=pgk	2,52	3,57
67	A0A023CG44	Transcriptional regulator GN=PE143B_0102510	1,89	1,32
68	A0A023CF20	Amino acid ABC transporter GN=PE143B_0103965	3,95	2,18
69	A0A023C7T1	Uncharacterized protein GN=PE143B_0119575	1,31	1,90
70	A0A023C216	Serine--tRNA ligase GN=serS	1,94	1,82
71	A0A023CCE1	Dihydroxy-acid dehydratase GN=ilvD	1,65	2,05
72	A0A023C6W2	Anthranilate synthase component 1 GN=trpE	1,79	2,58
73	A0A023CEK9	RND transporter GN=PE143B_0106125	1,48	2,07
74	A0A023C6Z0	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase GN=PE143B_0120340	3,52	2,92
75	A0A023C4U2	Chemotaxis protein GN=PE143B_0126060	2,35	3,98
76	A0A023CA68	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=gapA	1,13	1,37
77	A0A023C5K8	Isocitrate dehydrogenase [NADP] GN=PE143B_0123940	3,19	2,06
78	A0A023CHM0	Serine hydroxymethyltransferase GN=glyA	3,41	2,82
79	A0A023C7B1	Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ GN=argJ	2,75	3,21
80	A0A023CAZ8	Glutamine--tRNA ligase GN=glnS	1,82	2,51
81	A0A023C5M9	Oligopeptidase A GN=PE143B_0122860	1,78	2,88
82	A0A023C8A5	Beta sliding clamp GN=PE143B_0118520	1,73	2,60
83	A0A023CF92	DNA-binding transcriptional regulator NtrC GN=glnG	3,52	1,46
84	A0A023CBK6	Chemotaxis protein GN=PE143B_0112980	2,50	4,11

85	A0A023C387	Acetyl-CoA hydrolase GN=PE143B_0127630	2,86	1,58
86	A0A023C6C1	NADP transhydrogenase subunit alpha GN=PE143B_0123160	3,42	3,87
87	A0A023CB85	Aminopeptidase N GN=pepN	1,94	1,41
88	A0A023CFB1	Uncharacterized protein GN=PE143B_0104025	2,42	2,40
89	A0A023C1X2	Membrane protein GN=PE143B_0130115	1,09	2,27
90	A0A023C8Q3	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase GN=murC	1,69	2,45
91	A0A023CG82	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase GN=PE143B_0102470	1,56	1,75
92	A0A023CEC3	Adenylate kinase GN=adk	3,77	2,14
93	A0A023CDM9	Uncharacterized protein GN=PE143B_0107595	4,69	3,64
94	A0A023CAG1	Uncharacterized protein GN=PE143B_0114235	1,61	1,50
95	A0A023CAZ4	Uncharacterized protein GN=PE143B_0113300	4,10	2,43
96	A0A023CFF5	Alpha-1,4 glucan phosphorylase GN=PE143B_0104265	2,37	2,61
97	A0A023CGD0	Protein HflC GN=PE143B_0105175	1,42	1,95
98	A0A023C6J9	Probable allantoinase GN= <i>alc</i>	3,41	1,61
99	A0A023CG65	Enoyl-CoA hydratase GN=PE143B_0102685	1,77	1,73
100	A0A023CGR2	Phosphoglucomutase GN=PE143B_0103390	3,08	1,66
101	A0A023C677	Membrane protein, GN=PE143B_0121735	1,73	2,38
102	A0A023CI61	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase GN= <i>hemL</i>	2,21	2,75
103	A0A023CI41	Cyclic nucleotide-binding protein, GN=PE143B_0100880	2,49	2,44
104	A0A023C7W8	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase GN=PE143B_0118900	1,68	2,02
105	A0A023CF54	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase, GN= <i>dapA</i>	1,69	2,38
106	A0A023CI80	Carbon starvation protein A, GN=PE143B_0101110	1,43	1,97
107	A0A023CCN2	S-transferase GN=PE143B_0109905	3,18	2,30
108	A0A023CD53	Peptidase inhibitor I42 GN=PE143B_0109205	1,32	3,32
109	A0A023C5S8	Catalase GN=PE143B_0123705	1,75	2,83
110	A0A023C860	Aldehyde dismutase	ON	
111	A0A023CGI6	Alcohol dehydrogenase GN=PE143B_0103270	ON	
112	A0A023CDR5	Methyl-citrate synthase, GN= PE143B_0107790; <i>prpC</i>	ON	
113	A0A023CF65	Aconitate hydratase GN=PE143B_0107425, <i>acnA</i>	ON	
114	A0A023C2S4	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase GN=PE143B_0128055	ON	

115	A0A023CHV0	Acetyl-coenzyme A synthetase GN= <i>acsA</i>	ON	
116	A0A023C7Z9	Sarcosine oxidase subunit alpha GN=PE143B_0119215	ON	
117	A0A023C6W1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase GN=PE143B_0120345	ON	
118	A0A023CCY6	Methionine gamma-lyase GN=PE143B_0110375	ON	
119	A0A023CC59	Glutamine synthetase GN=PE143B_0111190	ON	
120	A0A023CE41	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0105710	ON	
121	A0A023CCD3	Aldehyde dehydrogenase GN=PE143B_0110930	ON	
122	A0A023CCG2	Aminotransferase GN=PE143B_0111185	ON	
123	A0A023CAH4	ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0115140	ON	
124	A0A023C2M5	Cytochrome C GN=PE143B_0130185	ON	
125	A0A023CE88	Type I restriction enzyme R Protein GN=PE143B_0105820	ON	
126	A0A023C7Y4	Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0119000	ON	
127	A0A023CDE9	Aconitate hydratase GN=PE143B_0107795, <i>acnD</i>	ON	
128	A0A023CD01	ATPase GN=PE143B_0108880	ON	
129	A0A023C825	Serine hydroxymethyltransferase GN= <i>glyA</i>	ON	
130	A0A023CAR2	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate- binding protein GN=PE143B_0113280	ON	
131	A0A023CC33	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase GN=PE143B_0111065	ON	
132	A0A023C8P5	Long-chain fatty acid--CoA ligase GN=PE143B_0117750	ON	
133	A0A023CGH8	Universal stress protein GN=PE143B_0103275	ON	
134	A0A023C918	Peptide ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0116835	ON	
135	A0A023CAL1	NAD(P)H-quinone oxidoreductase GN=PE143B_0115110	ON	
136	A0A023C4J2	Nitrate reductase GN= <i>narZ</i>	ON	
137	A0A023C7A4	Uncharacterized protein GN=PE143B_0119945	ON	
138	A0A023C9P6	Cystine transporter subunit GN=PE143B_0116300	ON	
139	A0A023C737	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate- binding protein GN=PE143B_0121130	ON	
140	A0A023C401	Dipeptidase GN=PE143B_0127625	ON	
141	A0A023C7G4	Carbamate kinase GN=PE143B_0120160	ON	
142	A0A023C369	Acyl-CoA dehydrogenase, GN= <i>fadE</i>	ON	
143	A0A023CAU4	Molybdenum cofactor biosynthesis protein B GN=PE143B_0114225	ON	

144	A0A023C6D0	AMP-dependent synthetase GN=PE143B_0122545	ON	
145	A0A023CEL1	Alcohol dehydrogenase GN=PE143B_0106840	ON	
146	A0A023CFX4	Chemotaxis protein GN=PE143B_0105190	ON	
147	A0A023C8Q9	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase GN=murF	ON	
148	A0A023C4M4	3-isopropylmalate dehydrogenase GN=leuB	ON	
149	A0A023CDC1	Chemotaxis protein CheY GN=PE143B_0109340	ON	
150	A0A023CA19	Uncharacterized protein GN=PE143B_0114660	ON	
151	A0A023C7X9	Peptidase M19 GN=PE143B_0119070	ON	
152	A0A023CAV8	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0113315	ON	
153	A0A023CA81	Chemotaxis protein GN=PE143B_0113860	ON	
154	A0A023CF49	NADH dehydrogenase GN=PE143B_0107320	ON	
155	A0A023CEY6	Cysteine synthase GN=PE143B_0107415	ON	
156	A0A023C3A8	Isochorismatase GN=PE143B_0127025	ON	
157	A0A023C4B5	Porphobilinogen deaminase GN= <i>hemC</i>	ON	
158	A0A023C1V0	Aldo/keto reductase GN=PE143B_0130245	ON	
159	A0A023C754	Uncharacterized protein GN=PE143B_0120595	ON	
160	A0A023C712	Site-determining protein GN=PE143B_0121355	ON	
161	A0A023CB95	Diguanylate cyclase GN=PE143B_0112930	ON	
162	A0A023C4X7	Orotate phosphoribosyltransferase GN=pyrE	ON	
163	A0A023C4K4	6-phosphogluconolactonase GN=PE143B_0125215	ON	
164	A0A023CF21	Universal stress protein GN=PE143B_0107470	ON	
165	A0A023CA74	Uncharacterized protein, GN=PE143B_0115075	ON	
166	A0A023C7T7	ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0118990	ON	
167	A0A023CAN7	Thiosulfate transporter subunit GN=PE143B_0114130	ON	
168	A0A023CAQ7	LuxR family transcriptional regulator GN=PE143B_0113255	ON	
169	A0A023CAR8	Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0114075	ON	
170	A0A023C4P8	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase GN=asd	ON	
171	A0A023CCK1	Iron ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0111310	ON	
172	A0A023C5L5	Uncharacterized protein GN=PE143B_0122825	ON	
173	A0A023C3R8	Chemotaxis protein GN=PE143B_0126640	ON	

174	A0A023C2Y3	3-ketoacyl-ACP reductase GN= <i>fabG</i>	ON	
175	A0A023C5P0	Chemotaxis protein CheY GN=PE143B_0123045	ON	
176	A0A023C8H1	Uncharacterized protein GN=PE143B_0117890	ON	
177	A0A023C8M7	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate GN= <i>murD</i> ligase	ON	
178	A0A023C901	Glycerate dehydrogenase GN=PE143B_0117765	ON	
179	A0A023CC08	Membrane protein GN=PE143B_0110820	ON	
180	A0A023CIM5	Ribosome association toxin RatA GN=PE143B_0101695	ON	
181	A0A023C1T1	Peptidase M24 GN=PE143B_0130085	ON	
182	A0A023C974	Chemotaxis protein GN=PE143B_0116435	ON	
183	A0A023CFE4	Poly(R)-hydroxyalkanoic GN=PE143B_0104515 acid synthase	ON	
184	A0A023C9U6	Methionine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0116225	ON	
185	A0A023CDX2	(Fe-S)-binding protein GN=PE143B_0108100	ON	
186	A0A023C5C2	Keto-deoxy-phosphogluconate GN=PE143B_0125210 aldolase	ON	
187	A0A023CEP6	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase GN= <i>kdsA</i>	ON	
188	A0A023C1Q6	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit GN=PE143B_0130195	ON	
189	A0A023C8W8	Chemotaxis protein GN=PE143B_0116975	ON	
190	A0A023CAA3	Chemotaxis protein GN=PE143B_0115710	ON	
191	A0A023C643	Threonine aldolase GN=PE143B_0122415	ON	
192	A0A023C5E9	3-isopropylmalate dehydratase large subunit GN= <i>leuC</i>	ON	
193	A0A023CHF7	Acyl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0100730	ON	
194	A0A023CEH4	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate- binding protein GN=PE143B_0105970	ON	
195	A0A023CDQ4	Asp/Glu/hydantoin racemase GN=PE143B_0107730	ON	
196	A0A023CAY1	CysB family transcriptional regulator GN= <i>cysB</i>	ON	
197	A0A023CAX8	Phenylhydantoinase	ON	
198	A0A023CE66	Ferredoxin-NADP reductase GN=PE143B_0105900	ON	
199	A0A023C8N1	Bifunctional glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B GN=PE143B_0117505	ON	
200	A0A023CDF2	Ornithine carbamoyltransferase GN=PE143B_0109490	ON	
201	A0A023CG97	O-acetylhomoserine aminocarboxypropyl transferase GN=PE143B_0104820	ON	
202	A0A023CEE1	Oxidoreductase GN=PE143B_0105935	ON	
203	A0A023CFS7	IMP dehydrogenase GN=PE143B_0105265	ON	

204	A0A023CFG5	Glutamate synthase GN=PE143B_0104615	ON	
205	A0A023C4D1	CbbBc protein GN=PE143B_0125450	ON	
206	A0A023C9L8	RND transporter GN=PE143B_0115835	ON	
207	A0A023C5N4	Cytochrome c oxidase subunit 2 GN=PE143B_0122895	ON	
208	A0A023C6S2	UPF0229 protein PE143B_0121050 GN=PE143B_0121050	ON	
209	A0A023C823	Tryptophan synthase alpha chain GN=trpA	ON	
210	A0A023CED8	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] GN=PE143B_0105745	ON	
211	A0A023CFW2	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0105500	ON	
212	A0A023CDJ0	Uncharacterized protein GN=PE143B_0107610	ON	
213	A0A023CHJ7	HecA family adhesin/hemagglutinin GN=PE143B_0103560	ON	
214	A0A023C208	Allophanate hydrolase GN=PE143B_0129870	ON	
215	A0A023CFQ0	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase GN=PE143B_0104505	ON	
216	A0A023CCA7	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0111425	ON	
217	A0A023CGP7	Uncharacterized protein GN=PE143B_0103310	ON	
218	A0A023CCW1	ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0110260	ON	
219	A0A023CF86	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase GN= <i>gpml</i>	ON	

Tabla 4A. Lista de proteínas reprimidas en fase estacionaria en medio de acumulación de PHA (NEO). Comparación en aerobiosis. NEOest. vs NEOexp.

N	Uniprot	Descripción	Log2 (veces de cambio)	Log10 (P)
1	A0A023C5B1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta, GN= <i>rpoC</i>	-1,04	1,38
2	A0A023C5X4	50S ribosomal protein L10, GN= <i>rplJ</i>	-1,78	2,81
3	A0A023C587	30S ribosomal protein S4, GN= <i>rpsD</i>	-2,21	4,44
4	A0A023C5B5	50S ribosomal protein L, GN= <i>rplA</i>	-2,40	3,05
5	A0A023CHT5	Translation initiation factor IF-2 GN= <i>infB</i>	-1,48	3,30
6	A0A023C776	50S ribosomal protein L2, GN= <i>rplU</i>	-2,27	2,70
7	A0A023C5A5	50S ribosomal protein L3, GN= <i>rplC</i>	-1,92	3,25
8	A0A023CB32	Trigger factor, GN= <i>tig</i>	-2,00	2,10
9	A0A023CFS4	50S ribosomal protein L9, GN= <i>rplI</i>	-2,16	3,43
10	A0A023C9T2	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing], GN= <i>guaA</i>	-1,19	3,36
11	A0A023C585	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha, GN= <i>rpoA</i>	-1,38	1,79
12	A0A023C5A7	50S ribosomal protein L2, GN= <i>rplB</i>	-1,64	1,35
13	A0A023CAT0	ATP-dependent RNA helicase DeaD, GN= <i>deaD</i>	-1,84	3,39
14	A0A023C4S1	Glutaminase, GN=PE143B_0124820	-1,10	1,53
15	A0A023CEB4	30S ribosomal protein S2, GN= <i>rpsB</i>	-2,24	3,30
16	A0A023C4N5	Amidophosphoribosyl transferase, GN= <i>purF</i>	-1,08	2,35
17	A0A023C5A2	50S ribosomal protein L22, GN= <i>rplV</i>	-1,10	1,53
18	A0A023CEQ9	RNA polymerase-associated protein RapA, GN= <i>rapA</i>	-1,25	1,40
19	A0A023C859	Membrane protein insertase YidC, GN= <i>yidC</i>	-1,40	2,21
20	A0A023C5C0	50S ribosomal protein L1, GN= <i>rplK</i>	-1,88	3,17
21	A0A023CD32	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase GN=PE143B_0109400	-2,18	1,51
22	A0A023C9Z7	TonB-dependent receptor GN=PE143B_0115725	-1,50	2,03
23	A0A023C6B3	DNA gyrase subunit A GN= <i>gyrA</i>	-1,09	2,02
24	A0A023CAV9	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX GN= <i>clpX</i>	-1,55	3,57
25	A0A023C589	50S ribosomal protein L6 GN= <i>rplF</i>	-1,62	1,86

26	A0A023C5W5	50S ribosomal protein L4 GN=rplD	-1,63	1,43
27	A0A023C5W6	30S ribosomal protein S7 GN=rpsG	-2,12	2,86
28	A0A023C5A3	30S ribosomal protein S5 GN=rpsE	-2,24	2,24
29	A0A023C5B4	50S ribosomal protein L16 GN=rplP	-1,61	2,20
30	A0A023CAZ6	Lon protease GN=lon PE=2 SV=1	-1,62	3,08
31	A0A023C5V7	30S ribosomal protein S3 GN=rpsC	-1,93	2,19
32	A0A023CAL9	Lipoprotein GN=PE143B_0114465	-1,98	2,21
33	A0A023CHR6	Chaperone protein DnaJ GN=dnaJ	-2,75	2,76
34	A0A023CA16	30S ribosomal protein S16 GN=rpsP	-1,58	3,14
35	A0A023C5T9	30S ribosomal protein S13 GN=rpsM	-1,91	2,92
36	A0A023C757	Ubiquinol oxidase subunit 2 GN=PE143B_0120630	-1,09	1,32
37	A0A023C9X7	Histidine--tRNA ligase GN=hisS	-1,14	2,37
38	A0A023CFR6	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit GN=hisZ	-1,12	2,05
39	A0A023C590	50S ribosomal protein L15 GN=rplO	-2,75	3,31
40	A0A023CHZ4	D-alanyl-D-alanine GN=PE143B_0100585	-1,08	1,29
41	A0A023C5U5	50S ribosomal protein L18 GN=rplR	-2,29	3,73
42	A0A023CFJ8	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU GN=hslU	-1,33	2,03
43	A0A023C482	Transcription accessory protein GN=PE143B_0125360	-1,81	1,93
44	A0A023CFT2	23S rRNA (guanosine-2'-O-)-methyltransferase RlmB GN=rlmB	-1,32	2,33
45	A0A023C8Y2	30S ribosomal protein S20 GN=rpsT	-1,55	2,40
46	A0A023CG72	Bifunctional protein PutA GN=putA	-3,06	2,60
47	A0A023CFY7	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase GN=PE143B_0105630	-1,08	2,55
48	A0A023CAR3	Succinate dehydrogenase GN=PE143B_0114050	-1,02	1,60
49	A0A023C5B6	50S ribosomal protein L23 GN=rplW	-3,02	3,48
50	A0A023CF22	DNA topoisomerase 1 GN=topA	-1,36	1,72
51	A0A023C578	50S ribosomal protein L17 GN=rplQ	-2,32	3,09
52	A0A023C9U3	Protein translocase subunit SecD GN=secD	-1,26	1,98
53	A0A023C599	30S ribosomal protein S14 GN=rpsN	-2,49	3,24
54	A0A023C2L8	50S ribosomal protein L13 GN=rplM	-2,96	2,48
55	A0A023C595	30S ribosomal protein S8 GN=rpsH	-2,68	2,61

56	A0A023CA39	Copper resistance protein CopB GN=PE143B_0114590	-1,39	1,58
57	A0A023C8E7	RND transporter GN=PE143B_0117870	-4,63	1,84
58	A0A023C453	50S ribosomal protein L28 GN=rpmB	-2,92	2,58
59	A0A023C7D2	Tol-Pal system protein TolQ GN=tolQ	-1,35	2,96
60	A0A023C592	50S ribosomal protein L14 GN=rplN	-2,16	3,53
61	A0A023C4Q2	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta GN=accD	-1,03	1,54
62	A0A023C470	Alanine racemase GN=alr	-2,67	1,63
63	A0A023CDE2	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0109440	-2,60	2,39
64	A0A023CFI7	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE GN=ubiE	-1,35	1,78
65	A0A023C9R7	Cro/CI family transcriptional regulator GN=PE143B_0115305	-1,66	2,13
66	A0A023CEZ7	ABC transporter ATPase GN=PE143B_0107465	-1,64	2,16
67	A0A023C591	50S ribosomal protein L30 GN=rpmD	-1,98	1,42
68	A0A023C6R1	Amino acid transporter GN=PE143B_0122470	-2,24	3,05
69	A0A023CB09	Hemolysin D GN=PE143B_0113780	-2,24	2,25
70	A0A023C6I4	Probable M18 family aminopeptidase 2 GN=apeB	-1,24	1,41
71	A0A023CFQ8	DNA topoisomerase 4 subunit B GN=parE	-1,77	3,17
72	A0A023C5A6	30S ribosomal protein S10 GN=rpsJ	-2,50	4,10
73	A0A023C9X8	10 kDa chaperonin GN=groS	-1,40	1,52
74	A0A023C7Y0	ATP-dependent RNA helicase RhlE GN=rhlE	-2,07	2,64
75	A0A023CHX0	Uncharacterized protein GN=PE143B_0101970	-1,26	2,48
76	A0A023C5I9	50S ribosomal protein L20 GN=rplT	-2,95	3,36
77	A0A023CGL0	DNA-binding protein GN=PE143B_0105440	-1,31	1,32
78	A0A023C5C3	50S ribosomal protein L7/L12 GN=rplL	-1,88	2,06
79	A0A023CFT9	Glycosyltransferase GN=PE143B_0104940	-2,07	1,61
80	A0A023C9V7	50S ribosomal protein L19 GN=rplS	-1,66	1,96
81	A0A023C1J9	30S ribosomal protein S9 GN=rpsI	-1,77	3,36
82	A0A023C9S3	GTPase Der GN=der	-3,98	3,70
83	A0A023CIJ8	30S ribosomal protein S15 GN=rpsO	-1,24	1,50
84	A0A023C5A0	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	-2,39	1,76
85	A0A023CA41	Uncharacterized protein GN=PE143B_0115610	-2,22	2,20

86	A0A023CB01	Uncharacterized protein GN=PE143B_0113575	-1,16	1,42
87	A0A023C4Y6	Energy transducer TonB GN=PE143B_0124470	-3,44	3,34
88	A0A023CIM4	Penicillin-binding protein 1B GN=PE143B_0101965	-2,27	1,85
89	A0A023C867	ATP synthase epsilon chain GN=atpC	-1,44	2,70
90	A0A023C703	50S ribosomal protein L27 GN=rpmA	-2,61	2,66
91	A0A023CFZ8	TonB-dependent receptor GN=PE143B_0102060	-3,33	1,64
92	A0A023CFX7	30S ribosomal protein S6 GN=rpsF	-2,73	2,11
93	A0A023CHY9	Ribosome-binding factor A GN=rbfA	-1,94	1,89
94	A0A023CHR0	Outer membrane protein assembly factor BamE GN=bamE	-1,58	1,62
95	A0A023C6B4	Glucose-1-phosphate GN=PE143B_0121935	-3,97	1,40
96	A0A023CBW8	Porin GN=PE143B_0111810	-3,43	1,99
97	A0A023C8X0	Flavodoxin GN=PE143B_0116930	-1,61	2,13
98	A0A023C598	30S ribosomal protein S11 GN=rpsK	-2,31	2,59
99	A0A023C6K8	50S ribosomal protein L32 GN=rpmF	-3,40	1,65
100	A0A023CCF3	ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0111535	-2,86	3,52
101	A0A023C5A9	30S ribosomal protein S12 GN=rpsL	-2,44	2,10
102	A0A023C4T9	Aspartate ammonia-lyase GN=aspA	-2,73	2,68
103	A0A023C8V7	Ligand-gated channel protein GN=PE143B_0116925	-4,33	2,52
104	A0A023C4X9	Biopolymer transporter ExbB GN=PE143B_0124480	-3,94	2,83
105	A0A023C6H5	Peptide synthase PvdL GN=PE143B_0121285	OFF	
106	A0A023C8A9	Ornithine monooxygenase PvdA GN=PE143B_0117850	OFF	

Tabla 5A. Lista de proteínas sobre-expresadas en condiciones aeróbicas vs. microaeróbicas en medio NEO. NEOA. vs NEOM.

N	Uniprot	Descripción	Log2 (veces de cambio)	Log10 (P)
1	A0A023CAQ4	Quinonprotein alcohol dehydrogenase GN=PE143B_0113305	3,27	2,40
2	A0A023CAS1	Aldehyde dehydrogenase GN=PE143B_0113335	1,90	2,34
3	A0A023CE49	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase GN=PE143B_0105760	1,37	2,69
4	A0A023C7C0	Porin GN=PE143B_0119975	3,14	3,93
5	A0A023C584	Membrane protein GN=PE143B_0123645	1,36	1,92
6	A0A023CFK1	Glutamine synthetase GN=glnA	1,14	2,99
7	A0A023CE85	Phasin GN=PE143B_0105765	2,17	2,17
8	A0A023C6R3	Acetyl-coenzyme A synthetase GN=acsA	2,72	2,07
9	A0A023CEB7	Acetyl-CoA acetyltransferase GN=PE143B_0105725	1,46	1,90
10	A0A023C8Z7	Uncharacterized protein GN=PE143B_0117740	2,80	2,21
11	A0A023C734	Serine/threonine protein kinase GN=PE143B_0121055	6,63	3,69
12	A0A023C3T0	Ethanol-active dehydrogenase/acetalddehyde-active reductase GN=adhP	2,24	2,46
13	A0A023C9K3	Transporter GN=PE143B_0115865	1,70	2,15
14	A0A023C8E2	Pyruvate carboxylase subunit B GN=PE143B_0118800	2,19	2,92
15	A0A023C8W9	Uncharacterized protein GN=PE143B_0117745	2,69	2,03
16	A0A023CEQ3	Leucine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0106585	4,19	3,23
17	A0A023CD72	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0108910	3,32	3,85
18	A0A023C8R8	Porin GN=PE143B_0116845	2,71	3,17
19	A0A023C404	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0127650	1,16	1,81
20	A0A023CF65	Aconitate hydratase GN=PE143B_0107425	3,34	2,59
21	A0A023CFQ3	Glutamate synthase GN=gltB	1,59	1,56
22	A0A023C887	Quinone oxidoreductase GN=PE143B_0118420	1,40	1,90
23	A0A023CFL9	Poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein PhaF GN=PE143B_0104460	2,20	2,41
24	A0A023C8G1	Pyruvate carboxylase subunit A GN=PE143B_0118795	1,89	1,53
25	A0A023C401	Dipeptidase GN=PE143B_0127625	1,69	1,56

26	A0A023C9P6	Cystine transporter subunit GN=PE143B_0116300	1,54	3,48
27	A0A023C8Z2	Peptide ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0116840	1,77	1,74
28	A0A023CC97	Porin GN=PE143B_0111250	2,17	2,77
29	A0A023CCH7	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0111180	1,56	1,91
30	A0A023CID9	Endopeptidase La GN=PE143B_0101230	1,95	1,78
31	A0A023CEU1	ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0106440	4,03	2,37
32	A0A023CE91	Phosphoenolpyruvate carboxylase GN=ppc	1,96	1,90
33	A0A023CF20	Amino acid ABC transporter GN=PE143B_0103965	3,15	1,75
34	A0A023C816	Tryptophan synthase beta chain GN=trpB	2,66	1,70
35	A0A023CAR2	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0113280	2,82	3,00
36	A0A023C6R2	Pyrroloquinoline-quinone synthase GN=pqqC	1,09	2,43
37	A0A023C2M5	Cytochrome C GN=PE143B_0130185	2,28	1,35
38	A0A023CE99	Multidrug transporter AcrB GN=PE143B_0106130	3,92	1,45
39	A0A023CI20	Acetolactate synthase GN=PE143B_0101980	1,23	1,71
40	A0A023C918	Peptide ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0116835	1,48	2,72
41	A0A023C3W9	Succinate-semialdehyde dehydrogenase GN=PE143B_0126370	2,46	5,83
42	A0A023CGI6	Alcohol dehydrogenase GN=PE143B_0103270	1,52	2,39
43	A0A023C6Z0	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase GN=PE143B_0120340	2,90	4,57
44	A0A023C5K8	Isocitrate dehydrogenase [NADP] GN=PE143B_0123940	1,40	1,30
45	A0A023CEC4	Chemotaxis protein CheW GN=PE143B_0108840	1,24	3,16
46	A0A023C8Q9	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase GN=murF	1,48	2,66
47	A0A023CC33	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase GN=PE143B_0111065	1,62	1,56
48	A0A023C678	Transaldolase GN=tal	1,72	1,31
49	A0A023C737	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0121130	3,02	3,16
50	A0A023CDQ4	Asp/Glu/hydantoin racemase GN=PE143B_0107730	1,13	3,25
51	A0A023C4K4	6-phosphogluconolactonase GN=PE143B_0125215	2,17	2,14
52	A0A023CBK6	Chemotaxis protein GN=PE143B_0112980	4,76	3,20
53	A0A023C6C1	NADP transhydrogenase subunit alpha GN=PE143B_0123160	1,39	1,87
54	A0A023CFB1	Uncharacterized protein GN=PE143B_0104025	1,47	1,42

55	A0A023C4N6	Peptidoglycan-binding protein GN=PE143B_0124640	1,12	1,72
56	A0A023CGE1	Channel protein TolC GN=PE143B_0105020	1,47	2,52
57	A0A023CIT6	Acetolactate synthase 3 regulatory subunit GN=ilvH	1,07	1,74
58	A0A023C4B6	Uncharacterized protein GN=PE143B_0125520	1,16	1,73
59	A0A023CEC3	Adenylate kinase GN=adk	1,82	2,57
60	A0A023C9L8	RND transporter GN=PE143B_0115835	2,69	2,40
61	A0A023C526	Chemotaxis protein CheY GN=PE143B_0125845	1,27	1,39
62	A0A023C6D7	Acyl-CoA thioesterase GN=PE143B_0122070	2,52	1,55
63	A0A023CDM9	Uncharacterized protein GN=PE143B_0107595	1,75	1,88
64	A0A023CFJ7	Thioredoxin GN=PE143B_0104755	1,02	1,31
65	A0A023C901	Glycerate dehydrogenase GN=PE143B_0117765	2,04	1,62
66	A0A023CED1	Uncharacterized protein GN=PE143B_0106140	1,71	3,47
67	A0A023CAZ4	Uncharacterized protein GN=PE143B_0113300	3,15	2,61
68	A0A023CAF7	Cytochrome C GN=PE143B_0114165	1,64	1,35
69	A0A023CDC1	Chemotaxis protein CheY GN=PE143B_0109340	2,66	2,93
70	A0A023CD01	ATPase GN=PE143B_0108880	2,26	1,75
71	A0A023C1P9	Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit III GN=PE143B_0130275	1,34	1,30
72	A0A023CED8	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] GN=PE143B_0105745	1,42	1,33
73	A0A023CA74	Uncharacterized protein GN=PE143B_0115075	1,33	2,32
74	A0A023CI61	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase GN=hemL	1,63	2,63
75	A0A023CGC0	3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0102670	1,78	2,71
76	A0A023CDL3	Oxidoreductase GN=PE143B_0107720	1,93	2,26
77	A0A023CB30	LysR family transcriptional regulator GN=PE143B_0113735	3,72	1,31
78	A0A023C265	Uncharacterized protein GN=PE143B_0129350	1,86	2,67
79	A0A023CI80	Carbon starvation protein A GN=PE143B_0101110	2,37	4,88
80	A0A023CCN2	S-transferase GN=PE143B_0109905	1,18	1,54
81	A0A023CFC2	DeoR family transcriptional regulator GN=PE143B_0103935	2,86	3,11
82	A0A023CE46	Dehydrogenase GN=PE143B_0108380	1,46	1,33
83	A0A023CD53	Peptidase inhibitor I42 GN=PE143B_0109205	1,23	1,51
84	A0A023CGF4	Universal stress protein GN=PE143B_0103175	1,59	1,45

85	A0A023C558	Uncharacterized protein GN=PE143B_0123600	1,43	2,25
86	A0A023C7K7	Histidine kinase GN=PE143B_0119465	2,75	2,58
87	A0A023C4H0	Glutathione S-transferase GN=PE143B_0125135	2,65	2,08
88	A0A023CCJ4	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0111370	1,60	1,70
89	A0A023C3Z1	Chemotaxis protein CheY GN=PE143B_0126075	1,40	2,34
90	A0A023C860	Aldehyde dismutase GN=PE143B_0119230	ON	
91	A0A023CFT8	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0105325	ON	
92	A0A023C7Z9	Sarcosine oxidase subunit alpha GN=PE143B_0119215	ON	
93	A0A023C6W1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase GN=PE143B_0120345	ON	
94	A0A023CCY6	Methionine gamma-lyase GN=PE143B_0110375	ON	
95	A0A023C825	Serine hydroxymethyltransferase GN=glyA	ON	
96	A0A023CGH8	Universal stress protein GN=PE143B_0103275	ON	
97	A0A023C6D0	AMP-dependent synthetase GN=PE143B_0122545	ON	
98	A0A023CFX4	Chemotaxis protein GN=PE143B_0105190	ON	
99	A0A023C7X9	Peptidase M19 GN=PE143B_0119070	ON	
100	A0A023CA81	Chemotaxis protein GN=PE143B_0113860	ON	
101	A0A023C7T7	ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0118990	ON	
102	A0A023CAR8	Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0114075	ON	
103	A0A023C2Y3	3-ketoacyl-ACP reductase GN=fabG	ON	
104	A0A023C8H1	Uncharacterized protein GN=PE143B_0117890	ON	
105	A0A023C8W8	Chemotaxis protein GN=PE143B_0116975	ON	
106	A0A023CAA3	Chemotaxis protein GN=PE143B_0115710	ON	
107	A0A023CF92	DNA-binding transcriptional regulator NtrC GN=glnG	ON	
108	A0A023CEH4	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0105970	ON	
109	A0A023CAX8	Phenylhydantoinase GN=PE143B_0113420	ON	
110	A0A023CEE1	Oxidoreductase GN=PE143B_0105935	ON	
111	A0A023CFS7	IMP dehydrogenase GN=PE143B_0105265	ON	
112	A0A023C5N4	Cytochrome c oxidase subunit 2 GN=PE143B_0122895	ON	
113	A0A023C6S2	UPF0229 protein PE143B_0121050 GN=PE143B_0121050	ON	
114	A0A023CFW2	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0105500	ON	

115	A0A023CDJ0	Uncharacterized protein GN=PE143B_0107610	ON	
116	A0A023C208	Allophanate hydrolase GN=PE143B_0129870	ON	
117	A0A023CFQ0	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase GN=PE143B_0104505	ON	
118	A0A023CCA7	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0111425	ON	
119	A0A023CGP7	Uncharacterized protein GN=PE143B_0103310	ON	
120	A0A023CCW1	ABC transporter substrate-binding protein GN=PE143B_0110260	ON	

Tabla 6A. Lista de proteínas reprimidas en condiciones aeróbicas vs. microaeróbicas en medio NEO. (NEOA vs. NEOM)

N	Uniprot	Descripción	Log2 (veces de cambio)	Log10 (P)
1	A0A023CE87	Flagellin GN=PE143B_0108635	-1,06	2,07
2	A0A023C5X4	50S ribosomal protein L10 GN=rplJ	-1,41	2,55
3	A0A023C587	30S ribosomal protein S4 GN=rpsD	-1,26	3,13
4	A0A023C5B5	50S ribosomal protein L1 GN=rplA	-1,24	1,85
5	A0A023C776	50S ribosomal protein L21 GN=rplU	-1,64	2,32
6	A0A023C5A5	50S ribosomal protein L3 GN=rplC	-1,22	4,01
7	A0A023CFS4	50S ribosomal protein L9 GN=rplI	-1,15	2,25
8	A0A023C9N8	Succinate-semialdehyde dehydrogenase GN=gabD	-1,32	1,51
9	A0A023C9H7	4-aminobutyrate aminotransferase GN=PE143B_0116055	-1,07	1,31
10	A0A023C5A7	50S ribosomal protein L2 GN=rplB	-1,05	2,45
11	A0A023CAT0	ATP-dependent RNA helicase DeaD GN=deaD	-1,03	2,05
12	A0A023C4S1	Glutaminase GN=PE143B_0124820	-2,49	2,08
13	A0A023C4Z3	Isocitrate dehydrogenase GN=PE143B_0123945	-1,47	2,47
14	A0A023CHV7	GTPase GN=PE143B_0101660	-1,15	2,21
15	A0A023CEB4	30S ribosomal protein S2 GN=rpsB	-1,16	2,15
16	A0A023C4N5	Amidophosphoribosyltransferase GN=purF	-1,03	2,31
17	A0A023C5C0	50S ribosomal protein L11 GN=rplK	-1,56	2,60
18	A0A023CD32	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase GN=PE143B_0109400	-2,15	1,53
19	A0A023C4R4	Translation initiation factor IF-3 GN=infC	-1,27	1,93
20	A0A023C5W5	50S ribosomal protein L4 GN=rplD	-1,03	1,70
21	A0A023C5W6	30S ribosomal protein S7 GN=rpsG	-1,17	2,00
22	A0A023C705	GTPase Obg GN=obgE	-2,84	2,53
23	A0A023C4D0	NAD-dependent dehydratase GN=PE143B_0125540	-1,24	1,32
24	A0A023CBF6	Saccharopine dehydrogenase GN=PE143B_0111640	-1,05	1,37
25	A0A023C5S4	Acyl-CoA dehydrogenase GN=PE143B_0123170	-1,33	2,43
26	A0A023C5A3	30S ribosomal protein S5 GN=rpsE	-1,19	1,67

27	A0A023C5B4	50S ribosomal protein L16 GN=rplP	-1,39	3,34
28	A0A023C4X2	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase GN=PE143B_0124430	-1,24	1,68
29	A0A023C5V7	30S ribosomal protein S3 GN=rpsC	-1,79	2,29
30	A0A023CHR6	Chaperone protein DnaJ GN=dnaJ	-1,29	1,29
31	A0A023CA16	30S ribosomal protein S16 GN=rpsP	-1,39	2,61
32	A0A023C5T9	30S ribosomal protein S13 GN=rpsM	-1,27	3,71
33	A0A023CC09	3-hydroxybutyrate dehydrogenase GN=PE143B_0112055	-2,35	1,98
34	A0A023C757	Ubiquinol oxidase subunit 2 GN=PE143B_0120630	-1,52	1,83
35	A0A023C590	50S ribosomal protein L15 GN=rplO	-1,54	2,62
36	A0A023C5U5	50S ribosomal protein L18 GN=rplR	-1,30	3,19
37	A0A023C4Q7	O-succinylhomoserine sulfhydrylase GN=metZ	-1,63	1,95
38	A0A023C482	Transcription accessory protein GN=PE143B_0125360	-1,37	1,34
39	A0A023C8Y2	30S ribosomal protein S20 GN=rpsT	-1,19	2,02
40	A0A023C596	30S ribosomal protein S17 GN=rpsQ	-1,91	2,39
41	A0A023C378	Biopolymer transporter ExbB GN=PE143B_0128955	-1,41	1,60
42	A0A023C5B6	50S ribosomal protein L23 GN=rplW	-1,66	2,25
43	A0A023C7B7	Cold-shock protein GN=PE143B_0119990	-1,60	1,94
44	A0A023C578	50S ribosomal protein L17 GN=rplQ	-1,17	2,26
45	A0A023C2L8	50S ribosomal protein L13 GN=rplM	-2,17	1,86
46	A0A023C595	30S ribosomal protein S8 GN=rpsH	-1,61	2,32
47	A0A023CDW7	Coproporphyrinogen-III oxidase GN=PE143B_0108075	-2,67	1,94
48	A0A023C453	50S ribosomal protein L28 GN=rpmB	-3,54	2,83
49	A0A023CDZ1	Transcriptional regulator GN=PE143B_0108070	-1,99	2,07
50	A0A023C470	Alanine racemase GN=alr	-3,22	2,02
51	A0A023C591	50S ribosomal protein L30 GN=rpmD	-1,52	1,44
52	A0A023C5A6	30S ribosomal protein S10 GN=rpsJ	-1,39	2,83
53	A0A023C7Y0	ATP-dependent RNA helicase RhIE GN=rhIE	-1,57	2,16
54	A0A023C5I9	50S ribosomal protein L20 GN=rplT	-1,96	3,90
55	A0A023C5U9	50S ribosomal protein L24 GN=rplX	-2,77	2,23
56	A0A023C9V7	50S ribosomal protein L19 GN=rplS	-1,46	1,94
57	A0A023C460	D-amino acid dehydrogenase GN=dadA	-2,38	1,51

58	A0A023C9S3	GTPase Der GN=der	-3,11	3,06
59	A0A023CCX2	N(5)-hydroxyornithine transformylase PvdF GN=PE143B_0110350	-2,49	1,65
60	A0A023C4X3	LysR family transcriptional regulator GN=PE143B_0124465	-2,00	1,86
61	A0A023C5A0	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	-1,26	1,29
62	A0A023C4Y6	Energy transducer TonB GN=PE143B_0124470	-2,80	3,00
63	A0A023CEC2	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase GN=lpxD	-2,91	2,36
64	A0A023CAM1	Manganese ABC transporter ATP-binding protein GN=PE143B_0115160	-1,76	2,03
65	A0A023C1E2	Uncharacterized protein (Fragment) GN=PE143B_0130810	-3,10	2,44
66	A0A023CE25	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase GN=purN	-2,10	2,80
67	A0A023C703	50S ribosomal protein L27 GN=rpmA	-1,82	2,04
68	A0A023C598	30S ribosomal protein S11 GN=rpsK	-1,30	1,89
69	A0A023CF88	Uncharacterized protein GN=PE143B_0103925	-2,09	1,35
70	A0A023C5A9	30S ribosomal protein S12 GN=rpsL	-1,51	1,97
71	A0A023C4E8	Thioesterase GN=PE143B_0125485	-1,48	1,39
72	A0A023C8V7	Ligand-gated channel protein GN=PE143B_0116925	-2,86	1,72
73	A0A023C4X9	Biopolymer transporter ExbB GN=PE143B_0124480	-4,86	2,63
74	A0A023C1C4	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta (Fragment) GN=PE143B_0131010	OFF	
75	A0A023C6H5	Peptide synthase	OFF	
76	A0A023C8A9	Ornithine monooxygenase	OFF	
77	A0A023C6H3	2,4-diaminobutyrate 4-aminotransferase	OFF	

BIBLIOGRAFÍA

- . Aebi H (1984) Catalase in vitro. In: Parker L (ed) *Methods in enzymology*. Academic Press, London, pp 121–126
- . Aldor, I. S., Keasling, J. D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current opinion in biotechnology*, 14(5), 475-483.
- . Anderson, A. J., Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450-472. doi: 10.1128/MMBR.54.4.450-472.1990.
- . Andrady, A. L. (2015). *The plastic in the environment: challenges for society, science and engineering*. Royal Society of Chemistry.
- . Ayub N.D., Pettinari MJ, Ruiz JA, López NI (2004) A polyhydroxybutyrate- producing *Pseudomonas sp.* isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Curr Microbiol* 3:170–174. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4254-2>.
- . Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Méndez, B. S., López, N. I. (2006). Impaired polyhydroxybutyrate biosynthesis from glucose in *Pseudomonas sp.* 14-3 is due to a defective β -ketothiolase gene. *FEMS microbiology letters*, 264(1), 125-131.
- . Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Méndez, B. S., López, N. I. (2007). The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*, 58(3), 240-248.
- . Ayub, N. D., Tribelli, P. M., López, N. I. (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.
- . Blunt, W., Dartailh, C., Sparling, R., Gapes, D. J., Levin, D. B., and Cicek, N. (2019). Development of high cell density cultivation strategies for improved medium chain length Polyhydroxyalkanoate productivity using *Pseudomonas putida* LS46. *Bioengineering* 6: E89. doi: 10.3390/bioengineering6040089.

- . Bradford, Marion M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, no. 1-2: 248-254.
- . Brämer, C. O., Silva, L. F., Gomez, J. G. C., Priefert, H., Steinbüchel, A. (2002). Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101T and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Applied and environmental microbiology*, 68(1), 271-279.
- . Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 6(1), 29-37. <https://doi.org/10.1007/BF00500839>.
- . Brigham, C. J., Speth, D. R., Rha, C., Sinskey, A. J. (2012). Whole-genome microarray and gene deletion studies reveal regulation of the polyhydroxyalkanoate production cycle by the stringent response in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and environmental microbiology*, 78(22), 8033-8044
- . Brown, B., Immethun, C., Wilkins, M., Saha, R. (2022). Biotechnical applications of phasins: Small proteins with large potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 158, 112129.
- . Campos, V. L., Valenzuela, C., Yarza, P., Kämpfer, P., Vidal, R., Zaror, C., Rosselló-Móra, R. (2010). *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama Desert. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(4), 193-197
- . Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., ... Díaz, E. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology and molecular biology reviews*, 73(1), 71-133.
- . Castillo, T., Flores, C., Segura, D., Espín, G., Sanguino, J., Cabrera, E., ... Peña, C. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) of high and ultra-high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(7), 1809-1816.
- . Catone MV (2013) Identificación y análisis de los genes asociados al metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas extremaustralis*. (Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias

Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires). <http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesisn5288>.

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

. Clarke, P. H. (1982). Versatility and metabolism of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*, 46(1), 65-85. <https://doi.org/10.1128/MMBR.46.1.65-85.1982>.

. Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemical society reviews*, 38(8), 2434-2446.

. Costa CS, Pezzoni M, Fernández RO, Pizarro RA (2010) Role of the quorum sensing mechanism in the response of *Pseudomonas* to lethal and sublethal UVA irradiation. *Photochem Photobiol* 86:1334–1342. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00800>.

. Dawes, E. A., Senior, P. J. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Advances in microbial physiology*, 10, 135-266.

. De Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J. L., Prieto, M. A. (2010). The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environmental Microbiology*, 12(1), 207-221.

. Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D. (2001). Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental microbiology*, 3(10), 649-657.

. De Maayer P, Anderson D, Cary C, Cowan DA (2014) Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Rep* 15:508–517

. De Mello, A. F. M., de Souza Vandenberghe, L. P., Machado, C. M. B., Valladares-Diestra, K. K., de Carvalho, J. C., Soccol, C. R. (2022). Polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* in a corn biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 128537.

- . Diard, S., Carlier, J. P., Ageron, E., Grimont, P. A., Langlois, V., Guérin, P., Bouvet, O. M. (2002). Accumulation of poly (3-hydroxybutyrate) from octanoate in different *Pseudomonas* belonging to the rRNA homology group I. *Systematic and applied microbiology*, 25(2), 183-188.
- . Di Martino, C., López, N. I., Raiger Iustman, L. J. (2012). Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67, 15-20.
- . Di Martino, C., Catone, M. V., López, N. I., Raiger Iustman, L. J. (2014). Polyhydroxyalkanoate synthesis affects biosurfactant production and cell attachment to hydrocarbons in *Pseudomonas* sp. KA-08. *Current microbiology*, 68, 735-742.
- . Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Okon, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology*, 28(9), 871-879.
- . Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J., 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 414-424.
- . Dolan, S. K., Wijaya, A., Geddis, S. M., Spring, D. R., Silva-Rocha, R., Welch, M. (2018). Loving the poison: the methylcitrate cycle and bacterial pathogenesis. *Microbiology*, 164(3), 251-259.
- . Fibach-Paldi, S., Burdman, S., Okon, Y. (2012). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 326(2), 99-108.
- . Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikевич, A., Wiehlmann, L., Schomburg, D. (2010). How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environmental microbiology*, 12(6), 1734-1747.
- . Fu, J.; Sharma, P.; Spicer, V.; Krokhin, O.V.; Zhang, X.; Fristensky, B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Levin, D.B. (2015). Quantitative 'Omics Analyses of Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Metabolism in *Pseudomonas putida* LS46 Cultured with Waste Glycerol and Waste Fatty Acids. *PLoS ONE*, 10, e0142322.

- . Gabani P, Singh OV (2013) Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Appl. Microbiol Biotechnol* 97:993–1004.
- . Gao Q, Garcia-Pichel F (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol* 11:791–802. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2649>.
- . Gellatly, S. L., Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67: 159–173.
- . Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *Journal of bacteriology*, 175(24), 7982-7989.
- . Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782.
- . Gómez -Hernández, E., Salgado-Lugo, H., Segura, D., García, A., Díaz-Barrera, A., Peña, C. (2021). Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) with ultra-high molecular weight (UHMW) by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 79-95.
- . Gottesman, S., Storz, G. (2011). Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a003798.
- . Hacker, J., Carniel, E., 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* 2, 376–381.
- . Han, M. J., Lee, S. Y. (2003). Proteome profiling and its use in metabolic and cellular engineering. *Proteomics*, 3(12), 2317-2324.
- . Hervas AB, Canosa I, Little R et al. (2009) NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 191:6123–35.
- . Hirota, K., Yamahira, K., Nakajima, K., Nodasaka, Y., Okuyama, H., Yumoto, I. (2011). *Pseudomonas toyotomiensis* sp. nov., a psychrotolerant facultative alkaliphile that utilizes

hydrocarbons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), 1842-1848.

. Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J., Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212(1), 77-86. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00130-9).

. Hoang, T. T., Schweizer, H. P. (1997). Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the *fabAB* operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5326-5332.

. Hoerter, J. D., M. M. Benjamin, and R. M. Lueptow (2005). Effects of particle size, fluid velocity, and density on particle-wall collisions in gas-solid flow. *Powder Technology* 155, no. 1-3: 84-91.

. Hoffmann, N., Steinbüchel, A., Rehm, B. H. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. *FEMS microbiology letters*, 184(2), 253-259.

. Hol, W. G., Bezemer, T. M., Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Frontiers in plant science*, 4, 81.

Holloway, B. W., Røxmling, U., Tümmler, B. (1994). Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology*, 140(11), 2907-2929.

. Hubner, P., Willenbacher, J., and Haas, C. (1993). High-frequency transformation of *Pseudomonas putida* with imipenem resistance plasmids and characterization of a gene encoding a new ABC transporter-like protein. *Mol. Gen. Genet.* 241(1-2): 17-24. doi:10.1007/BF00280215.

. Huisman, G. W., de Graaf, F. K., Kiewiet, R. (1991). Optimization of the medium for the growth of *Escherichia coli* on glycerol-based media. *Biotechnology techniques*, 5(3), 183-188. <https://doi.org/10.1007/BF00152985>.

- . Huisman, G.W., Wonink, E., de Koning, G. *et al.* (1992). Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**, 1–5.
<https://doi.org/10.1007/BF00169409>
- . Ishihama, A. (2010). Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS microbiology reviews*, *34*(5), 628-645.
- . Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., ... Ghiglione, J. F. (2019). Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: a review on colonization and biodegradation by the “plastisphere”. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 865.
- . Jiménez, J. I., Minambres, B., Garcia, J. L., Diaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, *4*(12), 824-841.
- . Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y (2003) Involvement of the reserve material poly-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microbiol* *69*:3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
- . Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., Castro-Sowinski, S. (2005). Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical reviews in microbiology*, *31*(2), 55-67.
- . Kalia, V.C., Lal, S., Cheema, S., (2007). Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer. *Gene* *389*, 19–26.
- . Karp, P.D., et al., (2019). The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in Bioinformatics*.
- . Khanna S, Srivastava AK (2005) A simple structured mathematical model for biopolymer (PHB) production. *Biotechnol Prog* *21*:830–838
- . Kessler, B., Palleroni, N.J., (2000). Taxonomic implications of synthesis of poly-beta-hydroxybutyrate and other poly-betahydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *50*, 711–713.

- . Khosravi-Darani, K., Yazdian, F., Babapour, F., Amirsadeghi, A. R. (2019). Poly (3-hydroxybutyrate) production from natural gas by a methanotroph native bacterium in a bubble column bioreactor. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 33(1), 69-77.
- . Koller, M., Rodríguez-Contreras, A. (2015). Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra-and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences*, 15(6), 558-581.
- . Kourmentza, C., Kornaros, M. (2016). Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source. *Bioresource technology*, 222, 388-398.
- . Krueger, M. C., Harms, H., Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 8857-8874.
- . Kusaka, S., Iwata, T., Doi, Y. (1999). Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly [(R)-3-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. *International journal of biological macromolecules*, 25(1-3), 87-94.
- . Kwon; Kim, JS; Park, IC; Yoon, SH; Park, DH; Lim, CK; Go, SJ; et al. (2003). "*Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea". *Int J Syst Evol Microbiol*. 53. 53 (Pt 1): 21–7
- . Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, no. 5259: 680-685.
- . Lalucat, J., Gomila, M., Mulet, M., Zaruma, A., García-Valdés, E. (2022). Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1), 126289
- . La Rosa R, de la Peña F, Prieto MA, Rojo F. (2014). The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. *Environ Microbiol* 16: 278–290.
- . Lee, S. Y., Lee, Y., & Wang, F. (1999). Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(3), 363-368.

- . Lemoigne, M. (1926). Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 8, 770-782.
- . Liu, Q., Luo, G., Zhou, X. R., Chen, G. Q. (2011). Biosynthesis of poly (3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic engineering*, 13(1), 11-17.
- . Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., Paulsen, I. T. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas sp.*: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS genetics*, 8(7), e1002784.
- . López, N.I., Floccari, M.E., Steinbuchel, A., García, F.A., Méndez, S.B., (1995). Effect of poly(3-hydroxybutyrate) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 95–102.
- . López, N. I., Ruiz, J. A., Méndez, B. S. (1998). Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 681-684.
- . López, N I., Pettinari, M.J., Stackebrandt, E., Tribelli, P.M., Pötter, M., Steinbüchel, A., Méndez, B.S. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate) producer isolated from an Antarctic environment. *Current microbiology*, 59, 514-519.
- . López, N. I., Pettinari, M. J., Nikel, P. I., Méndez, B. S. (2015). Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. *Advances in applied microbiology*, 93, 73-106.
- . Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, no. 1: 265-275.
- . Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., O'Byrne, C. (2020). Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Frontiers in microbiology*, 11, 556140.
- . Madison LL, Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(1):21–53

- . Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T., Doi, Y. (2002). A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *Journal of bacteriology*, 184(14), 3992-4002.
- Magnusson, L. U., Farewell, A., Nyström, T. (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in microbiology*, 13(5), 236-242.
- . Manoli, M. T., Nogales, J., Prieto, A. (2022). Synthetic Control of Metabolic States in *Pseudomonas putida* by Tuning Polyhydroxyalkanoate Cycle. *Mbio*, 13(1), e01794-21.
- . Manso Cobos, I., Ibáñez García, M. I., de la Peña Moreno, F., Sáez Melero, L. P., Luque-Almagro, V. M., Castillo Rodríguez, F., Moreno Vivian, C. (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-12.
- . Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T., Doi, Y. (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. *Journal of bacteriology*, 180(24), 6459-6467.
- . Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P., Göker, M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.
- . Meier-Kolthoff, J.P., Sardà Carbasse, J., Peinado-Olarte, R.L., Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acid Res* 50: D801–D807.
- . Méndez, BS, Pettinari, MJ, López, NI. 2010. Cuando los nombres ocultan a los nombrados. *Revista Química Viva- Número 2, año 9* www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar.
- . Mezzina, M. P., Wetzler, D. E., de Almeida, A., Dinjaski, N., Prieto, M. A., Pettinari, M. J. (2015). A phasin with extra talents: a polyhydroxyalkanoate granule-associated protein has chaperone activity. *Environmental microbiology*, 17(5), 1765-1776.
- . Miller CD, Mortensen WS, Braga GU, Anderson AJ (2001) The *rpoS* gene in *Pseudomonas syringae* is important in surviving exposure to the near-UV in sunlight. *Curr Microbiol* 43:374–377.

- . Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Thomas, P. D. (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic acids research*, 45(D1), D183-D189.
- . Mravec F, Obruca S, Krzyzanek V, Sedlacek P, Hrubanova K, Samek O, Kucera D, Benesova P, Nebesarova J (2016) Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett.* <https://doi.org/10.1093/femsl e/fnw094>
- . Mohanrasu, K., Rao, R. G. R., Dinesh, G. H., Zhang, K., Prakash, G. S., Song, D. P., & Arun, A. (2020). Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. *Fuel*, 271, 117522.
- . Morone, A., Apte, M., Pandey, R. A. (2015). Levulinic acid production from renewable waste resources: Bottlenecks, potential remedies, advancements and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 548-565.
- . Mozejko-Ciesielska, J., Szacherska, K., Marciniak, P. (2019). *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(6), 1151-1166.
- . Mozejko-Ciesielska, J., & Mostek, A. (2019). Time-Course Proteomic Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 during Mcl-Polyhydroxyalkanoate Synthesis under Nitrogen Deficiency. *Polymers*, 11(5), 748.
- . Mozejko-Ciesielska, J., & Serafim, L. S. (2019). Proteomic Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Dual Carbon-Phosphorus Limitation during mcl-PHAs Synthesis. *Biomolecules*, 9(12), 796.
- . Muhammadi S, Afzal M, Hameed S (2015) Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem Lett Rev* 8:56–77.
- . Müller-Santos, M., Koskimäki, J. J., Alves, L. P. S., de Souza, E. M., Jendrossek, D., Pirttilä, A. M. (2021). The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 45(3), fuaa058.
- . Narancic, T., Salvador, M., Hughes, G. M., Beagan, N., Abdulmutalib, U., Kenny, S. T., & Jimenez, J. I. (2021). Genome analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas umsongensis* G016: the genetic

basis for PET monomer upcycling into polyhydroxyalkanoates. *Microbial biotechnology*, 14(6), 2463-2480.

. Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., ... & Tumbler, B. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 799-808. [https://doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00366](https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366).

. Nickel, P. I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., & De Lorenzo, V. (2015). *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 25920-25932.

. Nikodinovic-Runic, J., Flanagan, M., Hume, A.R., Cagney, G., and O'Connor, K.E. (2009) Analysis of the *Pseudomonas putida* CA-3 proteome during growth on styrene under nitrogen-limiting and non-limiting conditions. *Microbiology* 155: 3348–3361.

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

. Obruca S, Sedlacek P, Mravec F, Samek O, Marova I (2016) Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly (3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotech* 100:1365–1376.

. Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., & Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology advances*, 36(3), 856-870.

. Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 4795-4810.

. Obruca, S., Sedlacek, P., & Koller, M. (2021). The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. *Bioresource Technology*, 326, 124767.

- . Oren A, Garrity GM. 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 71: e005056.
- . Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and environmental microbiology*, 44(1), 238-241.
- . Pachapur, V. L., Sarma, S. J., Brar, S. K., Chaabouni, E., Kaur Brar, S., JyotiSarma, S., Pakshirajan, K. (2016). Chapter 1-platform chemicals: significance and need. Platform chemical biorefinery. Elsevier, Amsterdam, 1-20.
- . Palleroni, N.J. (2005) *Pseudomonas* Genus. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- . Palleroni, N.J. (2010) The *Pseudomonas* story. *Environ. Microbiol.* 12 (6), 1377–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>. PMID: 20553550.
- . Peoples, O. P., & Sinskey, A. J. (1989). Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), 15298-15303.
- . Peralta-Gil M, Segura D, Guzman J, Servín-González L, Espín G (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-β-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* 184:5672–5677.
- . Pettinari, J.M., Chaneton, L., Vazquez, G., Steinbuchel, A., Mendez, B.S., 2003. Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid* 50, 36–44.
- . Pettinari, M. J., & Egoburo, D. E. (2021). Manipulation of global regulators in *Escherichia coli* for the synthesis of biotechnologically relevant products. In *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules* (pp. 437-453). Academic Press.
- . Pezzoni M, Pizarro RA, Costa CS (2012) Protective effect of low UVA irradiation against the action of lethal UVA on *Pseudomonas aeruginosa*: role of the *relA* gene. *J Photochem Photobiol B Biol* 116:95–104.

- . Pezzoni M, Pizarro RA, Costa CS (2014) Protective role of extracellular catalase (KatA) against UVA radiation *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Photochem Photobiol B Biol* 131:53–64.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.005>.
- . Pham, T. H., Webb, J. S., & Rehm, B. H. (2004). The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*, 150(10), 3405-3413.
- . Poblete-Castro, I.; Escapa, I.F.; Jäger, C.; Puchalka, J.; Lam, C.M.C.; Schomburg, D.; Prieto, M.A.; dos Santos, V.M. 2012. The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach. *Microb. Cell Fact.*, 11, 34.
- . Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p) ppGpp: still magical? *Annual Review of Microbiology*, 62, 35e51.
- . Prieto, M. A., Bühler, 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. *Journal of bacteriology*, 181(3), 858-868.
- . Prieto, M. A. (2007). From oil to bioplastics, a dream come true. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 289.
- . Prieto A, Escapa IF, Martínez V, Dinjaski N, Herencias C, de la Peña F, Tarazona N, Revelles O. (2016). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol*. 18(2):341-57. doi: 10.1111/1462-2920.12760.
- . Quelas, J. I., A. M. Mesa, E. Mongiardini, S. J. Jofré, and M. A. López. "Exopolysaccharide production by native and genetically modified strains of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* under different growth conditions." *Journal of Applied Microbiology* 100, no. 4 (2006): 822-831.
- . Quelas, J. I., López-García, S. L., Casabuono, A., Althabegoiti, M. J., Mongiardini, E. J., Pérez-Giménez, J., Lodeiro, A. R. (2006). Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Archives of microbiology*, 186, 119-128.

- . Raiger Iustman LJ, Ruiz JA (2008) The alternative sigma factor, σ^S , affects polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett* 284:218–224
- .Raiger Iustman, L. J., Tribelli, P. M., Ibarra, J. G., Catone, M. V., Solar Venero, E. C., & López, N. I. (2015). Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremophiles*, 19, 207-220.
- . Raza, Z. A., Abid, S., Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45-56.
- . Raberg, M., Peplinski, K., Heiss, S., Ehrenreich, A., Voigt, B., Döring, C., Steinbüchel, A. (2011). Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G+ 1 with regard to glucose utilization. *Applied and environmental microbiology*, 77(6), 2058-2070.
- . Rehm, B. H. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), 15-33.
- . Reinecke, F., & Steinbüchel, A. (2009). *Ralstonia eutropha* and its metabolic engineering for biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate) [P (3HB)], a sustainable resource for plastics, textiles, and chemicals. *Microbial Biotechnology*, 2(5), 523-536. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00113.
- . Ren, Q., Grubelnik, A., Hoerler, M., Ruth, K., Hartmann, R., Felber, H., & Zinn, M. (2005). Bacterial poly (hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules*, 6(4), 2290-2298.
- . Reynolds, E. S. "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy." *Journal of cell biology* 17, no. 1 (1963): 208-212.
- . Ruiz JA, López N, Fernández R.O, Méndez BS (2001) Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 67:225–230
- . Ruiz JA, López NI, Méndez BS (2004) *rpoS* gene expression in carbonstarved cultures of the polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr. Microbiol* 48:396–400.

- . Ruiz, J. A., Fernández, R. O., Nickel, P. I., Méndez, B. S., & Pettinari, M. J. (2006). dye (arc) mutants: insights into an unexplained phenotype and its suppression by the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* recombinants. *FEMS microbiology letters*, 258(1), 55-60.
- . Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1988). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- . Sariaslani & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 81, pp. 41-68). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394382-8.00002-8>.
- . Sawers, R. 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*. *Molecular microbiology*, 5(6), 1469-1481.
- . Sharma, P. K., Fu, J., Spicer, V., Krokhin, O. V., Cicek, N., Sparling, R., Levin, D. B. (2016). Global changes in the proteome of *Cupriavidus necator* H16 during poly-(3-hydroxybutyrate) synthesis from various biodiesel by-product substrates. *AMB Express*, 6(1), 36.
- . Sharma, L., & Mallick, N. (2005). Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresource technology*, 96(11), 1304-1310.
- . Sharma, P. K., Fu, J., Spicer, V., Krokhin, O. V., Cicek, N., Sparling, R., & Levin, D. B. (2016). Global changes in the proteome of *Cupriavidus necator* H16 during poly-(3-hydroxybutyrate) synthesis from various biodiesel by-product substrates. *Amb Express*, 6, 1-16.
- . Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652-680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- . Simon, R. U. P. A. P., Prierer, U., & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/technology*, 1(9), 784-791.

- . Simonet, J. M., Delepierre, M., & Bouffartigues, E. (1982). Isolation and characterization of a new *E. coli* K-12 mutant strain, S17-1, suitable for transformation and genetic studies. *Gene*, 9(1), 13-19. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(80)90067-2).
- . Slaninova E, Sedlacek P, Mravec F, Mullerova L, Samek O, Koller M, Hesko O, Kucera D, Marova I, Obruca S (2018) Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:1923–1931. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8760-8>.
- . Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 68, 718-725.
- . Solar Venero, E. C., Ricardi, M. M., Gomez-Lozano, M., Molin, S., Tribelli, P. M., & López, N. I. (2019). Oxidative stress under low oxygen conditions triggers hyperflagellation and motility in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *Extremophiles*, 23, 587-597.
- . Solar Venero, E.C. (2020). Mecanismos de adaptabilidad a microaerobiosis y estrés oxidativo en *Pseudomonas extremaustralis*. Tesis Doctoral. Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
- . Sonnleitner, E., Abdou, L., & Haas, D. (2009). Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21866-21871.
- . Steinbüchel, A., & Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biopolyesters*, 81-123.
- . Steinbüchel, A., & Valentin, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology letters*, 128(3), 219-228.
- . Sun, Y., Shi, J., Wang, X., Ding, C., & Wang, J. (2022). Deciphering the mechanisms shaping the plastisphere microbiota in soil. *Msystems*, 7(4), e00352-22.
- . Suvorova, I. A., Ravcheev, D. A., & Gelfand, M. S. (2012). Regulation and evolution of malonate and propionate catabolism in proteobacteria. *Journal of bacteriology*, 194(12), 3234-3240.

- . Suzuki, T., Tsygankov, A. A., Miyake, J., Tokiwa, Y., & Asada, Y. (1995). Accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by a non-sulfur photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV at different pH. *Biotechnology letters*, 17, 395-400.
- . Sznajder A, Pfeiffer D, Jendrosseck D. (2015). Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 81:1847–1858.
- . Tal S, Okon Y (1985) Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can J Microbiol* 31:608–613. <https://doi.org/10.1139/m85-115>.
- . Tian J, He A, Lawrence AG, Liu P, Watson N, Sinskey AJ, Stubbe J (2005) Analysis of transient polyhydroxybutyrate production in *Wautersiaeutropha*H16 by quantitative western analysis and transmission electron microscopy. *J Bacteriol* 187:3825–3832.
- . Timmis, K. N. (2002). Microorganisms and sustainable development. In *Encyclopedia of Life Support Systems* (Vol. 3, pp. 1-18). UNESCO-EOLSS Publishers.
- . Timp, W., & Timp, G. (2020). Beyond mass spectrometry, the next step in proteomics. *Science Advances*, 6(2), eaax8978.
- . Tombolini, R., Povolo, S., Buson, A., Squartini, A., & Nuti, M. P. (1995). Poly-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* *Microbiology*, 141(10), 2553-2559.
- . Tortajada M, da Silva LF. Prieto MA. Second-generation functionalized medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: the gateway to high-value bioplastic applications. *Int Microbiol.* 2013;16:1–15
- . Tribelli PM, López NI (2011) Poly (3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles* 15:541–547. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0384-1>.
- . Tribelli, P. M., Méndez, B. S., & López, N. I. (2010). Oxygen-sensitive global regulator, Anr, is involved in the biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*. *Microbial Physiology*, 19(4), 180-188.

- . Tribelli, P. M., & López, N. I. (2011). Poly (3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*, 15, 541-547.
- . Tribelli, P. M., Raiger Iustman, L. J., Catone, M. V., Di Martino, C., Revale, S., Méndez, B. S., & López, N. I. (2012). Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis*, a highly stress-resistant Antarctic bacterium. *J. Bacteriol.* 2381-2382.
- . Tribelli, P. M., Solar Venero, E. C., Ricardi, M. M., Gómez-Lozano, M., Raiger Iustman, L. J., Molin, S., & López, N. I. (2015). Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One*, 10(12), e0145353.
- . Tribelli, P. M., Rossi, L., Ricardi, M. M., Gomez-Lozano, M., Molin, S., Raiger Iustman, L. J., & Lopez, N. I. (2018). Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(1), 15-23.
- . Tribelli, P. M., Pezzoni, M., **Brito, M. G.**, Montesinos, N. V., Costa, C. S., López, N. I. (2020). Response to lethal UVA radiation in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*: polyhydroxybutyrate and cold adaptation as protective factors. *Extremophiles*, 24, 265-275.
- . Tripathi, A. D., Joshi, T., Khosravi-Darani, K., Koller, M., Singh, S. P., Shrivastava, A., Mishra, S. (2016). Recovery and characterization of polyhydroxyalkanoates. *Recent Advances in Biotechnology*, 2, 267-303.
- Trötschel, C., Albaum, S. P., & Poetsch, A. (2013). Proteome turnover in bacteria: current status for *Corynebacterium glutamicum* and related bacteria. *Microbial biotechnology*, 6(6), 708-719.
- . Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016a) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols* 11, no. 12: 2301-2319.
- . Tyanova, S., Tertiiuk, N., Zecha, J., et al. (2016b) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of proteomics data. *Nature Methods* 13, no. 9: 731-740.

- . Valappil, S. P., Peiris, D., Langley, G. J., Herniman, J. M., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus spp.* *Journal of Biotechnology*, 127(3), 475-487.
- . Velázquez-Sánchez, C., Espín, G., Peña, C., Segura, D. (2020). The modification of regulatory circuits involved in the control of polyhydroxyalkanoates metabolism to improve their production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 386.
- . Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., & Majone, M. (2010). Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochemistry*, 45(5), 714-723.
- . Volodina, E., Raberg, M., Steinbüchel, A. (2016). Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 978-991.
- . Vollbrecht D, Schlegel HG. 1979. Excretion of metabolites by hydrogenbacteria III. D (-)-3-hydroxybutanoate. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 7:259–266.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00498020>.
- . Wang, L., Armbruster, W., & Jendrossek, D. (2007). Production of medium-chain-length hydroxyalkanoic acids from *Pseudomonas putida* in pH stat. *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 1047-1053.
- . Wang Q, Yu H, Xia Y, Kang Z, Qi Q (2009) Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb Cell Fact* 8:47. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-47>.
- . Wang Y, Chen R, Cai JY, et al. (2013). Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from levulinic acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS One*, 8, 1–8.
- . Wei, Y. H., Chen, W. C., Huang, C. K., Wu, H. S., Sun, Y. M., Lo, C. W., & Janarthanan, O. M. (2011). Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 252-265.
- . Wilkins, M. (2009). Proteomics data mining. *Expert review of proteomics*, 6(6), 599-603.

- . Wu, G., Moir, A. J., Sawers, G., Hill, S., & Poole, R. K. (2001). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 194(2), 215-220.
- . Yañez, L., Conejeros, R., Vergara-Fernández, A., Scott, F. (2020). Beyond intracellular accumulation of polyhydroxyalkanoates: chiral hydroxyalkanoic acids and polymer secretion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 248.
- . Zannier, F., Portero, L. R., Douki, T., Gärtner, W., Farías, M. E., & Albarracín, V. H. (2022). Proteomic Signatures of Microbial Adaptation to the Highest Ultraviolet-Irradiation on Earth: Lessons From a Soil Actinobacterium. *Frontiers in Microbiology*, 13, 791714.
- . Zhang, S., Yasuo, T., Lenz, R. W., & Goodwin, S. (2000). Kinetic and mechanistic characterization of the polyhydroxybutyrate synthase from *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 1(2), 244-251.
- . Zhao YH, Li HM, Qin LF, Wang HH, Chen GQ (2007) Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* 1:34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>
- . Zihayat, B., Shakibaie, M., Sabouri-Shahrbabak, S., Doostmohammadi, M., Ameri, A., Adeli-Sardou, M., & Forootanfar, H. (2019). Medium optimization for polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain Te using D-optimal design. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 18, 101001.