



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

“Mecanismos de adaptabilidad a microaerobiosis y estrés oxidativo en *Pseudomonas extremaustralis*”

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

Lic. Esmeralda Clara Solar Venero

Directora de tesis: Dra. Nancy I. López

Directora Asistente: Dra. Paula M. Tribelli

Consejera de estudios: Dra. Silvia Rossi

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana,

FCEN-UBA, IQUBICEN – CONICET

Buenos Aires, 2020

Se termina
 Se terminó
 Continúa
 Sigue
 Se interrumpe
 Y reinicia
 Entusiasma
 Divierte
 Abruma
 Como la vida misma
 Aburre
 Aparece con olor a mar
 Y se distancia traslúcida
 Casi vaporosa
 Tiempo de
 "Hasta prontito"
 Nuevos uniformes
 Uniforme trajecito de oficina
 De laboratorio delantal
 Miedos nuevos
 Colectivos de nuevos trayectos
 Ascensores, esas calesitas
 De movimiento vertical
 "Señor, me presento yo soy la nueva..."
 Como en el jardín
 Nuevos viejos
 Nudos en la garganta
 Y otros sitios
 ¿Cómo me presento?
 ¿Cómo saludo?
 Otra vez la nueva
 ¿Estará bien el largo de la pollera?
 ¿Será mucho el maquillaje?
 ¿Atiendo o tomo apuntes?
 Ni placita tiene el trabajo
 Hay gente de muchas
 Diferentes edades
 Pagan con cheque
 Tengo que ir al banco
 Oh dios, todo nuevo
 Y no toman lista
 Tengo que firmar
 ¿Cuándo es el parcial?
 ¿A quién le pregunto?
 Parezco tonta
 Todo nuevo
Felizmente, todo nuevo
Ahí vamos.

Guillermo C. M. Solar

Marzo de 2008

AGRADECIMIENTOS

Toda una vida de 5 años resumida en pocas hojas. Por eso, simplemente, a quienes resultaron imprescindibles durante el desarrollo de este trabajo:

A la Facultad de Cs. Exactas y Naturales, nada de esto hubiera sido posible sin la educación de excelencia que recibí. Al departamento de Química Biológica y todos sus integrantes por brindarme el espacio e infinidad de equipos para realizar esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo, financiándolo durante 5 años. Al Deutsche Akademische Austauschdienst (DAAD) y al CABBIO que facilitaron los recursos para formarme y nutrirme de experiencias en el exterior.

A toda la comunidad del Instituto Santa Felicitas por la buena onda, aun a las 7:30 de la mañana. Por los consejos y las palabras de aliento a fin de trimestre cuando ni corregir alcanza. Por sobre todo gracias a mis alumnos. En estos años de trabajo docente me sorprendí con sus preguntas, me reí con sus ocurrencias y celebré cada vez que entendieron algo que les costaba. Escuché dramas amorosos, peleas con amigos y problemas familiares. También me enojé (muchas, muchas veces). De todo aprendí.

A Silvia Rossi, mi consejera de estudios, por leer los informes y siempre darme consejos para mejorar o ideas de experimentos nuevos. Al jurado de esta tesis, por aceptar leer este trabajo y evaluarlo. A todos los que escucharon esta tesis en pequeñas partes a lo largo de congresos y conferencias y aportaron su granito de arena para hacerlo mejor.

Al Dr. Vögel y a todo el RNA group del IMIB. Gracias por abrirme las puertas al complejo mundo de los sRNA. Esta tesis no sería la misma sin su valiosa colaboración. A mis compañeros de laboratorio “de allá” por las tarde-noches de *biergärten*, los *weinseminare* y las pizzas gigantes. Gracias por hacer de mis meses en Würzburg una experiencia inolvidable.

Y por sobre todas las cosas:

A Nancy, por dejarme hacer y deshacer a mi antojo, por permitirme equivocarme y cambiar el camino de esta tesis todas las veces que fue necesario. Por tus consejos, correcciones e ideas. Por la calidez humana y por respetar mis tiempos cuando tuve que faltar o salir corriendo por una emergencia (que fueron muchos, seamos sinceros).

A Paula, por ser una combinación hermosa entre directora asistente, amiga, consejera o lo que haya necesitado de acuerdo al momento. Por ser generosa dentro y fuera del laboratorio. Por darte cuenta cuando estoy a punto de colapsar y siempre empujarme a que dé un poquito más. Por las exageraciones

diarias y la energía casi infinita. Porque no me faltaron nunca ni tu ayuda ni tus ideas (algunas más locas que otras probablemente).

A Julia y a Beatriz que, junto a Nancy, construyeron este hermoso grupo de personas del cual aprendo todos los días. Gracias por el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio. Por alegrarse con las pequeñas cosas y hacerle frente a la frustración todos los días. Por hacer del laboratorio un lugar donde abundan las risas y el compañerismo. Gracias por compartir turnos de equipos, medios de cultivo y por dejar de largar cosas cuando otro tiene que correr.

A José, por musicalizar las tardes de trabajo y llegar con el mate salvador en el momento justo. Por siempre darle una vuelta de rosca a las charlas y dejarme pensando por un rato largo. A la Tucu, Gabita, Gabiluz, etc, etc. por compartir conmigo tu alegría y tu risa contagiosa. Por preocuparte siempre por Esmeralda de los Valles Calchaquíes. A Rochi, porque basta con ver tu empuje infinito para que te de la energía de hacer un experimento más. Por todas las canciones doctorales que compusimos en estos años. Qué lindo es haber cursado IBMC juntas y ahora estar defendiendo la tesis con días de diferencia. Que nos doctoramos, nos doctoramos Ro! A Dani, por tu buena onda diaria y por darnos a todos siempre una mano de manera desinteresada (especialmente cuando se trata de estadística o Illustrator). Por compartir indignaciones varias, sorprenderse con todo y por ser una gran persona. A Gonzalo, Rosario, Ruby y Mai por compartir esta última etapa y llenarla de aprendizaje y momentos felices. A Laura por resolverme millones de dudas y tranquilizarme en los momentos de negatividad del doctorado con un "abaaacho".

A los que ya no están, pero compartimos tanto, tanto que no puedo dejar de mencionarlos. Manu, con sus ocurrencias, las vueltas en el 45, las decisiones tomadas con la moneda mágica y los grandes éxitos *zweites mittagessen* y onomatoplastics, que no olvidaremos jamás. A Milili, por los viajes en tuktuk, las clases de kropp y los consejos doctorales. Diego, gracias por las charlas entre extracciones de RNA y RT-PCRs y en especial por ayudarme a poner todo en perspectiva y enseñarme a agradecer las cosas como son.

A "los Ruzal" y "los Piuri". A Mariana y Sandra por dejarme invadir sus laboratorios y prestar infinidad de equipos y reactivos. A todos sus integrantes (Mer, Marianita, Joaqui, Estefi, Fabio, Flor, Lili, Euge, Jordi, Mariano, Lacho, Viqui y Lu, aunque más de uno ya se haya ido a echar raíces por otros lados), por compartir el día a día... por arreglar cualquier pena con mates y torta o simplemente poniendo un "buena onda" adelante del viernes y armando una fiesta a partir de la nada.

A bedelía, por correr con nosotros preparando medios y largando autoclaves para que podamos hacer ese experimento que planeamos a último momento. A Eva, por su capacidad enorme para ponerse el mundo al hombro, solucionar problemas sin dramatizar (demasiado) y repartir amor por donde pasa.

Y por último...

A Jordi, Flor y Joaqui que me hacen el aguante todos los días. Gracias por respetar mis silencios y acompañar mis alegrías y penas. Gracias por tener siempre la palabra justa, por intentar con la psicología

reversa y por abrazarme cuando tengo vergüenza. Gracias por entenderme mejor que nadie. Espero haberles devuelto aunque sea un poquito de todo lo que me dieron en estos años.

A Ale, Cami y Tefi (a la distancia, pero cerquita en el corazón) por los brunch, las meriendas y las catarsis científico-amorosas.

A mis amigos de la vida: Manol, Agus, Flor, Dani, Maru, Merce, Caro, Agus M, Gasti, Matias, Gastón... con ustedes todo es más fácil. Gracias por el aguante ininterrumpido de todos estos años, aun cuando la vida nos pasó por arriba.

A Agus y Maru, nuevamente, por las listas de cosas a hacer antes de la tesis, por leernos planes y CVs infinitas veces y por llorar fechas de Conicet. Por transitar este camino de la ciencia desde hace 11 años juntos.

A Dani, por nutrir mi cabeza de arte y mi biblioteca de libros.

A Flor. Por esperarme con la comida lista y hacerme la vida más sencilla infinitas veces. Por prestarme el oído para descargarme, por compartir los momentos felices, los momentos tristes y los momentos “cucaracha”. Por saber cuándo necesito un abrazo mucho antes de que yo me dé cuenta y por ser mi GPS que no depende de wi-fi.

A Adrián, MI abogado de cabecera. Gracias por tu generosidad y disposición y por salvarme las papas más de una vez.

A Gino por definir la palabra “incondicional” y estar ahí siempre que lo necesito. Gracias por ser parte de mi familia.

A mi viejo, no puedo expresar con palabras lo mucho que extraño tu humor ácido y tus anécdotas. Tu ausencia se siente en cada paso que doy.

A mis abuelos, Mimi y Quique, por creer en mí y en el camino que elegí. Gracias por vivir mis alegrías como propias y por prender todas las velitas que fueron necesarias durante esta tesis.

A Gon, por soportar los malos humores derivados de la escritura de esta tesis y por hacer mi vida informática un poco más eficiente a fuerza de elección de laptops, optimización de tablas, memorias RAM, SSDs y otras cosas. Por alegrarte con mis logros y hacer más llevaderas mis frustraciones. Gracias por acompañarme, escuchar mis quejas, darme palabras de aliento y contentarme siempre.

A mi hermana. Por los abrazos y la alegría infinita. Verte crecer es de lo más lindo que me pasó en la vida.

A mi mamá, por ser mi ejemplo de esfuerzo y sacrificio. Gracias por darme lo más importante del mundo: libertad, apoyo y amor.

Con todo mi amor infinito, esta tesis es por y para ustedes.

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en el siguiente artículo científico:

“Oxidative stress under low oxygen conditions triggers hyperflagellation and motility in the Antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*” Solar Venero, E.C., Ricardi, M.M., Gomez-Lozano, M. Molin, S., Tribelli PM., López NI. *Extremophiles* (2019) 23: 587.
<https://doi.org/10.1007/s00792-019-01110-x>

ÍNDICE

ÍNDICE	6
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
El rol del oxígeno en el metabolismo bacteriano.....	13
El metabolismo microaeróbico	14
Estrés oxidativo y nitrosativo en bacterias	14
<i>Estrés nitro-oxidativo y metabolismo del hierro</i>	17
<i>Defensas antioxidativas en bacterias</i>	18
<i>Relación entre el metabolismo central del carbono y el estrés oxidativo</i>	19
<i>Reguladores redox</i>	19
Pequeños RNAs regulatorios en bacterias.....	21
Aproximaciones para el estudio de la fisiología bacteriana en distintas condiciones	23
Las técnicas globales.....	23
<i>Genómica</i>	24
<i>Transcriptómica</i>	24
<i>Proteómica</i>	26
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> : modelo del presente estudio.....	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	30
1. Microorganismos y plásmidos utilizados	30
1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	30
1.2. Medios de cultivo y antibióticos utilizados	31
1.3. Condiciones de cultivo.....	31
1.4. Curvas de crecimiento	31
1.5. Experimentos de supervivencia	32
1.6. Sensibilidad al peróxido de hidrógeno en medio sólido	32
2. Técnicas globales.....	33
2.1. Análisis proteómico por LC/MS-MS	33
2.1.1. <i>Extracción de proteínas</i>	33
2.1.2. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS page)</i> ..	33

2.1.3.	<i>Métodos experimentales</i>	33
2.1.4.	Análisis de datos.....	34
2.2.	Análisis transcriptómico (RNAseq)	34
2.2.1.	Extracción de RNA	35
2.2.2.	<i>Métodos experimentales</i>	36
2.2.3.	<i>Análisis de datos</i>	37
3.	Construcción del plásmido pBAD18/sRNA40	38
3.1.	Purificación y cuantificación de DNA.....	39
3.2.	Digestión con enzimas de restricción.....	39
3.3.	Reacciones de ligado.....	40
3.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	40
3.5.	Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	40
3.5.1.	<i>Electrocompetentes</i>	40
3.5.2.	<i>Competentes químicas</i>	41
3.6.	Preparación y transformación de células competentes de <i>P. extremaustralis</i>	41
3.7.	Aislamiento de DNA plasmídico	42
4.	Técnicas que emplean RNA	42
4.1.	Extracción de RNA	42
4.2.	Obtención de cDNA total.....	43
4.3.	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	43
4.4.	Preparación de sondas marcadas radioactivamente para ensayos de <i>Northern blot</i>	44
4.5.	Ensayos de <i>Northern blot</i>	45
5.	Determinaciones analíticas	46
5.1.	Determinación del estado redox intracelular	46
5.2.	Determinación de proteínas carboniladas	46
5.3.	Determinación de exopolisacáridos totales	46
6.	Estudio de la formación de <i>biofilms</i> y movilidad bacteriana	47
6.1.	Ensayos de <i>biofilms</i> en placas multipocillo	47
6.2.	Estudios de movilidad bacteriana	47
7.	Observación de células al microscopio	48
7.1.	Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	48
8.	Análisis estadísticos	48
9.	Análisis bioinformáticos	48
9.1.	Predicción de regiones regulatorias	48

9.2. Predicción de estructura secundaria de sRNA	48
9.3. Predicción de interacciones RNA-RNA.....	49
9.4. Predicción de blancos de oxidación y nitrosilación	49
Anexo: Soluciones y Buffers.....	50
RESULTADOS.....	54
CAPÍTULO 1	56
Efectos fisiológicos de la exposición a H ₂ O ₂ en diferentes condiciones de aireación.....	56
Análisis comparativo de los perfiles proteicos de <i>P. extremaustralis</i> en diversas condiciones de aireación y estrés oxidativo.....	61
Análisis comparativo entre condiciones de aerobiosis y microaerobiosis.....	62
Análisis comparativo entre condiciones de a-OS y aerobiosis.....	67
Análisis comparativo entre condiciones de m-OS y microaerobiosis.....	69
Evaluación diferencial de la respuesta a estrés oxidativo en condiciones de alta y baja aireación..	73
Análisis comparativo general de la expresión de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo en las condiciones estudiadas.....	77
Resumen de resultados relevantes del capítulo.....	80
CAPÍTULO 2.....	82
Análisis de la respuesta a estrés oxidativo en microaerobiosis mediante técnicas transcriptómicas.....	83
Validación experimental de los datos obtenidos por RNA-seq	84
Análisis del efecto del H ₂ O ₂ en la presencia de flagelos y movilidad.....	89
Estudio de la formación de la formación de <i>biofilms</i>	93
Resumen de resultados relevantes del capítulo.....	95
CAPÍTULO 3.....	97
Identificación y análisis de posibles sRNA regulatorios en distintas condiciones de aireación y estrés oxidativo	97
sRNA antisense en <i>P. extremaustralis</i>	97
sRNA en trans en <i>P. extremaustralis</i>	98
Análisis de los posibles sRNA	100
Validación de sRNA detectados por RNAseq.....	102
Rol del sRNA40 en la regulación genética de <i>P. extremaustralis</i>	104
Predicción <i>in silico</i> del regulón del sRNA40.....	107
Expresión pulsada del sRNA40 seguido de RNA-seq.....	108
Análisis de la respuesta a la sobre-expresión del sRNA40	112
Resumen de resultados relevantes del capítulo.....	115

CAPÍTULO 4	117
Análisis de la exposición a especies reactivas de nitrógeno RNS	117
Análisis transcriptómico de <i>P. extremaustralis</i> en condiciones de baja aireación y estrés nitrosativo.	119
Análisis de la respuesta fisiológica al estrés nitrosativo en <i>P. extremaustralis</i>	121
Resistencia a estrés	122
Transcripción y traducción	122
Transporte y biosíntesis de aminoácidos	123
Metabolismo del hierro	126
Resumen de resultados relevantes del capítulo	129
DISCUSIÓN	131
<i>Las defensas oxidativas</i>	132
<i>Hiperflagelación, motilidad y formación de biofilms</i>	134
<i>Regulación genética</i>	137
<i>Estrés nitrosativo</i>	138
CONCLUSIONES GENERALES	142
ANEXO TABLAS	143
1. Tabla 1A: Proteínas expresadas diferencialmente en aerobiosis y microaerobiosis.....	144
2. Tabla 2A: Proteínas expresadas diferencialmente después de la exposición al H ₂ O ₂ en aerobiosis.....	158
3. Tabla 3A: Proteínas expresadas diferencialmente después de la exposición al H ₂ O ₂ en microaerobiosis.....	161
4. Tabla 4A: Proteínas expresadas diferencialmente después de la exposición al H ₂ O ₂ en microaerobiosis y aerobiosis.	169
5. Tabla 5A: Genes expresados diferencialmente después de la exposición al H ₂ O ₂ en microaerobiosis.....	182
6. Tabla 6A: sRNAs <i>antisense</i> con expresión diferencial en Microaerobiosis vs. Aerobiosis.....	193
7. Tabla 7A: sRNAs <i>antisense</i> con expresión diferencial en m-OS vs. Microaerobiosis.....	194
8. Tabla 8A: sRNAs en <i>trans</i> con expresión diferencial en Microaerobiosis vs. Aerobiosis	194
9. Tabla 9A: sRNAs en <i>trans</i> con expresión diferencial en m-OS vs. Microaerobiosis	197
10. Tabla 10A: Genes expresados diferencialmente después de la exposición al GSNO en microaerobiosis.....	199
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	208

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) se producen en distintas condiciones fisiológicas y ambientales en estrecha relación con las condiciones de aireación. Los mecanismos de defensa contra estas moléculas resultan cruciales para la supervivencia. *Pseudomonas extremaustralis* es una bacteria antártica con alta resistencia al estrés por lo que es un modelo de interés para el estudio de la adaptabilidad ambiental.

Este trabajo explora las respuestas al estrés oxidativo y nitrosativo en distintas condiciones de aireación utilizando enfoques globales y fisiológicos en *P. extremaustralis*. En aerobiosis se observó la activación de las defensas antioxidantes y poco efecto del estrés generado por el H₂O₂ en comparación con microaerobiosis. En contraste, el estrés oxidativo en microaerobiosis provocó mayor daño a macromoléculas y menor supervivencia. Los análisis globales realizados (transcriptómica y proteómica) mostraron no solo el despliegue de respuestas a estrés tradicionales sino también la sobreexpresión de genes relacionados con otros mecanismos entre ellos la formación de biofilms, flagelos y quimiotaxis. *P. extremaustralis* presentó un fenotipo de hiperflagelación y mayor formación de biofilms en condiciones de estrés oxidativo en concordancia con lo observado en los análisis globales. El análisis transcriptómico también permitió identificar y clasificar posibles pequeños RNA (sRNA) con expresión diferencial entre condiciones, que podrían tener funciones regulatorias relacionadas con la disponibilidad de O₂ y el estrés oxidativo. Se validaron experimentalmente 8 de estos sRNA y uno de ellos, denominado sRNA40, fue analizado mediante experimentos de expresión pulsada seguidos de análisis transcriptómicos. Estos análisis permitieron identificar 19 genes con expresión diferencial en respuesta a la sobreexpresión de sRNA40 en microaerobiosis, relacionados con sistemas de transporte o de secreción que constituirían su blanco de acción.

Por último, se analizó la respuesta a estrés nitrosativo inducido por nitrosoglutatión (GSNO) en microaerobiosis, donde la supervivencia luego de la exposición a GSNO fue menor que en aerobiosis. El análisis transcriptómico mostró incremento en la expresión de diversos genes como los relacionados con la producción y el transporte de pioverdinas, el metabolismo del hierro y la síntesis de proteínas, sugiriendo un alto turnover proteico probablemente relacionado con el efecto deletéreo del GSNO principalmente sobre proteínas que contienen hierro. También se verificó la activación del catabolismo del inositol, una vía poco estudiada en *Pseudomonas*, que aparece como una alternativa novedosa involucrada en la respuesta en presencia de estos compuestos.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que en condiciones microaeróbicas *P. extremaustralis* despliega un conjunto de mecanismos fisiológicos, adicionales a enzimas detoxificantes, frente a agentes estresantes. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la fisiología de *P. extremaustralis* frente al estrés oxidativo/nitrosativo en distintas condiciones de aireación. Algunos de los resultados obtenidos pueden extenderse a otras bacterias relacionadas y pueden ser de utilidad para aplicaciones biotecnológicas por su relevancia para la supervivencia de los organismos utilizados.

PALABRAS CLAVE: PSEUDOMONAS - MICROAEROBIOSIS - ESTRÉS OXIDATIVO – ESTRÉS NITROSATIVO - sRNA

ABSTRACT

“Mechanisms of adaptation to microaerobiosis and oxidative stress in *Pseudomonas extremaustralis*”

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), produced in a wide range of physiological processes even under low oxygen availability, are among the main stressors found in the environment. Strategies developed to combat them constitute key features in bacterial adaptability and survival. *Pseudomonas extremaustralis* is a metabolic versatile and stress resistant Antarctic bacterium, able to grow under different oxygen conditions, making it a model of interest for the study of environmental adaptability.

The present work explores the responses to oxidative and nitrosative stress in different aeration using global and physiological approaches. Under aerobic conditions we observed the activation of antioxidant defenses and low effect in different cellular parameters. In contrast, in microaerobiosis cells exhibited more oxidative damage in macromolecules and lower survival rates than under aerobiosis. Global studies (transcriptomic and proteomic) showed the use of traditional stress responses but also the overexpression of genes related to other mechanisms including the formation of biofilms and flagella. *P. extremaustralis* presented a phenotype of hyperflagellation and increased biofilm formation under conditions of oxidative stress in line with the global analysis results. Through transcriptomic analysis, we also identified and classified possible small RNAs (sRNA) with putative regulatory functions related to O₂ availability and oxidative stress with differential expression between conditions. 8 of these sRNAs were experimentally validated and the role of one of them (sRNA40) was further analyzed using pulsed expression experiments followed by transcriptomic analysis. This approach allowed us to identify 19 genes with differential expression in response to the overexpression of sRNA40, the majority corresponding to transporters or secretion systems that would constitute their targets.

Finally, we assessed the response to nitrosoglutathione (GSNO)-induced nitrosative stress. In microaerobiosis, survival after exposure to GSNO was lower than in aerobiosis. Transcriptomic analysis after GSNO exposure showed differential expression in various genes such as those related to the production and transport of pyoverdins, iron metabolism and protein synthesis, suggesting an increase in protein turnover. This could be related to the deleterious effect of GSNO on proteins that contain iron. The exposure to GSNO also caused the activation of inositol catabolism, a metabolic route that arises as a novel alternative pathway involved in the response to the presence of these compounds.

Altogether, these results show that, under microaerobic conditions, *P. extremaustralis* displays a set of physiological mechanisms against stressors that could act in addition to well-known detoxifying enzymes and non-enzymatic mechanisms. The present work presents insights into *P. extremaustralis*' physiology in the response to oxidative and nitrosative stress. Due to the ecological and biotechnological importance of *Pseudomonas* spp. the understanding of the cellular and molecular mechanisms related to the adaptability to microaerobiosis and stress could be relevant for basic and applied knowledge.

KEY WORDS: PSEUDOMONAS - MICROAEROBIOSIS - OXIDATIVE STRESS – NITROSATIVE STRESS - sRNA

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El rol del oxígeno en el metabolismo bacteriano

El oxígeno es un factor clave para la vida. La disponibilidad de O_2 en la tierra permitió la generación de un sistema altamente eficiente para la generación de energía a través de la respiración aerobia, lo que posibilitó el desarrollo evolutivo de una amplia variedad de formas de vida aerobias (Lindahl, 2008). Durante la respiración aeróbica, el O_2 se reduce a H_2O a través de la cadena de transporte de electrones, donde la adición de electrones genera especies reactivas de oxígeno (ROS), que causan daño a los componentes de la célula y, afectan la supervivencia (Imlay, 2013). Por lo tanto, los organismos aerobios utilizan la respiración para ganar en forma eficiente energía por fosforilación oxidativa, pero al mismo tiempo, enfrentan continuamente el estrés oxidativo causado por la generación de ROS durante la respiración (Shimizu and Matsuoka, 2019b). Es decir que los organismos deben hacer uso del O_2 para obtener energía para el funcionamiento de la maquinaria celular, controlando los niveles de ROS mediante potentes sistemas de defensa para no dañar los componentes celulares (Imlay, 2013).

El mantenimiento del estado de óxido-reducción de una célula es crítico para la supervivencia celular, especialmente cuando la disponibilidad de oxígeno es alta o hay presencia de agentes oxidantes. El estado redox está determinado por el equilibrio entre las formas oxidadas y reducidas de compuestos como NADH y NADPH, que funcionan como cofactores de diversas enzimas importantes para el desarrollo celular. Estos compuestos funcionan como transportadores de electrones y tienen como diferencia principal la presencia de un grupo fosfato, que les permite tener distintos papeles en el metabolismo. El NADH tiene principal importancia en la generación de ATP durante el catabolismo (cuando se generan ROS), mientras que el NADPH proporciona poder reductor para las vías anabólicas y suele estar involucrado en las reacciones que permiten detoxificar las especies reactivas. Estos dos tipos de dinucleótidos pueden interconvertirse mediante la acción de enzimas del tipo transhidrogenasas. Cuando hay un desbalance en el equilibrio redox celular generado por especies reactivas, tanto de oxígeno como de nitrógeno (RNS) y este se ve acompañado de daño a macromoléculas, podemos decir que las células se encuentran en condiciones de estrés nitro-oxidativo (Reniere, 2018).

El metabolismo microaeróbico

El estudio del metabolismo bacteriano se centra en la diversidad de reacciones químicas de oxidación y descomposición de compuestos que normalmente funcionan en las bacterias para generar energía. La generación de energía en los microorganismos suele provenir de la degradación oxidativa de compuestos carbonados, idealmente carbohidratos. Existen diversas vías por las cuales se pueden catabolizar los carbohidratos, siendo las principales la glucólisis clásica (o vía EMP *Embden – Meyerhof – Parnas*), la vía Entner-Doudoroff (ED) y la vía de las pentosas fosfato (Fuhrer, Fischer and Sauer, 2005). La obtención de energía se completa, en general, mediante reacciones de transferencia de electrones en la cadena respiratoria. En condiciones aeróbicas, las bacterias realizan respiración aeróbica, utilizando oxígeno como último aceptor de electrones, ya que esta es la manera en la que se genera mayor producción energética. En ausencia o baja disponibilidad de oxígeno los microorganismos tienen la capacidad de utilizar aceptores alternativos en la cadena de transporte de electrones, como NO_3^- , NO_2^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , CO_2 y otras moléculas orgánicas como el fumarato (Jurtshuk, 1996).

Adicionalmente, en condiciones de baja disponibilidad de O_2 , las bacterias pueden obtener energía a través de la fermentación. La fermentación es un proceso de óxido-reducción incompleta en el que la energía se obtiene mediante la fosforilación a nivel de sustrato (Müller, 2008). Los organismos que realizan procesos fermentativos suelen ser metabólicamente flexibles, presentando la capacidad de utilizar diversos sustratos. Entre los compuestos que se ha comprobado que las bacterias pueden fermentar podemos destacar azúcares (hexosas, pentosas, triosas, etc.), polialcoholes, aminoácidos, purinas, pirimidinas, citrato, glioxilato, succinato, entre muchos otros (Müller, 2008). Las especies del género *Pseudomonas*, por ejemplo, son capaces de fermentar el aminoácido arginina o el piruvato en condiciones microaerófilas (Vander Wauven *et al.*, 1984; Eschbach *et al.*, 2004).

Estrés oxidativo y nitrosativo en bacterias

Como se mencionó previamente, en ambientes en donde el oxígeno se encuentra presente se generan ROS que pueden derivar en la muerte de las células si no son detoxificadas y el daño reparado. Durante la respiración aeróbica, en la cadena respiratoria, el oxígeno puede reducirse de manera incompleta, generando la formación de especies reactivas tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^\cdot). Algunas de estas especies pueden derivar también de la actividad de flavoproteínas (como deshidrogenasas) cuando las mismas producen oxidaciones erróneas (Reniere, 2018).

Además de producirse a través del metabolismo aeróbico, las ROS pueden tener diversos orígenes: generarse por la presencia de antibióticos, ser secretados por especies competidoras en el mismo nicho ecológico, ser producidas por células del sistema inmune o derivar de la incidencia de luz ultravioleta y la presencia de sustancias químicas como los contaminantes (Chavez, Lunsdorf, and Jerez 2004; Torres, Jones, and Dangl 2006; Kohanski et al. 2007; Pezzoni, Pizarro, and Costa 2014). Además, los microorganismos pueden enfrentarse a estrés derivado de la presencia de especies reactivas del nitrógeno (RNS), que también pueden producir severos daños a macromoléculas. Las RNS poseen un rol importante en la salud humana debido a que son una de las principales herramientas del sistema inmune para combatir infecciones (Williams and Boon, 2019). Esto se logra mediante la producción de óxido nítrico (NO) en los macrófagos, reacción que involucra la enzima óxido nítrico sintasa inducible. Compuestos, como el N_2O y NO, pueden generarse también durante la reducción del nitrato durante la respiración anaeróbica (Rinaldo *et al.*, 2018). El NO también puede generarse a través de la enzima óxido nítrico sintasa presente en el genoma de varias especies de *Pseudomonas* y otras bacterias (Crack, Thomson and Brun, 2014). El NO es una molécula tóxica y reactiva para la mayor parte de los microorganismos, principalmente porque tiene la capacidad de reaccionar dando lugar a otras RNS: las reacciones cruzadas con O_2^- conllevan a la formación de peroxinitrito (OONO-), que posee un poder oxidante incluso mayor.

Los blancos biológicos de las ROS y de las RNS son el DNA, RNA, proteínas y lípidos (Koháryová and Kolárová, 2008; Tharmalingam *et al.*, 2017). En los lípidos, los radicales libres pueden atacar directamente los ácidos grasos preferentemente insaturados e inician la peroxidación lipídica (Figura 1).

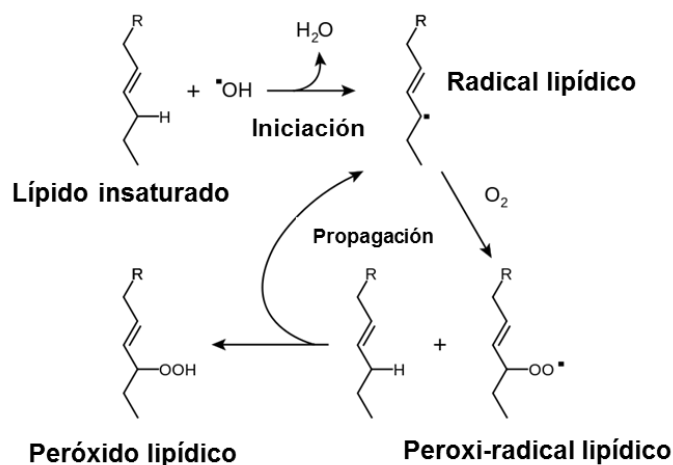


Figura 1: Representación de las vías de iniciación y propagación de la reacción de peroxidación lipídica.

Tomada de Young & McEneny, 2001.

El efecto primario de la peroxidación lipídica es la disminución de la fluidez de membrana y la alteración de sus propiedades, produciendo además la disrupción de la unión de proteínas que se encuentran insertas en ella. Esto actúa como un amplificador del efecto debido a que más radicales libres son formados y los lípidos afectados se degradan en diversos compuestos, algunos de los cuales son aldehídos altamente reactivos, que tienen como blanco a las proteínas. Estos aldehídos poseen una vida media más larga y pueden atacar a moléculas que se encuentran distantes al punto de origen del estrés oxidativo y son conocidos como mensajeros secundarios tóxicos (Humphries and Szweda, 1998). La reacción de radicales derivados de nitrógeno con lípidos conlleva a la peroxidación lipídica, derivando en la formación de nitrito-, nitro- y nitrosoperoxo- lípidos.

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

Por otro lado, las proteínas también son susceptibles al daño por parte de las especies reactivas. Entre los daños más comunes se incluyen: la oxidación de los grupos sulfhidrilos, la formación de uniones no adecuadas entre proteínas, la aducción oxidativa de los aminoácidos cercanos a grupos metálicos, la modificación de grupos prostéticos o metálicos y la carbonilación (Koháryová and Kolárová, 2008). Dentro del grupo de las proteínas es digno mencionar la reacción directa de las RNS con centros de metales de transición. De esta forma las RNS modifican proteínas que poseen centros prostéticos hemo, como las hemoglobinas, mioglobinas o citocromos C, oxidando el grupo hemo Fe^{2+} a Fe^{3+} . Además, afectan a las proteínas que poseen residuos tirosina y cisteína libres, produciendo S-nitrosilación (Reniere, 2018).

La patogenicidad microbiana, así como la adaptabilidad ecológica están intrínsecamente correlacionadas con la capacidad del organismo de evadir y protegerse del estrés oxidativo y nitrosativo. Las consecuencias fisiológicas de la presencia de ROS y RNS dependen de diversas variables, como la fase de crecimiento en la que se encuentran las células o la actividad metabólica, dependiendo de los nutrientes con los que cuenta y los sistemas de defensa para hacer frente al estrés.

Estrés nitro-oxidativo y metabolismo del hierro

El hierro es el metal más abundante en las células, se encuentra típicamente formando parte de diversas proteínas como grupos prostéticos o como cofactor (Frawley and Fang, 2014). El hierro participa en muchos procesos biológicos, tales como la fotosíntesis, la fijación de N₂, la metanogénesis, la respiración celular, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), el transporte de oxígeno, la regulación genética y la biosíntesis de DNA. Su funcionalidad biológica depende casi por completo de su incorporación a proteínas, ya sea como una especie mono o binuclear, o en una forma más compleja como parte de *clusters* Fe-S o grupos hemo (Andrews, Robinson and Rodríguez-Quiñones, 2003). A pesar de su rol fundamental en el metabolismo, la presencia de hierro puede resultar perjudicial para las células, ya que puede potenciar la toxicidad del oxígeno a partir de la reacción de Fenton. En la misma, Fe²⁺ se oxida en presencia de H₂O₂ provocando la generación de radicales hidroxilos, los cuales presentan gran poder oxidante (Figura 2I). En este sentido, los organismos deben balancear los niveles de Fe intracelulares, de manera tal de garantizar un funcionamiento óptimo de las células y proteger contra la toxicidad inducida por hierro.

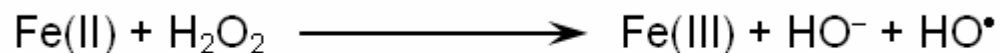


Figura 2I: Reacción de Fenton

Uno de los blancos de ataque de las ROS son las proteínas que presentan átomos de Fe como cofactores, generando inhibición de la acción enzimática y subsiguiente liberación de Fe (Kim and Park, 2014). El aumento de hierro libre en el citoplasma potencia la reacción de Fenton aumentando el daño celular generado. Por otra parte, las RNS reaccionan los centros poseen hierro (*clusters* Fe-S, centros de Fe mono y binucleares y grupos hemo), los tioles y el superóxido. Estos productos pueden almacenar NO o ejercer efectos tóxicos, mientras que su formación puede iniciar cambios redox o conformacionales (Poole, 2005). En este sentido, la regulación del metabolismo del hierro, y su acoplamiento con la regulación de las defensas contra el estrés nitro-oxidativo, es un factor esencial para la vida en presencia de oxígeno (Touati, 2000).

Defensas antioxidativas en bacterias

Para adaptarse y sobrevivir a las especies reactivas, tanto generadas de manera endógena como exógena, los microorganismos presentan una gran batería mecanismos de defensa. Entre los mecanismos que permiten hacer frente al estrés podemos encontrar sistemas de reparación de macromoléculas oxidadas, producción de tioles antioxidantes de bajo peso molecular, secuestro de metales y producción de enzimas de detoxificación, que incluyen catalasas, superóxido dismutasas, tiol-peroxidasas, glutatión peroxidasas y distintos tipos de reductasas (Baptista *et al.*, 2012; Reniere, 2018). Las enzimas antioxidantes remueven superóxido y peróxido de hidrógeno para evitar que reaccionen con iones metálicos y produzcan especies más reactivas como el radical hidroxilo.

Las superóxido dismutasas (SODs) son enzimas que catalizan la dismutación del O_2^- en O_2 y H_2O_2 , siendo este último desintoxicado por catalasas y peroxidasas (Mishra and Imlay, 2012). Las catalasas, por su parte, son enzimas cuya función principal es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Figura 3I). Las catalasas se dividen en dos grupos: monofuncionales (solo actividad catalítica) o bifuncionales, también llamadas catalasa-peroxidasas ya que presentan actividad tanto catalítica como peroxidativa (Dubbs and Mongkolsuk, 2007).

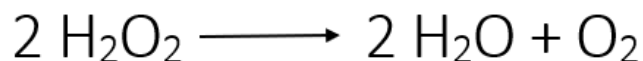


Figura 3I: Reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno realizada por la enzima catalasa

Las peroxidasas son otras enzimas encargadas de la detoxificación de ROS. Aquellas que poseen grupos tioles se denominan peroxirredoxinas. Entre estas se encuentran las alquil hidroperóxido reductasas (AHPs), las tiol peroxidasas (TPXs) y las reductasas de peróxidos orgánicos (OHRs), que reducen peróxidos orgánicos e inorgánicos. Asimismo, luego de ejercer su función este tipo de proteínas requieren de la acción de reductasas que regeneren los sitios catalíticos (sistema AhpC/AhpF y tiorredoxina/tiorredoxina reductasa) (Dubbs and Mongkolsuk, 2007).

El glutatión reducido (GSH), un tiol de bajo peso molecular, puede actuar directamente sobre las ROS, eliminándolas, o indirectamente como un cofactor de enzimas involucradas en la protección del estrés oxidativo, como glutatión peroxidasas (GPXs) y glutatión S-transferasas (GSTs). Las bacterias también producen tiorredoxinas (TRX) y glutarredoxinas (GRX). Estas son proteínas ubicuas y

conservadas evolutivamente, que pueden actuar directamente sobre las ROS. Sin embargo, su función principal es la de reducir los enlaces disulfuro de proteínas: un proceso que es necesario para la función de algunas enzimas protectoras del estrés oxidativo (como por ejemplo las peroxirredoxinas) y la regeneración de tioles peptídicos (Dubbs and Mongkolsuk, 2007). Luego de su acción las TRX y GRX son recicladas por la acción de tiorredoxinas reductasas y GSH, respectivamente (Reniere, 2018).

Para la detoxificación de RNS las células utilizan tanto enzimas pertenecientes a las vías de detoxificación de ROS (como AHPs, y enzimas relacionadas con el GSH) así como otras que actúan específicamente en la detoxificación de RNS. Estas defensas contra el NO y derivados incluyen la enzima óxido nítrico reductasa (NorB) presente en las bacterias desnitrificadoras, la flavorubredoxina (NorVW) y enzimas del tipo globinas (flavohemoglobina, hemoglobina y globinas truncadas) (Poole, 2005).

Relación entre el metabolismo central del carbono y el estrés oxidativo

La reducción de la mayoría de las enzimas de detoxificación mencionadas anteriormente depende, en última instancia, de los electrones suministrados por NADPH y NADH. En consecuencia, la proporción de NADPH/NADH reducidos a NADP⁺/NAD⁺ oxidados afecta la capacidad de las células para controlar los niveles de especies reactivas. La reducción de estos compuestos depende de varias vías metabólicas, especialmente la glucólisis, TCA y la vía de las pentosas fosfato. Asimismo, cualquier estrés general que altere los niveles de NADPH y NADH, y sus contrapartes oxidadas, también puede afectar los niveles celulares de ROS (Dubbs and Mongkolsuk, 2007).

Teniendo en cuenta los requerimientos celulares, bajo condiciones de estrés oxidativo, las concentraciones de NADH deben bajar mientras que las de NADPH deben subir (Shimizu and Matsuoka, 2019a). El NADPH puede generarse a partir del NADH mediante reacciones de transhidrogenación o puede surgir mediante la modificación de los flujos metabólicos bacterianos, llevándolo de las vías glucolíticas tradicionales hacia el ciclo de las pentosas fosfato (Shimizu and Matsuoka, 2019a).

Reguladores redox

Los microorganismos poseen diversas redes regulatorias sofisticadas e interrelacionadas que activan o reprimen la expresión de los caminos metabólicos de acuerdo a las condiciones ambientales (Chubukov

et al., 2014), incluyendo la disponibilidad de oxígeno. Los reguladores redox controlan principalmente la transición del metabolismo aeróbico al anaeróbico afectando un gran número de genes. Estos reguladores tienen profundos efectos en todos los aspectos de la fisiología bacteriana, afectando el metabolismo y las interacciones con otros organismos y con el ambiente. En *E. coli* se han identificado dos reguladores, ArcA y Fnr, que modulan la expresión de un gran número de operones en función del estado redox del ambiente. ArcA integra un sistema sensor-regulador de dos componentes (ArcAB), que reprime una amplia variedad de procesos aeróbicos en condiciones anaeróbicas y el otro, Fnr (fumarato y nitrato reducción), es esencial para controlar la expresión de procesos anaeróbicos (Nikel *et al.*, 2006). En *Pseudomonas* la transición del metabolismo aeróbico al microaeróbico/anaeróbico está mediada por el regulador Anr, homólogo a Fnr de *E. coli* (Sawers, 1991). La capacidad de estos reguladores (Anr y Fnr) de detectar los cambios en los niveles de O₂ radica en un centro Fe-S. La reducción de este centro como respuesta a la disminución de la tensión de O₂ determina un cambio conformacional que permite la dimerización aumentando la unión sitio específica al DNA en los genes blanco (Lazizzera, Bates and Kiley, 1993; Jarvis and Green, 2007). Los reguladores se unen a regiones consenso, denominadas Anr/Fnr-box, localizadas en las zonas promotoras de los genes blanco. La proteína Anr es activa en condiciones de anaerobiosis y está involucrada en la utilización de nitrato como último aceptor de electrones y en la fermentación de la arginina para obtener energía por fosforilación a nivel de sustrato (Galimand *et al.*, 1991). Además de su papel en el metabolismo energético, actualmente se ha descrito que Anr regula genes involucrados en otros procesos celulares y se han predicho nuevas funciones a través del análisis bioinformático y experimental del regulon Anr (Trunk *et al.*, 2009; Sonnleitner *et al.*, 2011; Tribelli *et al.*, 2019).

La regulación de la respuesta a estrés en bacterias suele estar coordinada por dos reguladores globales OxyR y SoxRS (Pomposiello and Demple, 2001). OxyR es un regulador de la familia de LysR, que responde a la presencia de H₂O₂, pero también puede responder a nitrosotioles. OxyR controla un regulón de casi 40 genes, entre los que se encuentran glutarredoxinas, catalasas, alquil hidroperóxido reductasas y Fur, un represor del transporte de hierro (Pomposiello and Demple, 2001). En consecuencia, las mutantes *oxyR* son hipersensibles a H₂O₂ y la expresión constitutiva del regulón OxyR como producto de mutaciones constitutivas en *oxyR*, aumenta la resistencia (Cabicol, Tamarit and Ros, 2000). SoxRS es un sistema regulador de genes de respuesta al estrés oxidativo principalmente descrito en *E. coli*. Las proteínas codificadas por *soxRS* conforman un sistema de dos componentes cuando el regulador SoxR se activa, induce la expresión de SoxS, que a su vez regula varios genes importantes en la respuesta al estrés oxidativo (Pomposiello and Demple, 2001).

Pequeños RNAs regulatorios en bacterias

Además de los mecanismos específicos y los reguladores globales redox descritos anteriormente para hacer frente a los cambios en la disponibilidad de O₂ y al estrés oxidativo/nitrosativo, las bacterias cuentan con otros sistemas regulatorios que pueden contribuir a la adaptación. Como ya mencionamos anteriormente, los microorganismos se desarrollan en ambientes que no son estáticos, sino que sufren cambios a lo largo del tiempo, como pueden ser alteraciones en el pH, los niveles de oxígeno, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de compuestos tóxicos. En ese sentido, la supervivencia se encuentra fuertemente relacionada a la capacidad de adaptarse rápidamente a estos cambios. Para poder hacer frente a los cambios ambientales, las bacterias presentan mecanismos para detectar estímulos extracelulares y generar respuestas coordinadas. Estas respuestas se dan principalmente mediante el control de la actividad proteica o regulando la expresión génica. En estos procesos pueden intervenir factores regulatorios proteicos o moléculas de RNA. La regulación genética mediada por RNA posibilita una respuesta rápida y complementaria a la regulación transcripcional, en particular cuando se está en presencia de señales persistentes como, por ejemplo, en situaciones de estrés (Levine *et al.*, 2007; Levine and Hwa, 2008). La acción sinérgica entre ambos tipos mecanismos regulatorios permite dar una respuesta rápida, precisa y sin escapes, frente a un estímulo externo (Gottesman and Storz, 2011).

Los pequeños RNAs no codificantes (sRNA) son elementos adicionales en estas redes reguladoras globales, y desempeñan un papel clave como reguladores postranscripcionales, mediando en la estabilidad de RNA mensajeros (mRNA) y / o en la eficiencia de traducción. Aunque los sRNA están muy extendidos en los procariontes, son heterogéneos en tamaño y estructura. Existen numerosos ejemplos de sRNA involucrados en diferentes procesos celulares, como el metabolismo energético, *quorum sensing* (QS), la formación de *biofilms*, la respuesta al estrés, la adaptación a diversas condiciones de crecimiento y la patogénesis (Michaux *et al.*, 2014). Se ha descrito previamente el rol de algunos sRNA que se encuentran inducidos en respuesta al estrés oxidativo. Entre ellos, cabe destacar el estudio de OxyS y RhyB en especies modelo como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Hess and Marchfelder, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente muchos sRNA bacterianos están involucrados en la regulación de la respuesta a distintos tipos de estrés, donde frecuentemente ocurre que una señal externa desencadena una respuesta celular que puede ser costosa (en términos de energía y nutrientes) o incluso tóxica. En tales casos, los sRNA pueden definir un umbral para la activación de la respuesta. Este umbral puede reflejar el nivel de tolerancia de la célula a ese estrés particular. Podemos tomar como ejemplo de esto el caso del sRNA RhyB en *E.coli*, donde la tasa de transcripción

de RyhB refleja la concentración de iones libres de Fe^{2+} en la célula, los cuales potencialmente provocan estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton (Levine and Hwa, 2008).

Los mecanismos por los cuales los sRNA modifican la expresión génica son diversos. Entre ellos, los sRNA pueden afectar la traducción por competencia directa por el sitio de unión a ribosoma (RBS), bloqueándola. Asimismo, si el mRNA presenta estructuras secundarias que bloquean el RBS, la unión del sRNA libera este sitio dando como resultado la activación de la traducción. En otros casos, los sRNA pueden promover la degradación de los mensajeros mediada por RNasa E. Además, la unión de un sRNA también puede causar la estabilización del mRNA, aumentando la producción de proteínas (Wagner and Romby, 2015). La regulación de la expresión de sRNA en *Pseudomonas* es un área de investigación importante y activa, cuyos estudios se encuentran principalmente enfocados en *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista, debido a su importancia clínica (Sonnleitner *et al.*, 2011; Gómez-Lozano *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2017). Sin embargo, su genética y fisiología difieren en muchos casos de las del resto de las especies de *Pseudomonas* adaptadas a diferentes ambientes, muchas de las cuales tienen importantes aplicaciones biotecnológicas.

Los sRNA pueden clasificarse de acuerdo con las regiones genómicas en las cuales se encuentran codificados. Cuando el RNA regulatorio se transcribe a partir del mismo *locus* genético del mRNA *target*, este se encuentra en *cis*. En esta clase podemos encontrar los sRNA antisentido (*antisense* o *asRNA*), que se transcriben a partir de la cadena complementaria a la cadena codificante de un mRNA. Por este motivo son altamente complementarios en secuencia a sus blancos y modulan su expresión sin la necesidad de factores adicionales (Storz, Vogel and Wassarman, 2011). Además, se conocen los RNA del tipo *riboswitch*, los cuales forman parte de la región 5' UTR (de *Un-Translated Region*) del mRNA que regulan. Los *riboswitches* suelen modificar las tasas de traducción mediante la unión a pequeñas moléculas o metabolitos celulares y controlan las vías biosintéticas o los mecanismos de transporte directamente relacionados con el ligando unido (Abduljalil, 2018). En esta categoría también cabe mencionar a los RNA termómetros, que actúan en respuesta a los cambios de temperatura (Hess and Marchfelder, 2012).

Por otro lado, los sRNA codificados en trans (*sRNA trans*) se transcriben desde las regiones intergénicas o las regiones 3' UTR de los mRNA. En general, integran unidades transcripcionales independientes que se encuentran en regiones intergénicas a lo largo de todo el genoma y poseen promotores específicos (Gottesman and Storz, 2011). Este tipo de sRNA suele presentar estructuras complejas y su mecanismo de acción se encuentra fuertemente ligado a ella. Debido a que esta clase de sRNA se transcribe a partir de regiones alejadas de los genes a los cuales regulan, la mayoría de los sRNA caracterizados hasta el momento actúan por apareamiento parcial de bases con sus mRNA blanco (Wagner and Romby, 2015). Debido a que la complementariedad de bases es parcial, un solo

sRNA puede actuar sobre más de un mRNA *target*, creando redes regulatorias de mayor complejidad (Beisel and Storz, 2010). En este último caso, la mayor parte de estos sRNA se unen a Hfq, una proteína chaperona de RNA, necesaria para su función y / o estabilidad, debido a que media en la interacción sRNA-mRNA cuando la complementariedad de bases no es total (Storz, Vogel and Wassarman, 2011; Gorski, Vogel and Doudna, 2017). Hfq es común a la mayoría de las especies bacterianas, y su ausencia tiene efectos importantes en la adaptabilidad y supervivencia de las bacterias (Vogel and Luisi, 2011).

Aproximaciones para el estudio de la fisiología bacteriana en distintas condiciones

Teniendo en cuenta que la respuesta a los cambios en la disponibilidad de O₂ y al estrés oxidativo/nitrosativo involucra la función de múltiples genes y mecanismos, el empleo de técnicas globales que permitan analizar la totalidad de los cambios que ocurren en la maquinaria celular constituyen una herramienta de utilidad para este tipo de estudios.

Las técnicas globales

Las técnicas globales, también denominadas “ómicas”, comprenden el estudio a escala masiva de moléculas biológicas de uno o más organismos para su cuantificación y caracterización. El empleo de estas técnicas permite una mayor comprensión de la dinámica de los organismos, sus estructuras y las diversas funciones que llevan a cabo. Entre las diversas técnicas “ómicas” podemos destacar la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, que se enfocan en el estudio del DNA, RNA, proteínas y metabolitos, respectivamente (Figura 3I).

En los últimos años el desarrollo de estas técnicas de alto rendimiento ha permitido la generación de grandes volúmenes de datos, cuyo análisis requiere la integración de conocimientos de biología molecular, bioinformática y estadística. Este enfoque multidisciplinario permite comprender de manera más profunda los sistemas complejos, generando nuevas hipótesis de trabajo.

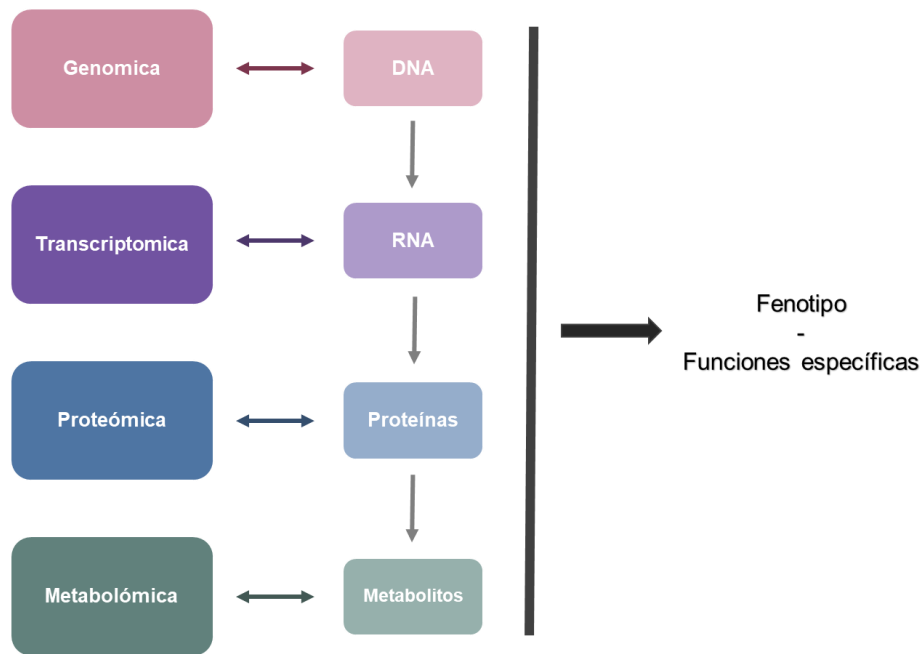


Figura 3I: Técnicas “ómicas”, sus blancos de estudio y la interacción entre las mismas

Genómica

El genoma incluye el conjunto completo de genes de un organismo necesarios para su funcionamiento. La genómica, que comprende la secuenciación de genomas completos, su mapeo y análisis, ha permitido muchos avances en microbiología al proporcionar la información genética completa que posee un microorganismo. Sin embargo, el conocimiento de la información completa no es suficiente para determinar la funcionalidad de los genes ni su expresión en determinadas condiciones, por lo que estos estudios deben complementarse con el análisis de genes individuales o con otras técnicas globales que permiten analizar la expresión de genes y proteínas, como las que se describen a continuación.

Transcriptómica

Los RNA son moléculas que poseen diversas funciones biológicas, ya sea porque actúan como intermediarios en la síntesis proteica o porque poseen roles catalíticos y regulatorios. La actividad molecular de las células está dada, en gran parte, por la abundancia relativa y la actividad de sus

diferentes moléculas de RNA a lo largo del tiempo y en respuesta a los diferentes estímulos. La transcriptómica se refiere al análisis del conjunto de moléculas de RNA, incluyendo mRNAs, rRNAs, tRNAs y otros RNAs no codificantes, que se encuentran presentes en una célula o un conjunto de células en un momento determinado y en condiciones específicas

Las técnicas transcriptómicas comprenden los *microarrays*, la secuenciación de RNA de alto rendimiento (RNA-seq de *Ribonucleic acid sequencing*) y la secuenciación de ARN de una única célula (*single cell RNAs-seq*). La primera tecnología innovadora implementada para el análisis transcriptómico a gran escala fueron los *microarrays*, que permiten cuantificar la abundancia relativa de diversos genes en distintas poblaciones celulares o como respuesta a diversos estímulos. Sin embargo, su utilización requiere conocimiento previo de las secuencias génicas y la síntesis de sondas específicas por lo que es limitada para el descubrimiento de nuevos transcritos (Liang, 2013).

La aparición de los métodos de secuenciación de última generación o NGS (*Next-Generation Sequencing*), y con ellos las técnicas de RNAseq, supuso el fin de este problema ya que permite la detección de transcritos desconocidos y la cuantificación absoluta de su presencia. En los últimos años se han comenzado a aplicar las tecnologías NSG para el análisis de los transcritos de células individuales, lo que permitiría diferenciar los niveles de transcripción en poblaciones celulares mixtas o complejas.

Los protocolos de RNAseq suelen incluir tres etapas características: extracción del RNA, preparación de las bibliotecas y secuenciación. Sin embargo, existen varias características del diseño experimental que se pueden modificar de acuerdo con el análisis que se pretenda realizar. Por ejemplo, la sensibilidad de los experimentos se puede aumentar eliminando el rRNA durante la preparación de las muestras, ya que las secuencias resultantes resultan muy abundantes, pero generalmente aportan poca información. Asimismo, las bibliotecas confeccionadas pueden ser direccionales, lo que permite preservar la información de la cadena del DNA desde la cual se realiza la transcripción, al contrario de lo que ocurre en el caso de las bibliotecas no son direccionales (Levin *et al.*, 2010). Durante la última etapa se debe determinar si la secuenciación de los fragmentos se hará en un solo sentido (*single-end sequencig*) o desde ambos extremos (*paired-end sequencig*). La secuenciación del tipo *paired-end* produce alineamientos más robustos, sin embargo, ambas pueden ser utilizadas para realizar cuantificaciones de los niveles de expresión de transcritos (Wang, Gerstein and Snyder, 2009). Por último, es importante determinar la profundidad de la secuenciación, es decir el número de lecturas de secuencia (o *reads*) que se pretende obtener a partir del RNAseq. Un mayor número de lecturas (es decir, una secuenciación más profunda) permitirá una mayor cobertura del transcriptoma permitiendo la detección de transcritos que poseen baja abundancia.

Proteómica

Las proteínas son moléculas vitales de los organismos vivos, ya que constituyen los componentes funcionales y estructurales de todas las células. La proteómica es un estudio a gran escala que permite tener una imagen de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente en una célula o conjunto de células (Wilkins, 2009). La identificación, cuantificación y comparación sistemática de las proteínas presentes en diferentes situaciones metabólicas permite identificar aquellas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. Los análisis proteómicos pueden permitir, también, detectar modificaciones post-transcripcionales en las secuencias proteicas, como fosforilaciones, metilaciones o glicosilaciones, por nombrar algunas.

Las técnicas que permiten estudiar el conjunto de proteínas presentes en un conjunto de células se pueden dividir en dos categorías, aquellas que utilizan anticuerpos y aquellos que se realizan utilizando espectrometría de masas (MS). En general, las técnicas que implican estudios de MS implican una primera fase de separación que puede realizarse en geles desnaturizantes (2D SDS-Page) o utilizando técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Wilkins, 2009). El segundo paso es la identificación de las proteínas por MS. Debido a las limitaciones del sistema, los péptidos deben ser digeridos en fragmentos más pequeños que puedan ser analizados. En muchos casos se utilizan dos espectrómetros en tándem (MS/MS) de manera tal de afinar la identificación de las proteínas (Weston and Hood, 2004).

Pseudomonas extremaustralis: modelo del presente estudio

P. extremaustralis es una especie proveniente de la Antártida, aislada por el laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana (Ayub *et al.*, 2004; López *et al.*, 2009). El aislamiento se realizó a partir de una charca temporal en el continente Antártico, un ambiente sujeto a alta incidencia de luz ultravioleta, variaciones extremas de luminosidad, escasez de nutrientes y cambios de temperatura, caracterizados por procesos de congelamiento y descongelamiento. *P. extremaustralis* posee una alta resistencia al estrés, ya sea oxidativo o térmico (tanto a altas como bajas temperaturas) (Ayub *et al.*, 2004; Ayub, Tribelli and López, 2009) y si bien puede crecer como mesófila es capaz de crecer eficientemente a baja temperatura (Raiger Lustman *et al.*, 2015). Posee la capacidad de acumular polihidroxicanoatos (PHA), principalmente como polihidroxibutirato (PHB), la acumulación de este polímero es esencial para la supervivencia en frío (Ayub *et al.*, 2009; Catone *et*

al. 2014). *P. extremaustralis* puede crecer en aerobiosis pero también en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas mediante la reducción de nitratos o la fermentación de arginina y piruvato (Tribelli, Méndez and López, 2010; Raiger lustman *et al.*, 2015).

Estudios realizados con el regulador global Anr en *P. extremaustralis* mostraron su influencia sobre la producción de PHB (Tribelli, Méndez and López, 2010) y otros procesos celulares, como las primeras etapas de formación de *biofilms*, la resistencia al estrés oxidativo y el mantenimiento del equilibrio redox en microaerobiosis (Tribelli *et al.*, 2013; Tribelli, Hay and López, 2013).

El análisis del genoma de *P. extremaustralis* permitió detectar la presencia de un sistema de defensa antioxidante bien desarrollado que incluye cinco catalasas, una superóxido dismutasa, un citocromo c551 peroxidasa y dos alquilhidroperóxido reductasas. Adicionalmente, posee tres flavohemoglobinas, una hemoglobina (HbO), dos glutatión sintetasas y diversas glutatión S-transferasas.

En base a lo expuesto y a la importancia del estudio de la respuesta a estrés oxidativo/nitrosativo en distintos niveles de aireación en especies de *Pseudomonas* tanto desde el punto de vista básico como aplicado por su potencialidad para aplicaciones biotecnológicas, surgen los objetivos de este trabajo que se centra en *P. extremaustralis*, una bacteria extremófila que posee características particulares y otras similares a otras especies de *Pseudomonas*, que la convierten en un buen modelo de estudio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los mecanismos específicos implicados en la desintoxicación de ROS y RNS en condiciones de baja tensión de oxígeno, su regulación y la presencia de otros factores fisiológicos que pueden ser relevantes en estos procesos aún no se han estudiado en profundidad en bacterias del género *Pseudomonas*. Estas condiciones se pueden encontrar en el ambiente, particularmente en biofilms donde se producen gradientes de disponibilidad de O₂. Debido al impacto que los agentes oxidantes pueden tener incluso en condiciones de crecimiento a bajas tensiones de oxígeno, planteamos la hipótesis de que existen mecanismos aún no dilucidados que son relevantes en la respuesta al estrés oxidativo derivado de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) en condiciones microaeróbicas, y que estos mecanismos son cruciales para la supervivencia y la adaptabilidad en el ambiente. En este contexto se plantea como objetivo de esta tesis el análisis de la respuesta a estrés oxidativo/nitrosativo a bajas tensiones de O₂, abordando los siguientes objetivos particulares:

1. Estudiar los mecanismos de adaptación a microaerobiosis y estrés oxidativo/nitrosativo en *P. extremaustralis* utilizando técnicas globales de transcriptómica y proteómica
2. Analizar la relevancia de genes y metabolismos detectados por técnicas globales en la supervivencia y resistencia a estrés oxidativo en aerobiosis y microaerobiosis, mediante estudios genéticos y fisiológicos.
3. Analizar la presencia y funcionalidad de pequeños RNA (sRNA) regulatorios relacionados con microaerobiosis y estrés oxidativo en *P. extremaustralis*.

MATERIALES

y

MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Microorganismos y plásmidos utilizados

1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Los experimentos presentados en esta tesis se realizaron con *Pseudomonas extremaustralis* una especie aislada a partir de muestras procedentes del continente Antártico (López *et al.*, 2009). Otras cepas y los plásmidos utilizados durante el desarrollo de este trabajo y sus características principales se describen en la Tabla 1M.

Tabla 1M: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>P. extremaustralis</i> 14-3 b	Salvaje	(López <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. extremaustralis</i> / pBAD18-sRNA40	Contiene el plásmido pBAD 18-Km	Este trabajo
<i>P. extremaustralis</i> / pBAD18	Contiene el plásmido pBAD 18 –Km con la secuencia del sRNA40 bajo el control del promotor <i>araBp</i>	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5-α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) U169, <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> , Φ80 Δ(<i>lacZ</i>)M15, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> .	(Inoue, Nojima and Okayama, 1990)
DH5-α / pBAD 18	Cepa DH5-α conteniendo el plásmido pBAD 18-Km	Este trabajo
DH5-α / pBAD 18-sRNA40	Cepa DH5-α conteniendo el plásmido pBAD 18 – Km con la secuencia del sRNA40 bajo el control del promotor <i>araBp</i>	Este trabajo
Plásmido		
pBAD 18-Kan	kan ^R <i>araC</i> pBR322/ <i>ColE1</i> M13, promotor inducible por arabinosa <i>araBAD</i>	(Guzman LM <i>et al.</i> , 1995)

1.2. Medios de cultivo y antibióticos utilizados

Los cultivos bacterianos se efectuaron en medio LB caldo o suplementado con agar para cultivos en medio líquido o sólido, respectivamente. La conservación de bacterias a largo plazo se realizó por congelamiento a -80°C de alícuotas de cultivos en fase estacionaria previa adición de glicerol 20% (v/v) como criopreservante.

Los antibióticos utilizados y sus concentraciones finales fueron: Ampicilina (Amp) $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Kanamicina (Kan) $25\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Cloranfenicol (Cn) $10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para los experimentos con *Pseudomonas* y Amp $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y Kan $50\ 25\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cuando se utilizó *E. coli*.

1.3. Condiciones de cultivo

Como se detalló anteriormente, los ensayos de *P. extremaustralis* salvaje y sus cepas derivadas se realizaron en medio LB a 28°C , a menos que se indique lo contrario. Los cultivos aeróbicos se realizaron en frascos de tipo Erlenmeyer manteniendo una relación 1:10 (volumen medio de cultivo: volumen frasco) y agitación alta (200 rpm). Para las condiciones de baja aireación o microaerobiosis se empleó una relación 1:2 (volumen medio de cultivo: volumen frasco) y agitación suave (50 rpm). Los cultivos microaeróbicos fueron suplementados con KNO_3 0,08% como se empleó en trabajos anteriores con *P. extremaustralis* (Tribelli, Méndez and López, 2010).

Para experimentos de estrés oxidativo, se utilizaron cultivos crecidos aeróbicamente o microaeróbicamente durante 24 h los cuales se incubaron durante 1 h con H_2O_2 3 mM (condiciones a-OS y m-OS, respectivamente). En el caso de los ensayos de estrés nitrosativo, se utilizaron cultivos crecidos en condiciones aeróbicas o microaeróbicas durante 24 h los cuales se incubaron con S-nitrosoglutatone (GSNO) $100\ \mu\text{M}$ durante 1 h (condiciones a-NS y m-NS, respectivamente).

1.4. Curvas de crecimiento

Para analizar el crecimiento bacteriano en microaerobiosis se realizaron curvas de crecimiento en placas multipocillo. En cada caso a partir de precultivos *overnight* (ON) se inocularon las bacterias en medio de cultivo LB suplementado con KNO_3 0,08% a una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) inicial de 0,05, se colocaron 200 μl en cada pocillo y se incubó a 28°C . La densidad óptica se monitoreó a lo largo de 24

h, a intervalos de 30 min, utilizando un lector automatizado de placas (BMG OPTIMA FLUOstar). Debido a las condiciones de cultivo (la placa se mantuvo estática durante 29 min, agitándose a 100 rpm durante 1 min previo a la medición a fin de homogeneizar las muestras) podemos considerar esta condición de crecimiento como microaeróbica. Para los ensayos de inhibición del crecimiento se añadió H₂O₂ o GSNO en distintas concentraciones a tiempo inicial, procediéndose de manera similar a la descrita.

1.5. Experimentos de supervivencia

Para estimar la viabilidad celular luego de la exposición a distintas condiciones de estrés se sembraron diluciones apropiadas de cultivos control (CC) o cultivos sometidos a estrés (CE) en placas de Petri conteniendo agar LB, las cuales se incubaron a 28 °C. Luego de 24 h se determinó el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC / ml). El nivel de viabilidad celular o índice de supervivencia se expresó con referencia a los cultivos de control como UFC_{CE}/UFC_{CC}. En los que se informa un porcentaje ese índice fue multiplicado por 100.

1.6. Sensibilidad al peróxido de hidrógeno en medio sólido

Para determinar la resistencia al estrés oxidativo de *P. extremaustralis* en diversas condiciones de aireación se empleó un ensayo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en medio sólido utilizado previamente en el laboratorio (Ayub *et al.*, 2004). Las bacterias fueron cultivadas durante 24 h en condiciones aeróbicas o microaeróbicas. Luego de lo cual se ajustó la DO_{600nm} de los cultivos a 1,5 y se sembraron 100 µl en placas de medio LB. Para mantener uniformidad en las condiciones experimentales las placas se prepararon con 20 ml de medio de manera que siempre presenten el mismo grosor. Posteriormente se dejaron secar durante 15 min y se colocaron 3 filtros Whatman n°1 estériles (6 mm de diámetro) dejándolos secar nuevamente durante 15 min. Luego se agregaron 5 µl de H₂O₂ 30% (v/v) (Merck). Las placas se incubaron durante la noche y se determinó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento utilizando el software ImageJ (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012).

2. Técnicas globales

2.1. Análisis proteómico por LC/MS-MS

2.1.1. Extracción de proteínas

En los casos donde se analizaron los perfiles proteicos de *P. extremaustralis* se realizaron extracciones de proteínas totales a partir de cultivos en diversas condiciones de crecimiento y estrés. Para ello se cosecharon las células por centrifugación y los pellets obtenidos fueron lavados 2 veces con buffer PBS suplementado con PMSF 1mM (Anexo *Buffers*). Las células se resuspendieron en este mismo buffer y se sonicaron en el equipo Ultrasonic Homogenizer 4710 (Biologics, inc.) durante 12 ciclos de 45 seg al 50% de potencia con pausas en hielo. En cada caso se determinó la concentración de proteínas en las muestras mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando albúmina de suero bovino como estándar.

2.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS page)

Las muestras proteicas se analizaron mediante corridas electroforéticas en geles desnaturalizantes (SDS page). Previamente, las mismas fueron calentadas 5 min a 100°C en presencia de buffer de siembra (o *cracking* buffer – Anexo *Buffers*). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en una cuba de electroforesis vertical (10 x 10 cm x 1mm) de acuerdo al protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando un gel de corrida al 12% y un gel concentrador al 5%. Las electroforesis se llevaron a cabo a amperaje constante de 25 miliamperes hasta que las muestras atravesaran el gel concentrador, para luego aumentarse a 35 miliamperes. Las proteínas se visualizaron mediante la tinción de los geles en una solución de 0,2% de Coomasie Brilliant Blue R-250 en 45% de metanol y 10% de ácido acético durante una hora. Para decolorar, se dejaron durante toda la noche en una solución de 45% de metanol y 10% de ácido acético.

2.1.3. Métodos experimentales

Se cosecharon las células provenientes de 50 ml de cultivos en aerobiosis (24 h), a-OS, microaerobiosis (24 h) y m-OS, por centrifugación. Los pellets obtenidos fueron sonicados y cuantificados. Para cada condición se utilizaron 3 réplicas independientes, sembrándose cantidades iguales de proteínas para cada muestra.

Las proteínas extraídas se corrieron geles de poliacrilamida (SDS Page), de acuerdo a lo descrito anteriormente, durante aproximadamente 1 h, de manera tal de concentrar las proteínas presentes. Las muestras 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, Argentina) para su análisis. Los fragmentos de gel se lavaron, se redujeron, se alquilaron y se sometieron a digestión en gel con tripsina. Los péptidos se analizaron utilizando nanoLC-MS / MS (nanoHPLC EASY-nLC 1000 acoplado a un módulo Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass, Thermo Scientific).

2.1.4. Análisis de datos

Para la identificación, cuantificación, análisis de datos y visualización de proteínas se utilizaron distintas herramientas bioinformáticas. El software MaxQuant (Tyanova, Temu and Cox, 2016) se utilizó para procesar los espectros de masas e identificar los péptidos. La identificación de péptidos se realizó con una probabilidad de falsos positivos (*false discovery rate*, FDR) del 1%. Para la identificación de cada proteína, fue requerida al menos la identificación de dos péptidos únicos. La cuantificación de los niveles de proteína se realizaron utilizando el módulo “*Protein Quantification*” encontrado en el programa MaxQuant, utilizando el modo “*Unique + Razor*” Todas las réplicas biológicas en cada condición se incluyeron en el diseño experimental de la cuantificación de los niveles de proteína y su normalización.

Los análisis estadísticos y la visualización de datos se efectuaron utilizando el software Perseus (Tyanova *et al.*, 2016). La clasificación en categorías funcionales se realizó utilizando bases de datos como Panther, Metacyc y KEGG (Ogata *et al.*, 1999; Caspi *et al.*, 2016; Mi *et al.*, 2017).

2.2. Análisis transcriptómico (RNAseq)

Se analizó la expresión genética global de *P. extremaustralis* en respuesta a diferentes condiciones utilizando técnicas de secuenciación masiva de RNA. Los análisis transcriptómicos globales comprendieron:

1. Estudios de RNAseq en distintas condiciones realizados en el laboratorio del Dr. Sören Molin (datos obtenidos por la Dra. Paula Tribelli).
2. Estudios de la sobreexpresión del sRNA40 realizados durante una estadía en el laboratorio del Dr. Jörg Vogel.

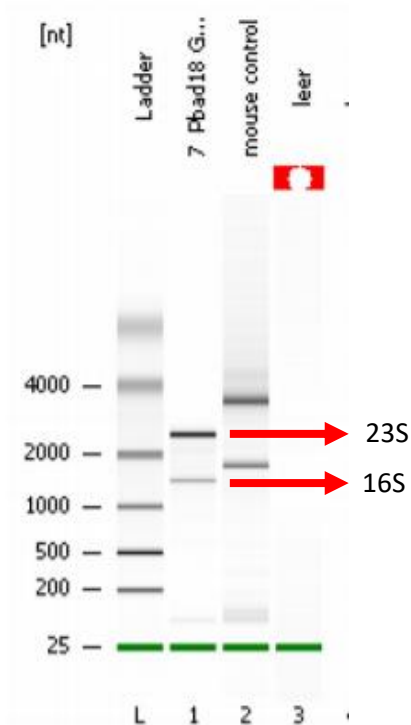
3. Estudios de RNAseq en microaerobiosis y microaerobiosis en presencia de estrés nitrosativo también obtenidos durante una estadía en el laboratorio del Dr. Jörg Vogel.

2.2.1. Extracción de RNA

Las extracciones de RNA total se realizaron utilizando el reactivo TRIzol (ThermoFisher Scientific). Para la extracción se cosecharon 4 ml del cultivo celular correspondiente, los cuales se mezclaron con 1 ml de reactivo de TRIzol. A continuación, se realizó una extracción con CHCl_3 y el RNA se precipitó utilizando isopropanol. El precipitado se lavó con etanol y se resuspendió en H_2O MiliQ libre de nucleasas. La extracción de RNA se realizó por duplicado (a partir de muestras independientes) para cada condición evaluada. Las muestras fueron tratadas con DNasa I y posteriormente se realizaron PCR utilizando *primers* correspondientes a las regiones del rRNA 16S como control negativo.

La calidad de las muestras de RNA se analizó por electroforesis capilar utilizando un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent). En la figura 1M se muestran los resultados del análisis de una muestra a modo de ejemplo. En la misma se pueden observar las bandas y picos correspondientes al rRNA 16S y 23S lo que indican una buena integridad de la muestra.

A



B

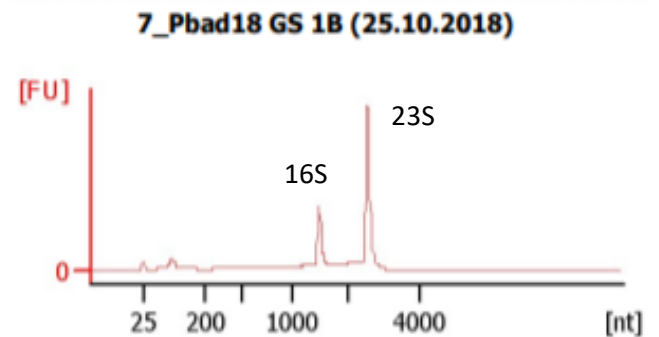


Figura 1M: Análisis del RNA total. A: B: Electroferograma donde se observan los picos correspondientes al rRNA 16S y 23S

Previo a la secuenciación masiva, el RNA ribosomal fue eliminado de las muestras para mejorar la calidad de las lecturas, utilizando los kits comerciales RiboZERO (Illumina) o MICROB Express (Ambion) siguiendo en cada caso las instrucciones del fabricante. Las *libraries* fueron elaboradas utilizando los kits comerciales ScriptSeq v2RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre) o TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina) y las secuenciaciones se realizaron utilizando los equipos HiSeq 2000 o NextSeq 550.

2.2.2. Métodos experimentales

Los experimentos de RNAseq se efectuaron para cultivos en microaerobiosis (24 h), m-OS y m-NS. Adicionalmente, se efectuaron análisis en las cepas *P. extremaustralis* / pBAD18 – sRNA40 y *P.*

extremaustralis / pBAD18 luego de una inducción de 10 min con arabinosa 0,1%. En la tabla 2M se indica que características de preparado de muestras y secuenciación utilizadas en cada caso.

Tabla 2M: Características de la secuenciación masiva de RNA por condición

Condición	Eliminación de rRNA	Library	Secuenciador	Tipo de secuenciación
Microaerobiosis vs. m-OS	MICROB Express	ScriptSeqv2RNA-Seq Library Preparation Kit	HiSeq 2000	<i>Paired-end</i>
Microaerobiosis vs m-NS	RiboZERO	TruSeq RNA Library Prep Kit v2	NextSeq 550	<i>Single-end</i>
sRNA40 /c) vs sRNA40 (i).	RiboZERO	TruSeq RNA Library Prep Kit v2	NextSeq 550	<i>Single-end</i>

2.2.3. Análisis de datos

Una vez obtenidas las lecturas se utilizó la herramienta informática Trimmomatic (Bolger, Lohse and Usadel, 2014) para eliminar las secuencias correspondientes a adaptadores y aquellas porciones cuya calidad fuera baja (extremos). La calidad de las lecturas fue evaluada a lo largo del proceso con la herramienta FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

El alineamiento y ensamblaje de lecturas sobre el genoma de *P. extremaustralis* y la identificación de transcriptos se realizó mediante el software Rockhopper (McClure *et al.*, 2013). Este programa también permitió realizar la normalización de los datos como RPKM (*read per kilobase per million mapped reads*), y efectuar la cuantificación de la abundancia de transcriptos.

Adicionalmente se realizó la identificación de posibles sRNA con funciones regulatorias, siguiendo el protocolo descrito por Gómez-lozano, Marvig, Molin, & Long, 2014. Para ello se utilizaron diversos algoritmos que permitieron identificar sRNA en *trans*, detectando transcriptos que comienzan y terminan en regiones intergénicas y que poseen incrementos abruptos de la transcripción, y sRNA en *cis* (o *antisense*), que se transcriben desde la hebra complementaria de regiones codificantes.

Para realizar las clasificaciones funcionales se utilizaron diversas herramientas, como Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005), KEGG (Ogata *et al.*, 1999), MetaCyc (Caspi *et al.*, 2016) y String (Szklarczyk *et al.*, 2019), entre otras.

3. Construcción del plásmido pBAD18/sRNA40

Para la construcción del plásmido pBAD18/sRNA40, que posee la secuencia del pequeño RNA regulatorio sRNA40 bajo la regulación de un promotor inducible por L-arabinosa se realizaron los siguientes pasos:

En primer lugar, se amplificó la secuencia correspondiente al sRNA40 utilizando como templado DNA genómico purificado utilizando los *primers* 16679 y 16780 (Tabla 3M) que poseen sitios de restricción para las enzimas KpnI y XbaI, respectivamente siguiendo el protocolo que se detalla en la tabla 4M. El agregado de sitios de restricción KpnI y XbaI en los extremos permitió que la secuencia pudiera ser clonada en el vector pBAD18-Kan (Figura 2M). El diseño de los *primers* se realizó de manera tal que el fragmento amplificado comience en el +1 (o sitio de inicio) del sRNA40 y presente unos 50 nucleótidos luego del final del mismo, según lo descrito por Podkaminski, Bouvier, & Vogel, 2014.

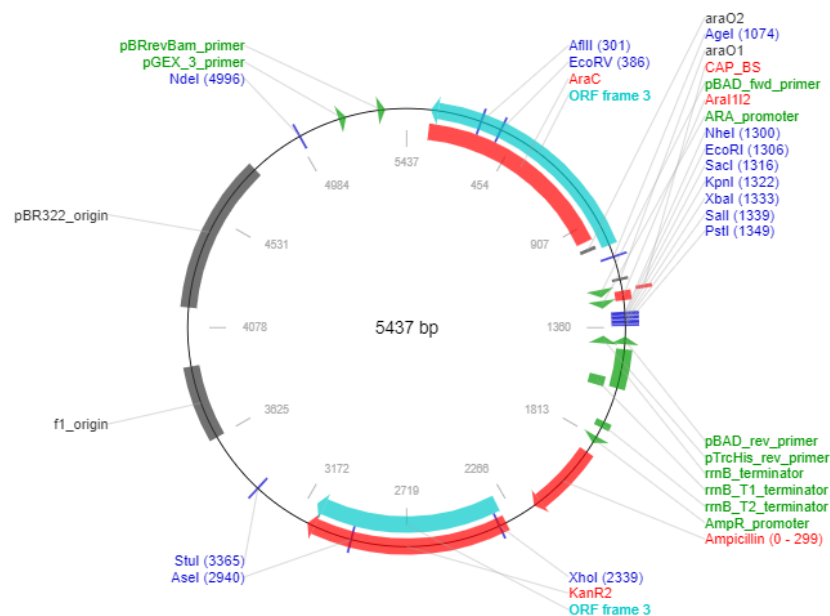


Figura 2M: Esquema del plásmido pBAD18-Kan

Tanto el vector como el producto de PCR se digirieron utilizando las enzimas de restricción XbaI y KpnI, seguido de lo cual se ligaron ambos fragmentos para dar lugar al vector pBAD18-sRNA40.

El vector pBAD18-sRNA40 se subclonó por transformación en células competentes de *E. coli* DH5- α . Los clones transformantes se seleccionaron en medio LB-Kan y la construcción fue verificada por PCR utilizando los *primers* 16780 y 9763 (correspondiente a secuencias del plásmido pBAD18-Kan, Tabla

5M). Finalmente, la construcción fue introducida por transformación en *P. extremaustralis*, y seleccionada de manera similar a la descrita anteriormente.

Tabla 3M: *primers* utilizados para la construcción del plásmido pBAD18-sRNA40

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción	Referencias
16779	TTTTGGTACCGGCGCAATCCTGCACATTCG	Fwd para sRNA40 con sitio de restricción para KpnI	Este trabajo
16780	TTTTTCTAGACGGCATAAAGACGCTGCAAAC	Rev para sRNA40 con sitio de restricción para XbaI	Este trabajo
9763	ATGCCATAGCATT TTTTATCC	Fwd para plásmido pBAD18	Este trabajo

Tabla 4M: Programa de PCR utilizado para la amplificación del sRNA40

Paso	Temperatura (°C)	Duración
Desnaturalización inicial	95	10 min
35 ciclos		
Desnaturalización	95	30 seg
<i>Annealing</i>	58	30 seg
Extensión	72	30 seg
Extensión final	72	10 min

3.1. Purificación y cuantificación de DNA

Para la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por reacciones de PCR o tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones se utilizó el kit comercial UltraClean PCR Clean Up (MoBio), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la purificación a partir de geles de agarosa se utilizó el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante. El DNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

3.2. Digestión con enzimas de restricción

La digestión con enzimas de restricción (New England Biolabs o Promega) se realizó utilizando los *buffers* correspondientes y siguiendo los protocolos estándares establecidos por los fabricantes.

3.3. Reacciones de ligado

Para realizar el ligado entre insertos y vectores obtenidos por digestión con enzimas de restricción se empleó la ligasa T4 (Promega), de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

3.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización y la posterior purificación de fragmentos de DNA obtenidos de reacciones de PCR o de cortes con enzimas de restricción se utilizó una concentración de agarosa de 0,8 a 1,5 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar y su posterior purificación. Las electroforesis se realizaron utilizando buffer TAE 1x a 100 volts. El tamaño de los fragmentos se estimó utilizando marcadores de peso molecular 100 pb y 1 kb (Promega). Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y el DNA se visualizó con un transiluminador de luz UV. Los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak Digital Science CD120.

3.5. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*

Para la obtención de células competentes de *E. coli* se partió de precultivos ON en medio LB, los cuales se utilizaron para inocular 50 ml de medio LB, en un erlenmeyer de 500 ml a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial de 0,05. Se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5. Luego se procedió a incubar durante 15 min a 4°C y se obtuvo el *pellet* celular mediante centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C). Los pasos posteriores varían según si se prepararon células competentes obtenidas para transformación química o para realizar electroporación. En cualquiera de los casos, al finalizar el protocolo, las células se separaron alícuotas de 50 μl . Las mismas se conservaron a -70°C hasta su utilización.

3.5.1. Electrocompetentes

Para electroporación la preparación de las células, el *pellet* se lavó tres veces con 25 ml de glicerol 10% m/v en H_2O (previamente enfriada). Las células se resuspendieron en 1 ml de la misma solución de lavado.

Para la transformación de células electrocompetentes se agregaron 2-4 μl de DNA a 50 μl de células competentes. La electroporación se efectuó en un electroporador BioRad Micro PulserTM en cubas de

0,2 cm. Los parámetros empleados para la electroporación fueron 1 pulso, 2,5 kV, 2,5 ms. Para la recuperación de las células competentes se agregó 1 ml de SOC (Anexo *Buffers*) y se incubó 1 h a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación las células se centrifugaron 5 min a 5000 rpm. El pellet se resuspendió en 100 µl de solución fisiológica y se sembró en placas con medio de selección según correspondiese.

3.5.2. Competentes químicas

En este caso el *pellet* obtenido como se describió previamente, se resuspendió en 10 ml de una solución de CaCl₂ 0,1 M (previamente enfriada), se incubó 60 min a 4°C y se centrifugó 10 min a 4°C a 4000 rpm. Las células se resuspendieron suavemente en una solución de CaCl₂ 0,1 M y glicerol 10 % m/v.

Para la transformación 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 s y nuevamente se incubó en hielo 10 min. Para la recuperación de las células competentes se agregó 1 ml de medio SOC o LB y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante (150 rpm). Concluido el período de recuperación, las células se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y el pellet se sembró en placas con medio de selección según correspondiese.

3.6. Preparación y transformación de células competentes de *P. extremaustralis*

Para la obtención de células competentes de *P. extremaustralis* se partió de precultivos ON en medio LB, los cuales se utilizaron para inocular 50 ml de medio LB, en un erlenmeyer de 500 ml a una DO_{600nm} inicial de 0,05. Se incubó a 28°C y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5. Luego se obtuvo el *pellet* celular mediante centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C). El *pellet* se resuspendió en 30 ml de una solución de sacarosa 300 mM se incubó 15 min a 4°C y se centrifugó 10 min a 4°C a 4000 rpm. Se realizaron dos lavados sucesivos con 15 ml de sacarosa 300 mM y las células se resuspendieron suavemente en 1 ml de la misma solución. Las células se utilizaron para transformación en el mismo momento.

Para la transformación, se utilizaron 75 μ l de células competentes a las que se agregaron 2 - 5 μ l de DNA (10-50 ng) las cuales se incubaron 15 min en hielo. La electroporación se efectuó en un electroporador BioRad Micro Pulser™ en cubas de 0,2 cm empleando los siguientes parámetros: Voltaje (V) 1,600 V y tiempo constante (τ) 5 ms. Para la recuperación de las células competentes se agregó 1 ml de SOC y se incubó 90 min a 28°C con agitación suave (100 rpm). Al terminar el período de recuperación se centrifugaron las células 5 min a 5000 rpm y se sembró el *pellet* celular en placas con medio de selección según correspondiese.

3.7. Aislamiento de DNA plasmídico

La extracción se realizó a partir de 1-5 ml de cultivo, en función del número de copias del vector, crecidos *overnight* en LB, conteniendo los antibióticos correspondientes. El *pellet* celular obtenido a partir de estos cultivos se resuspendió en 200 μ l de Buffer 1 (Anexo *Buffers*) y se le adicionaron 200 μ l de Buffer 2 (Anexo *Buffers*). Se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se adicionaron 200 μ l de Buffer 3 frío (Anexo *Buffers*). La mezcla se incubó por 10 min en hielo luego de lo cual se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. A este se le adicionaron 900 μ l de etanol absoluto, para favorecer la precipitación del DNA y se centrifugó 20 min a 13000 rpm. El precipitado obtenido se lavó con etanol 70 %. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar, para luego resuspenderlo en 50 μ l de H₂Odd.

En casos donde fue necesaria la obtención de plásmidos con mayor grado de pureza se utilizaron kits comerciales, siguiendo las especificaciones del fabricante.

4. Técnicas que emplean RNA

Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron otras técnicas que implican la manipulación de RNA, además de RNA-seq, que comprendieron ensayos de *Northern blot* y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

4.1. Extracción de RNA

Se realizaron diversos protocolos de extracción de RNA, de acuerdo al ensayo a realizar. Para los experimentos de *Northern blot* se utilizó el método TRIzol (de acuerdo a lo descrito en la sección 4.1), mientras que para los ensayos de RT-qPCR se empleó el kit comercial Total RNA Extraction Kit (RBC Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En ambos casos, posteriormente a la extracción de RNA se realizaron tratamientos con DNAsa I (Promega). La integridad del RNA se verificó realizando electroforesis en geles de agarosa, esperando observar bandas características del RNA ribosomal. En estos casos la electroforesis se realizó de manera análoga a la descrita en la sección 5.4, pero utilizando material exclusivo y libre de RNAsas. Para las corridas electroforéticas se utilizó *loading buffer* conteniendo formaldehído. Para descartar contaminación con DNA se realizó una reacción de PCR utilizando *primers* correspondientes al gen del rRNA 16S y la muestra de RNA como templado, esperando no encontrar amplificación.

4.2. Obtención de cDNA total

Para la obtención de cDNA total a partir de muestras de RNA se emplearon hexámeros *random* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se tomó aproximadamente 1 µg de RNA al que se le agregó 1µl de hexámeros *random* y se incubó durante 5 min a 70°C. Luego se agregaron dNTPs, buffer de retrotranscriptasa RevertAid (ThermoFisher Scientific), RNAsin (inhibidor de RNAsas) y 25 unidades de retrotranscriptasa RevertAid (ThermoFisher Scientific). Se llevó adelante entonces un ciclo a 37°C durante 1 hora.

4.3. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Con el objeto de analizar la expresión de genes de interés, se diseñaron *primers* específicos en base a la secuencia correspondiente, así como también en base al gen del rRNA 16S que se usó para la normalización de los niveles de expresión. Se tuvo en cuenta que el fragmento a amplificar tuviera una longitud menor a 300 pb (Tabla 5M).

Para la realización de la RT qPCR se utilizó la mezcla de reacción comercial HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (SolisBiodyne) a la cual se añadieron los *primers* y H₂O. Los experimentos se llevaron a cabo usando un termociclador MyiQ2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE. UU.), siguiendo el programa detallado en la tabla 6M. Se analizaron al menos tres cultivos independientes para cada condición. Asimismo, se efectuaron curvas de *melting* para evaluar los productos obtenidos. Para determinar los niveles de expresión de los genes se utilizó el método de curva estándar (Larionov, Krause and Miller, 2005).

Tabla 5M: primers utilizados para RT-qPCR

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Gen amplificado	Referencias
<i>AhpF</i> fwd	CCGTAGAGCAGTCTCCCC	<i>ahpF</i>	Este trabajo
<i>ahpF</i> rev	GGCGGAGGTACGGATCAAATG	<i>ahpF</i>	Este trabajo
<i>grx</i> fwd	ACCCTGTATCAGTTCCACGC	<i>grx</i>	Este trabajo
<i>grx</i> rev	GTACATCCAGGTGGTCTGGC	<i>grx</i>	Este trabajo
<i>hbo</i> fwd	AACGAGTGAGTACCGAGCCTA	<i>hbo</i>	Este trabajo
<i>hbo</i> rev	AAACCAGCCACTGAGGAACTT	<i>hbo</i>	Este trabajo
<i>tam</i> fwd	GTTTTTGGCCTGGACAGCTC	<i>tam</i>	Este trabajo
<i>tam</i> rev	GCGAAGCATTGGCCAGAATC	<i>tam</i>	Este trabajo
16S fwd	AGCTTGCTCCTTGATTGAGC	rRNA 16S	(Tribelli <i>et al.</i> , 2015)
16S rev	AAGGGCCATGATGACTTGAC	rRNA 16S	(Tribelli <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 6M: Programa de RT-qPCR utilizado

Paso	Temperatura (°C)	Duración
Desnaturalización inicial	95	15 min
38 ciclos		
Desnaturalización	95	20 seg
<i>Annealing</i>	60	25 seg
Extensión	72	25 seg
Extensión final	72	5 min
Curva de <i>melting</i> (80 ciclos)	55-95	0,08 seg

4.4. Preparación de sondas marcadas radioactivamente para ensayos de *Northern blot*

Para analizar la presencia y tamaño de pequeños RNAs regulatorios (sRNA) detectados por RNAseq se realizaron ensayos de *Northern blot*. La detección se realizó utilizando sondas de DNA marcadas radioactivamente con ³²P. Los oligonucleótidos utilizados para este experimento se detallan en la tabla 7M. La marcación de las sondas se realizó utilizando 30 uCi de γ -ATP y T4 *Polynucleotide Kinase* (PNK, NEB). Las sondas marcadas se purificaron, para eliminar γ -ATP libre, usando columnas de Sephadex G-50.

Tabla 7M: Oligonucleotidos utilizados como sondas para la detección de sRNAs por *Northern blot*.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción	Referencias
16426	GAAATCAAGACCTAGCACGCC	Sonda para sRNA9 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo
16781	CTGCTCAAAAACCGATCAACTGCCTGTA	Sonda para sRNA40 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo
16423	CTCCTGGATTTCGTCATTCGTAG	Sonda para sRNA43 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo
16427	ACAACAATAGACCGCCCCTCAAT	Sonda para sRNA84 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo
16420	ACCATCAACATGAACGCTA	Sonda para sRNA143 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo
16611	AAGGGCAGGTTGAGCGTAA	Sonda para sRNA208 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo
16784	ACCCTCTGTGCGAGGTTGCCGGAA	Sonda para sRNA217 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo
16421	GGCAACATAGATCAATCCATTGA	Sonda para sRNA221 en <i>P. extremaustralis</i>	Este trabajo

4.5. Ensayos de *Northern blot*

En cada caso se partió de 10 µg RNA total en *loading buffer* RPA (Formamida 98%, EDTA 1mM, Xileno cianol 0,1%, Azul de Bromofenol 0,1%). Las muestras se desnaturalizaron 5 min a 95°C y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la siembra. Se utilizaron marcadores de peso molecular apropiados marcados radiactivamente. La separación electroforética del RNA se realizó en geles de poliacrilamida 6% conteniendo Urea 7M en *buffer* TBE 1x a 300V durante 1-2h. Posteriormente, los geles fueron electrotransferidos a 50V sobre membranas Hybond-XL (Amersham) en 1x TBE buffer por 1h a 4°C, luego de lo cual se efectuó un *cross-linking* de los ácidos nucleicos a la membrana, exponiéndola a la luz UV por 5 min.

Las membranas se pre-incubaron con 15 ml de buffer Roti-Hybri-Quick (Roth) a 42°C. A continuación, se adicionaron 2 µl de los oligonucleótidos marcados con ³²P en el extremo 5' y se incubó a 42°C durante 18 h con agitación. Las membranas fueron sometidas a lavados subsecuentes con SSC 1x, 1x y 0,5x (NaCl 0,3 M, citrato de sodio 30 mM) y posteriormente expuestas sobre placas PSP (*photostimulable phosphor plate*) durante 72 h en oscuridad. Las placas fueron reveladas utilizando un equipo Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare Lifesciences).

La cuantificación de la expresión a partir de los resultados obtenidos se realizó utilizando el programa ImageJ (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012).

5. Determinaciones analíticas

5.1. Determinación del estado redox intracelular

El estado redox intracelular se estimó mediante la medición del cociente NADH/NAD⁺. El mismo se cuantificó utilizando el kit comercial NAD/NADH Quantification Kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.2. Determinación de proteínas carboniladas

El daño a las proteínas se evaluó a través de la medición de los grupos carbonilo (Levine *et al.*, 2000). Para ello, lisados celulares se incubaron 20 min con 10% de sulfato de estreptomicina (Sigma) a temperatura ambiente y se centrifugaron (10 min, 10.000 xg) para inducir la precipitación de ácidos nucleicos. Se tomaron 2 alícuotas de 200 µl del sobrenadante de cada muestra, a las cuales se les agregó 300 µl de 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (10 mM en HCl 2,5 N) o 300 µl de HCl 2,5N. Luego de una incubación durante 60 min en la oscuridad a temperatura ambiente se agregaron 275 µl de ácido tricloroacético (50% p / v) y se mantuvo la mezcla en hielo durante 15 min. Las muestras se centrifugaron (10 min a 10.000 x g) y el precipitado resultante se lavó tres veces con 500 µl de etanol / acetato de etilo (1/1; v / v) para eliminar el reactivo de DNPH libre. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 1 ml de guanidina-HCl 3 M y se incubaron durante 10 min a 37°C. La absorbancia se midió a 370_{nm} o 280_{nm}, para muestras tratadas con DNPH o HCl, respectivamente, utilizando guanidina-HCl 3 M como solución en blanco. Se usó el coeficiente de absorción molar de 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ para cuantificar la concentración de grupos de proteínas carbonilo en las muestras tratadas con DNPH. Los datos se remitieron a la concentración de proteína total medida en muestras tratadas con HCl.

5.3. Determinación de exopolisacáridos totales

La determinación de exopolisacáridos (EPS) totales se estimó utilizando el protocolo descrito por D'Abzac (D'Abzac *et al.*, 2010). Para ello, se centrifugaron 2 ml de los cultivos a analizar durante 30 min a 4 °C y 12.000 x g. 300 µl del sobrenadante se mezclaron con 900 µl de etanol frío y las muestras se incubaron durante 24 h a 4 °C. Se procedió luego a centrifugar las muestras durante 20 min en

condiciones similares a las descritas anteriormente y el *pellet* se lavó 2 veces con etanol. Finalmente, los extractos de EPS se liofilizaron y pesaron. Los resultados se normalizaron a OD_{600nm} de los cultivos.

6. Estudio de la formación de *biofilms* y movilidad bacteriana

6.1. Ensayos de *biofilms* en placas multipocillo

Para los estudios de formación de *biofilms* se utilizaron cultivos aeróbicos, microaeróbicos, a-OS y m-OS para inocular medio LB suplementado con un 0,08% de KNO₃ a una OD_{600nm} inicial de 0,025. Los cultivos se incubaron estáticamente a 30 °C en placas de poliestireno de 96 pocillos, con fondo en “U” sin pre-tratamiento que favorezca la adhesión. Después de 24 h, se midió DO_{600nm} de células planctónicas (APC) y se cuantificaron las biopelículas utilizando el método del cristal violeta (O’Toole and Kolter, 1998). Brevemente, las células adheridas se tiñeron con 200 µl de una solución de cristal violeta (0,1%). Dicha solución se eliminó después de 20 min y las placas se enjuagaron suavemente con agua para eliminar el colorante remanente. El colorante se solubilizó mediante el agregado de 200 µl de etanol absoluto durante 20 min y se transfirió a placas de microtitulación de fondo plano para medir la absorbancia a 550 nm (ACV) utilizando un lector de microplacas BMG OPTIMA FLUOstar. El índice de formación de *biofilms* se definió como ACV / APC.

6.2. Estudios de movilidad bacteriana

La motilidad bacteriana en medios semisólidos se evaluó mediante ensayos de *swarming* en placa (Morales-Soto *et al.*, 2015). Debido a que la motilidad varía de acuerdo a la composición del medio y a la humedad de la superficie se utilizó un medio de *swarming* (Anexo *Buffers*) y se prestó particular atención en mantener la uniformidad de las condiciones experimentales. Las placas se prepararon utilizando 20 ml de medio de *swarming* a una temperatura de 60 °C. Las placas se dejaron secar abiertas en campana de flujo laminar durante 1 h. Esto permitió controlar la pérdida de agua por condensación. La DO_{600nm} de cultivos aeróbicos, a-OS, microaeróbicos y m-OS se ajustaron a 1 y se utilizaron 5 µl para inocular las placas. La distancia de *swarming* se midió luego de 24 h de incubación a 30 °C utilizando el software ImageJ (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012).

7. Observación de células al microscopio

7.1. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Para la observación de las células bacterianas por microscopía de transmisión electrónica, se utilizaron alícuotas de cultivos de *P. extremaustralis* en condiciones de aerobiosis, microaerobiosis, a-OS y m-OS las cuales se tiñeron con acetato de Uranilo. Los cultivos fueron colocados en rejillas de *Formvar* con capa de carbono de tamaño de malla 200 (Ted Pella) y subsecuentemente observadas utilizando un microscopio Philips EM 301. Estos experimentos se llevaron a cabo en el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (CMA- FCEN – UBA).

8. Análisis estadísticos

Para la realización de determinaciones estadísticas se utilizó el software GraphPad Prism 6. La significancia de cada tratamiento se evaluó mediante la prueba *t de Student* con $P < 0,05$ considerada como significativa o mediante la prueba ANOVA de un parámetro (comparación múltiple de Dunn) con $p < 0,05$. También se realizaron pruebas de chi-cuadrado, con $p > 0,05$.

9. Análisis bioinformáticos

9.1. Predicción de regiones regulatorias

Se utilizó la herramienta bioinformática PRODORIC (Munch, 2003) para analizar las secuencias promotoras de diversos genes.

9.2. Predicción de estructura secundaria de sRNA

Las predicciones de las posibles estructuras secundarias de sRNAs y mRNAs se realizó con el programa sFOLD (Ding, Chan and Lawrence, 2004) utilizando la opción sRNA que se ofrece en el mismo.

9.3. Predicción de interacciones RNA-RNA

Se utilizó el programa IntaRNA (Mann, Wright and Backofen, 2017) (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp>) para realizar la predicción del interactoma del sRNA40 y modelar la interacción del sRNA con los genes que exhibieron expresión diferencial luego de la sobre-expresión del mismo.

9.4. Predicción de blancos de oxidación y nitrosilación

Se empleó la herramienta bioinformática Target-Pathogen (Sosa *et al.*, 2018) para identificar proteínas con posibles sitios blanco de oxidación y / o nitrosilación dentro del genoma de *P. extremaustralis*.

Anexo: Soluciones y *Buffers*

Composición de medios de cultivo

Luria Bertani (LB) (por litro):

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ Odd	a volumen
<i>Agar (para medios sólidos)</i>	20 g

SOC (por litro):

Triptona	20 g
NaCl	0,5 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ Odd	a volumen
KCl 250mM*	10 ml
MgCl ₂ 2 M*	5 ml
Glucosa 1M*	20 ml

(*) *Estas soluciones se agregan luego de autoclavar el medio*

Medio de swarming (por litro)

Empleado para estudios de motilidad

Bacto-triptona	10 g
NaCl	5 g
Casaminoácidos	0,3%
Glucosa	0,2%
Agar	6 g (0,6%)
H ₂ Odd	a volumen

Buffers

Buffer TAE 50x (por litro)

Empleado para electroforesis en geles de agarosa

TRIS 242 g
Ácido acético glacial 51,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8100 ml
H₂Odda volumen

Buffer TBE 5x (por litro)

Empleado para ensayos de Northern blot

TRIS 54 g
Ácido bórico 27,5 g
EDTA 0,5 M pH 820 ml
H₂Odda volumen

Buffer SSC 20x (por litro)

Empleado para ensayos de Northern blot

NaCl 175,3 g
Citrato de sodio 88,2 g
HCl para ajustar a pH 7
H₂Odda volumen

Buffer PBS 10x (por litro):

Empleado para protocolos de extracción de proteínas

NaCl80 g
KCl 2 g
Na₂HPO₄14,2 g
KH₂PO₄2,4 g
H₂Odda volumen

Buffer gel separador 4X (para 500 ml)

Empleado para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS page)

Tris base90,83 g

SDS 2 g

Se lleva a pH 8,8 con HCl

Buffer gel concentrador 4X (para 500 ml)

Empleado para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS page)

Tris base30,23 g

SDS 2 g

Se lleva a pH 6,8 con HCl

Solución de acrilamida 30% (para 500 ml)

Empleado para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS page)

Acrilamida 146 g

N, N´-Metilen-bisacrilamida 4 g

Buffer de corrida (por litro)

Empleado para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS page)

Tris base3 g

Glicina.....14,4 g

SDS1 g

Buffer de siembra (Cracking buffer) 4X (para 10 ml)

Empleado para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS page)

Tris 0.25M, pH 6.8 5 ml
SDS 0,6 g
Sacarosa 4 g
Azul de bromofenol..... 0,004 g
2-mercaptoetanol 2 ml

Buffers para aislamiento de DNA plasmídico

Buffer 1:

Tris· HCl pH 8.010 mM
EDTA1 mM
RNasa A.....10 µg/ml

Buffer 2:

NaOH200 mM
SDS.....1%

Buffer 3:

Acetato de potasio pH 5.5 3 M

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

*Efectos del estrés oxidativo en distintas condiciones de aireación en *P. extremaustralis**

CAPÍTULO 1

Efectos del estrés oxidativo en distintas condiciones de aireación en *P. extremaustralis*

El oxígeno cumple un papel fundamental en el metabolismo bacteriano. Sin embargo, su utilización lleva a la producción de ROS que se generan en distinta medida dependiendo de la tensión de oxígeno, afectando la fisiología bacteriana. Teniendo en cuenta que muchas de las especies de *Pseudomonas* pueden desarrollarse en ambientes donde se observan gradientes de disponibilidad de oxígeno, como el suelo o los *biofilms*, el estudio de la resistencia a estrés oxidativo en distintas condiciones resulta de interés.

En el presente capítulo se analizan los efectos del estrés oxidativo en distintas condiciones de aireación en *P. extremaustralis*. Para ello se evaluarán distintos parámetros fisiológicos y se estudiará la respuesta a estrés oxidativo en aerobiosis y microaerobiosis utilizando herramientas proteómicas.

Efectos fisiológicos de la exposición a H₂O₂ en diferentes condiciones de aireación.

Para analizar la resistencia al daño oxidativo en diferentes condiciones de aireación, se evaluó la sensibilidad al H₂O₂ en cultivos aeróbicos y microaeróbicos mediante la determinación de la inhibición del crecimiento en placa, la supervivencia y el daño a macromoléculas a través de la cuantificación de proteínas carboniladas antes y después de la exposición a H₂O₂. En todos los casos el estrés consistió en el agregado de H₂O₂ (3mM) durante 1 hora en cultivos de 24 h tanto aeróbicos como microaeróbicos (condiciones a-OS y m-OS). Esta concentración se seleccionó teniendo en cuenta estudios previos realizados en esta bacteria en los cuales se observó la presencia de ROS en células en crecimiento aeróbico y microaeróbico (Tribelli et al., 2013).

Como se puede observar en la figura 1R, los cultivos microaeróbicos presentaron mayores halos de inhibición cuando se expusieron a H₂O₂ en comparación con aquellos aeróbicos (prueba t de *Student*, P <0,05).

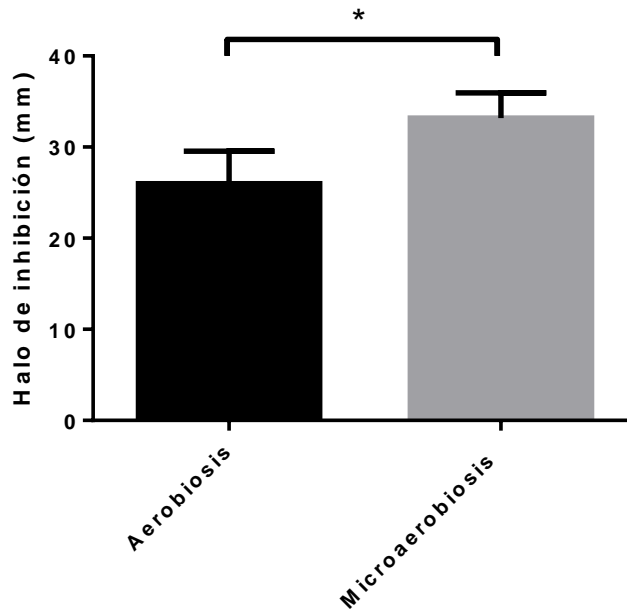


Figura 1R: Ensayo de sensibilidad al H₂O₂ en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis. Los valores representan media \pm SD de 4 experimentos independientes. * denota diferencias significativas utilizando la prueba t de Student ($P < 0,05$).

Por otra parte, se realizaron recuentos de células viables en placa luego de la exposición a estrés en condiciones aeróbicas y microaeróbicas para evaluar la supervivencia. El número de células viables (UFC/ ml) en condiciones aeróbicas fue similar antes y después de la adición de H₂O₂ (ANOVA de un factor, $P > 0,05$). En contraste, luego de una hora de exposición al agente estresante en condiciones microaeróbicas, la supervivencia cayó cerca del 70% con relación al control (Figura 2R; ANOVA de un factor, $P < 0,05$).

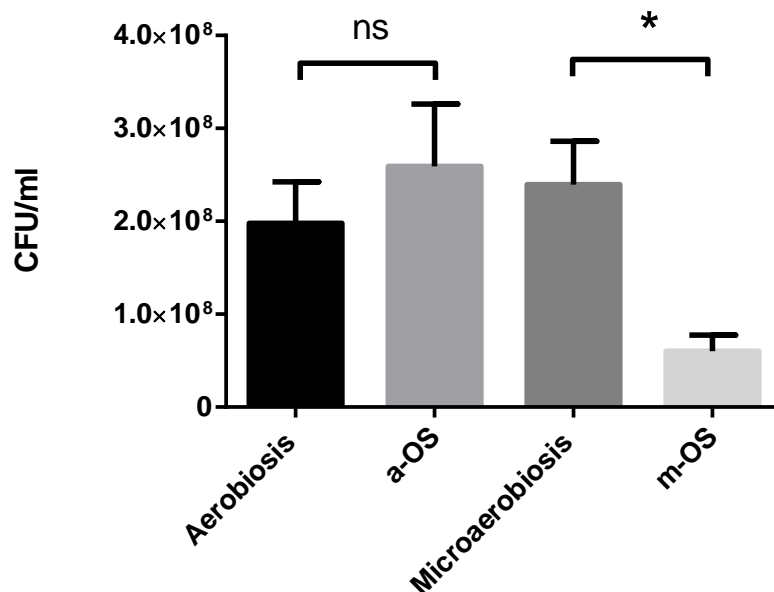


Figura 2R: Ensayos de viabilidad celular para cultivos aeróbicos y microaeróbicos antes y después de la exposición a H_2O_2 . El número de UFC/ ml se determinó mediante ensayos de recuento en placa. Las barras representan la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes. * denota diferencias significativas utilizando la prueba t de Student ($P < 0,05$).

Debido a que uno de los principales blancos de ROS y RNS en las células son las proteínas, se realizaron ensayos de medición de proteínas carboniladas para evaluar el daño diferencial que provocan las especies oxidantes a altas y bajas tensiones de oxígeno. La presencia de grupos carbonilo se evaluó utilizando 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) como reactivo colorimétrico (Luo and Wehr, 2009). Como se puede observar en la Figura 3R, las células en condiciones de crecimiento aeróbicas y microaeróbicas poseen niveles similares de proteínas oxidadas. La adición de peróxido de hidrógeno generó un aumento no significativo de las mismas en cultivos aeróbicos. Por el contrario, en cultivos microaeróbicos, el agregado del agente estresante provocó un mayor daño a proteínas. Esto se refleja en un aumento significativo en la cantidad de proteínas carboniladas con respecto a otras condiciones de cultivo ensayadas.

Debido a que el estado de óxido-reducción de una célula está determinado por el equilibrio entre las formas oxidadas y reducidas de los distintos compuestos biológicos presentes en ella y a que muchas enzimas que participan en la detoxificación de ROS requieren NADH o NADPH como cofactor, se procedió a determinar el cociente entre los equivalentes de reducción NADH y NAD^+ previo a la exposición a estrés y luego de la misma en microaerobiosis, dado que en esta condición se observó el

mayor daño. El análisis del estado redox celular estimado como relación NADH / NAD⁺ mostró una reducción de 8 veces después de la exposición a H₂O₂ en condiciones de crecimiento microaeróbico, indicativo de un estado celular más oxidado (Figura 4R; prueba t de *Student*, P <0,05).

En conjunto, estos resultados muestran que las células procedentes de cultivos en condiciones microaeróbicas poseen mayor sensibilidad al estrés oxidativo que las crecidas en condiciones aeróbicas.

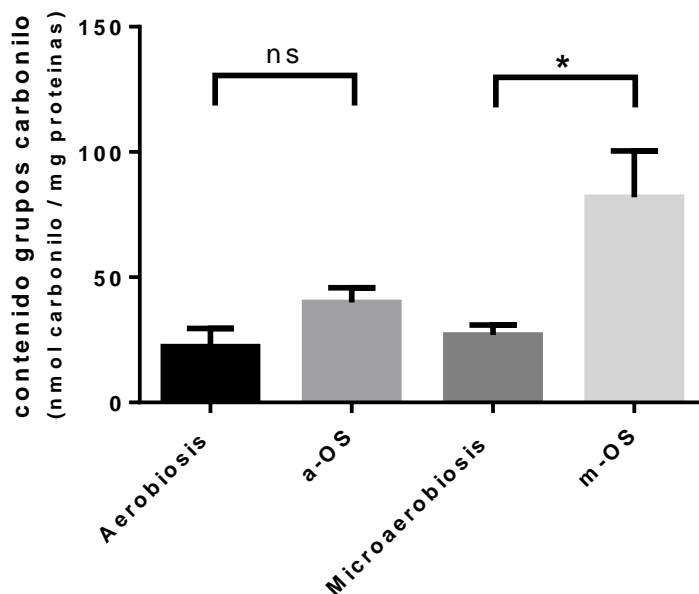


Figura 3R: Contenido de proteínas con grupos carbonilo relativizadas a contenido total de proteínas. Los valores representan media \pm SD de 8 experimentos independientes. * denota diferencias significativas utilizando la prueba t de Student (P <0,.05).

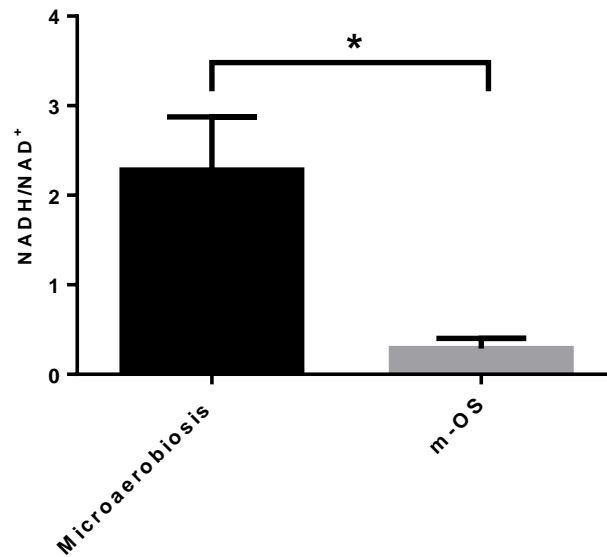


Figura 4R: Contenido de dinucleótidos en condiciones microaeróbicas antes y después de la exposición a H₂O₂. Se grafica la relación NADH/NAD⁺ como cociente redox. Las barras representan la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes. * indica diferencias significativas utilizando la prueba t de *Student* (P < 0,05).

Para caracterizar en mayor profundidad el efecto ejercido por el agregado de H₂O₂ en condiciones microaeróbicas, se analizó la cinética de crecimiento en *P. extremaustralis*. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas multipocillo, en medio LB suplementado con KNO₃, en condiciones control (sin agregado de H₂O₂) y de estrés (H₂O₂: 3mM). La densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) se monitoreó a lo largo de 17 h, utilizando un lector automatizado de placas. Como se puede observar en la figura 5R, el agregado de H₂O₂, provocó un aumento de la fase *lag*, menor velocidad de crecimiento y menor crecimiento medido como DO₆₀₀ final. El tiempo de duplicación en condiciones de estrés fue significativamente mayor (prueba t de *Student*, p < 0,0001) (Tabla 1R).

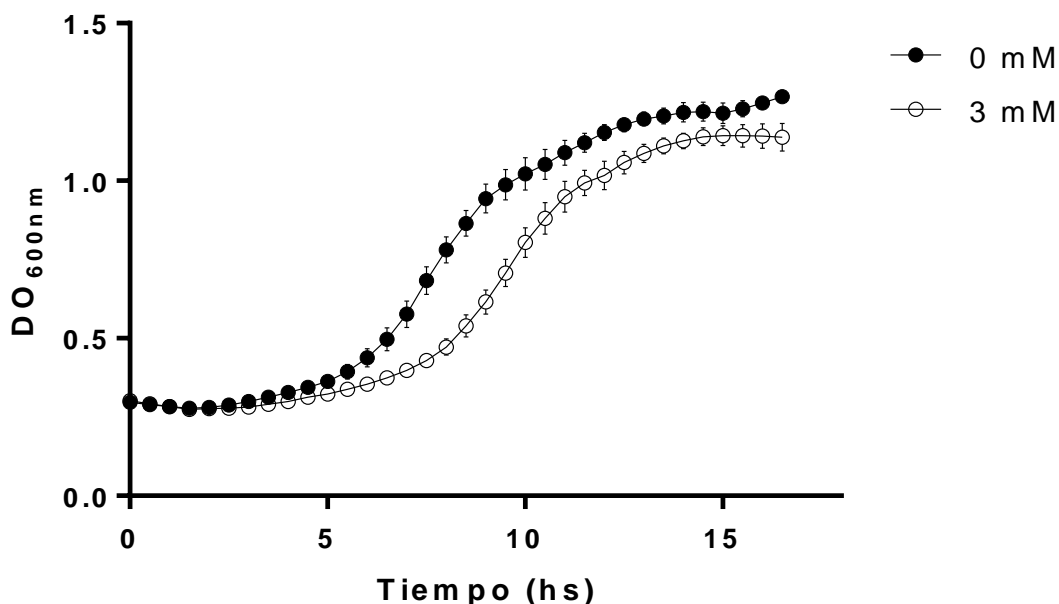


Figura 5R: Curvas de crecimiento en microaerobiosis a 28°C en presencia o ausencia de H₂O₂ en *P. extremaustralis*. Se grafica la variación de DO_{600nm} en función del tiempo. Los valores representan media ± SD de 6 experimentos independientes

Tabla 1R: Análisis del crecimiento en microaerobiosis a 28°C en presencia y ausencia de H₂O₂ en *P. extremaustralis*

H ₂ O ₂ (mM)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (h)	DO ₆₀₀ final
0	0,2264	3,06	1,266 ± 0,031
3	0,1395	4,97	1,138 ± 0,098

Análisis comparativo de los perfiles proteicos de *P. extremaustralis* en diversas condiciones de aireación y estrés oxidativo.

Con el objetivo de ampliar el estudio de la adaptación a estrés oxidativo, incluyendo condiciones de alta disponibilidad de oxígeno, se realizaron estudios proteómicos. Como se mencionó anteriormente, este tipo de análisis permite la identificación de un gran número de proteínas expresadas en un momento y bajo condiciones particulares proporcionando una visión más amplia de las condiciones estudiadas. Estos ensayos se realizaron en cultivos de *P. extremaustralis* luego de 24 h de crecimiento en aeración alta (aerobiosis) o baja (microaerobiosis). Además, se obtuvo el perfil proteico para cultivos

aeróbicos y microaeróbicos sometidos a estrés oxidativo en las mismas condiciones descritas previamente. Los perfiles proteicos se obtuvieron utilizando el servicio de Proteómica del CEQUIBIEM (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina).

El análisis del proteoma de *P. extremaustralis* en las condiciones evaluadas permitió detectar: 1296 proteínas identificadas en condiciones de cultivo aeróbicas, 1210 en condiciones microaeróbicas, 1006 en a-OS y 1061 en m-OS. Considerando todas las condiciones, se detectaron en total 1353 proteínas no redundantes totales, lo que representa el 22,85% del total de secuencias que codifican proteínas (o CDS) identificadas en esta especie.

Con este enfoque proteómico identificamos, entre las proteínas más representativas, aquellas con cambios significativos en los niveles de expresión entre condiciones. Todas aquellas proteínas que presentaron un cambio en la expresión de al menos 2 veces entre condiciones (*Fold Change* > 2) y un valor estadístico significativo (p-value <0,05) fueron consideradas diferencialmente expresadas. Asimismo, tomamos en consideración aquellas proteínas que se detectaron solo en una condición (presente en todas las réplicas biológicas) y no en la otra. Estas se denominaron proteínas ON / OFF (Nilsson *et al.*, 2019).

Análisis comparativo entre condiciones de aerobiosis y microaerobiosis

En primera instancia se compararon los perfiles de proteínas expresadas en condiciones de crecimiento aeróbico y microaeróbico. Este análisis nos permitió detectar 169 proteínas con perfiles de expresión diferencial entre aerobiosis y microaerobiosis, 83 de ellas reprimidas y 86 sobre-expresadas en aerobiosis con respecto a microaerobiosis (Figura 6R). Dentro de las proteínas con perfiles de expresión del tipo ON / OFF encontramos 7 péptidos presentes en microaerobiosis pero no en aerobiosis (OFF) y 147 detectados solo en aerobiosis (ON) (Anexo Tabla 1A), lo que resulta en un total de 233 proteínas sobre-expresadas y 90 proteínas reprimidas en aerobiosis.

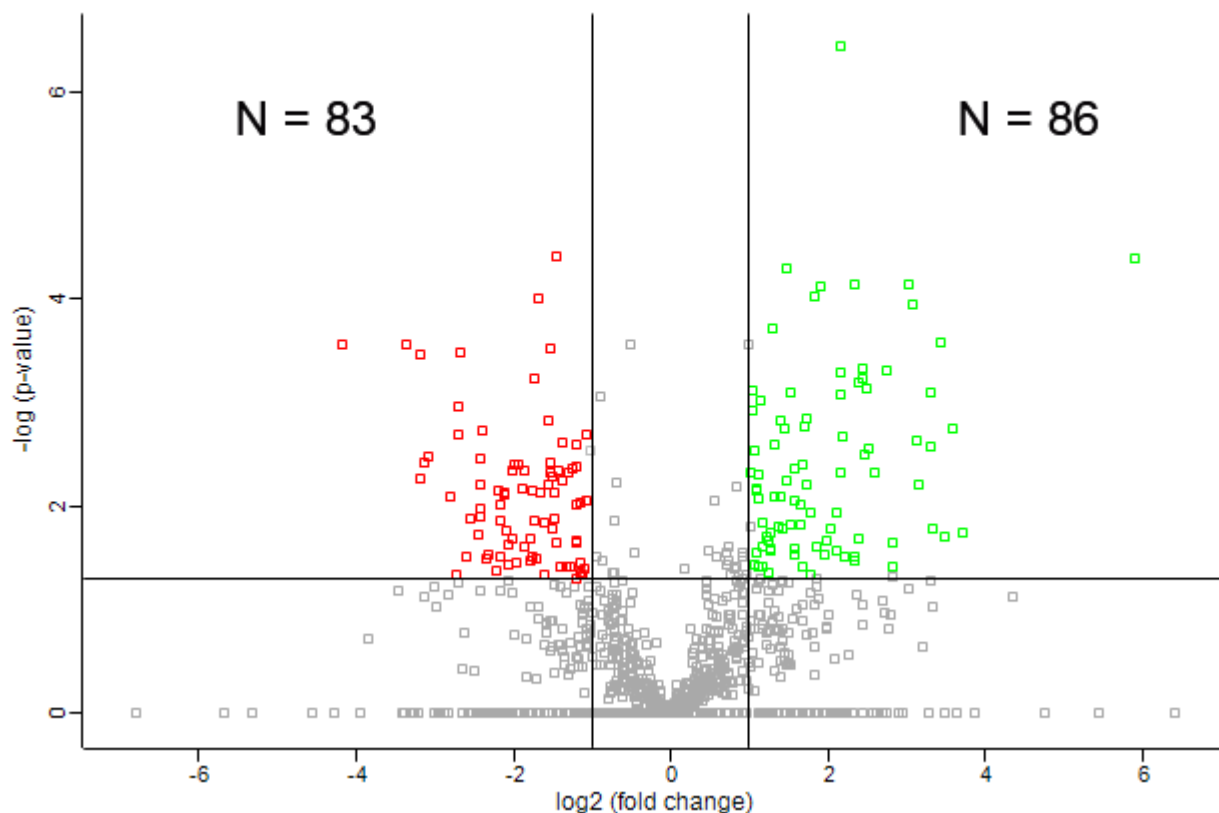


Figura 6R: Niveles de expresión de proteínas en condiciones de crecimiento aeróbico y microaeróbico. *Volcano plot* que representa $-\log(P\text{-valor})$ vs \log_2 (veces de cambio). Los círculos verdes (panel superior derecho) y rojos (panel superior izquierdo) representan proteínas sobre-expresadas y reprimidas ($P < 0,05$, veces de cambio > 2) respectivamente. No se muestran las proteínas ON/OFF. Aerobiosis vs. Microaerobiosis

Para poder tener una mayor comprensión de los procesos biológicos que pueden estar involucrados en el crecimiento en distintas tensiones de O_2 se utilizó la herramienta bioinformática STRING que permite realizar un análisis de enriquecimiento funcional y visualizar las interacciones proteína – proteína presentes en cada conjunto de datos (Szkarczyk *et al.*, 2019). El análisis de enriquecimiento funcional reveló que en condiciones de crecimiento aeróbico se encuentra enriquecido el metabolismo de la arginina, tanto su biosíntesis como las vías de degradación. Por el contrario, en aerobiosis se encontraron reprimidas las proteínas de unión a metales (en particular las que unen hierro o poseen centros Fe-S), las proteínas ribosomales y las vías sintéticas de isopreno (Figura 7R). Además, se encontraron inhibidas la vía de biosíntesis de riboflavina (o vitamina B2), que forma parte de los cofactores flavin mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD). En concordancia con esto, también se vieron reprimidas las flavoproteínas (proteínas que presentan grupos FAD o FMN como

cofactores) y que se encuentran involucradas en reacciones metabólicas redox, la degradación oxidativa de piruvato, ácidos grasos y aminoácidos y en las cadenas de transporte de electrones).

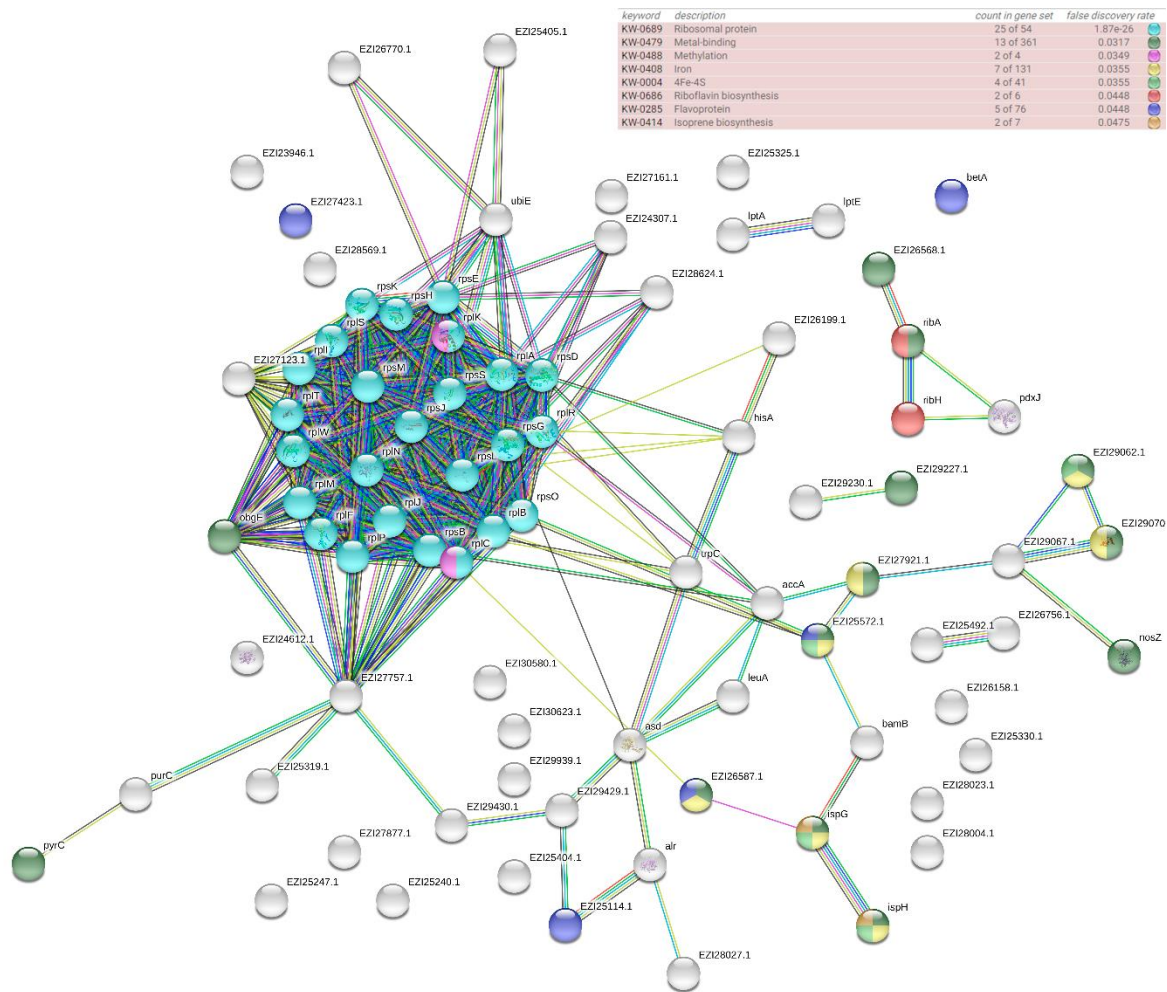


Figura 7R: Redes de interacciones para proteínas inhibidas en aerobiosis. Redes de interacciones generadas por el programa STRING. Cada círculo representa una proteína. Los nodos coloreados corresponden a grupos funcionales enriquecidos significativamente (código de colores en panel superior derecho)

Adicionalmente, las proteínas que presentaron expresión diferencial (incluyendo aquellas clasificadas como ON y OFF en las categorías sobre-expresadas y reprimidas, respectivamente) entre aerobiosis y microaerobiosis se clasificaron según su función utilizando diferentes bases de datos (Figura 8R). Al realizar esta clasificación se observó que muchas de las proteínas que presentaron expresión diferencial en las condiciones analizadas poseen centros Fe-S. Este tipo de metaloproteínas tiene roles importantes en las reacciones redox, en el transporte de electrones y suelen ser sensibles

al oxígeno y al óxido nítrico (NO) (Crack, Thomson and Brun, 2014; Crack and Brun, 2017). Cabe destacar, también, que gran parte de las proteínas detectadas son hipotéticas, es decir, no presentan una función conocida.

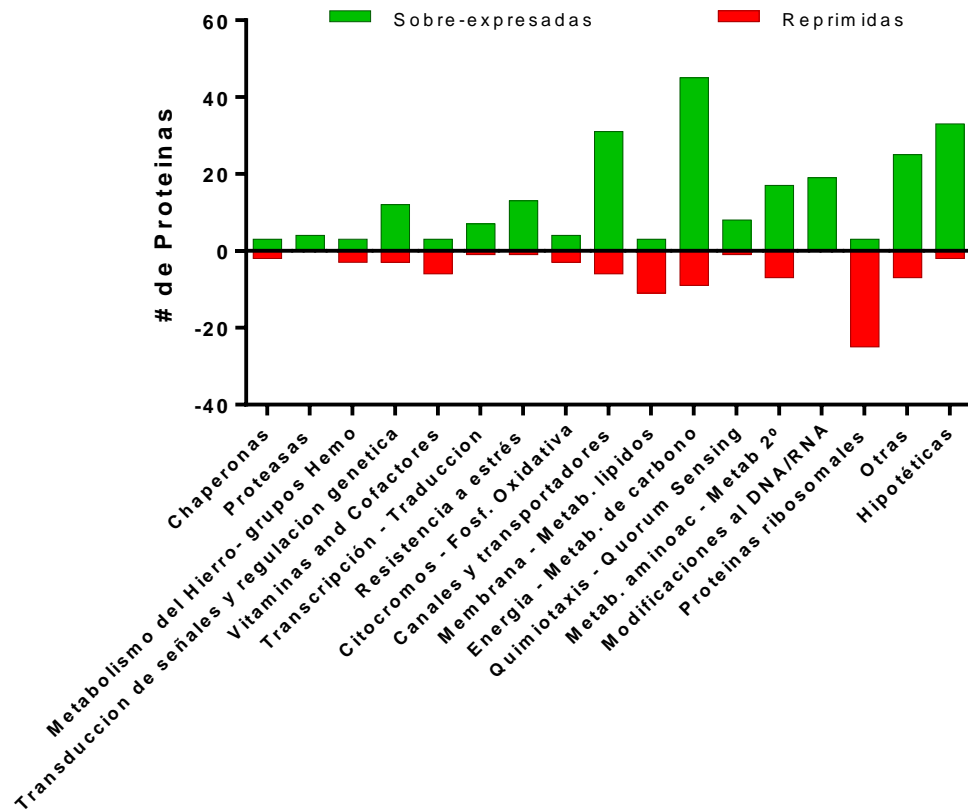


Figura 8R: Clasificación en categorías funcionales de proteínas diferencialmente expresadas. Proteínas diferencialmente expresadas ($P < 0,05$, veces de expresión > 2 / Proteínas ON-OFF) en aerobiosis vs microaerobiosis. Las barras rojas (inferiores) y verdes (superiores) representan genes reprimidos y sobre-expresados en aerobiosis respectivamente.

Cuando las células se cultivaron con aireación alta se observó un aumento en el número de proteínas involucradas en el metabolismo del carbono. Entre las vías metabólicas sobre-expresadas podemos identificar la glucólisis y el metabolismo del piruvato así como proteínas involucradas en el metabolismo del propionato (Tabla 2R).

También se observó que en aerobiosis se incrementó la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos así como en el transporte de los mismos, tales como las vías de degradación de valina, leucina e isoleucina (Tabla 2R). Además, en concordancia con lo observado al realizar los análisis de enriquecimiento funcional, se observó una mayor presencia de proteínas involucradas en el metabolismo de la arginina. La principal vía de degradación de este aminoácido es la ruta de la arginina deiminasa, cuyas enzimas se encuentran codificadas en el operón *arcDABC*. Este operón se encuentra regulado por el regulador global ANR en respuesta a la baja disponibilidad de O₂ (Arai, 2011). Curiosamente, la enzima arginina deiminasa (A0A023C7I3, codificada por el gen *arcA*), presentó mayor expresión en condiciones de aerobiosis en comparación a microaerobiosis. Este resultado podría explicarse debido a la presencia de NO₃⁻ en los cultivos microaeróbicos (utilizado como aceptor alternativo de electrones) que probablemente generó la represión de las vías metabólicas relacionadas con la fermentación de la arginina (Benkert *et al.*, 2008).

Por último, cabe destacar que en condiciones de aerobiosis se observó la presencia de numerosas proteínas de defensa ante el estrés oxidativo, entre las que se destacan 3 alquilhidroperoxidasas (Tabla 2R) y una superóxido dismutasa (A0A023C5D2).

Tabla 2R: Proteínas expresadas diferencialmente en aerobiosis y microaerobiosis y metabolismo en el que están involucradas.

UniProtID	Metabolismo / Función
A0A023CAQ9, A0A023CGI8, A0A023C5L4, A0A023CH52, A0A023CAS1, A0A023CAT7, A0A023C7F0, A0A023CHU6, A0A023C6R3, A0A023CHB7, A0A023C3T0, A0A023C8S9, A0A023CEB7, A0A023C7N8, A0A023CDV4, A0A023C6P3	Glucólisis / Metabolismo del piruvato
A0A023C6Z0, A0A023CAT7, A0A023CEB7, A0A023C7N8, A0A023C2U3, A0A023CDR5, A0A023C1P6, A0A023C6R3, A0A023CB15, A0A023C784, A0A023CDT8	Metabolismo del propionato
A0A023CB25, A0A023C6W1, A0A023CGI8, A0A023C6Z0, A0A023CAT7, A0A023CEB7, A0A023C7N8, A0A023C2U3, A0A023CAP5, A0A023C7K5, A0A023C1P6, A0A023CB64, A0A023CAZ2, A0A023C784, A0A023CB15	Degradación de valina, leucina e isoleucina
A0A023CGI8, A0A023C6Q4, A0A023C647, A0A023CA51, A0A023C4P2, A0A023C644, A0A023C7I3, A0A023CCD0	Metabolismo de la arginina
A0A023CDF8, A0A023CG46, A0A023CG88	Defensa antioxidativa

Desde la escritura de esta tesis cambiaron los códigos de identificación UniProt. Para la búsqueda de los códigos unificados utilizar la base de datos UniParc (www.uniprot.org/uniparc)

Análisis comparativo entre condiciones de a-OS y aerobiosis

Para adentrarnos en el análisis de la respuesta a estrés oxidativo, analizamos la respuesta al agregado de H₂O₂ en condiciones de alta aireación. Esta comparación nos permitió detectar 13 proteínas con perfiles de expresión diferencial entre a-OS y aerobiosis, 9 de ellas reprimidas y 4 sobre-expresadas (Figura 9R). Asimismo, se detectaron 62 proteínas presentes en aerobiosis, pero no en a-OS (OFF) y 8 detectados solo en a-OS (ON) (Anexo Tabla 2A) dando como resultado un total de 12 sobre-expresadas y 72 reprimidas en condiciones de estrés.

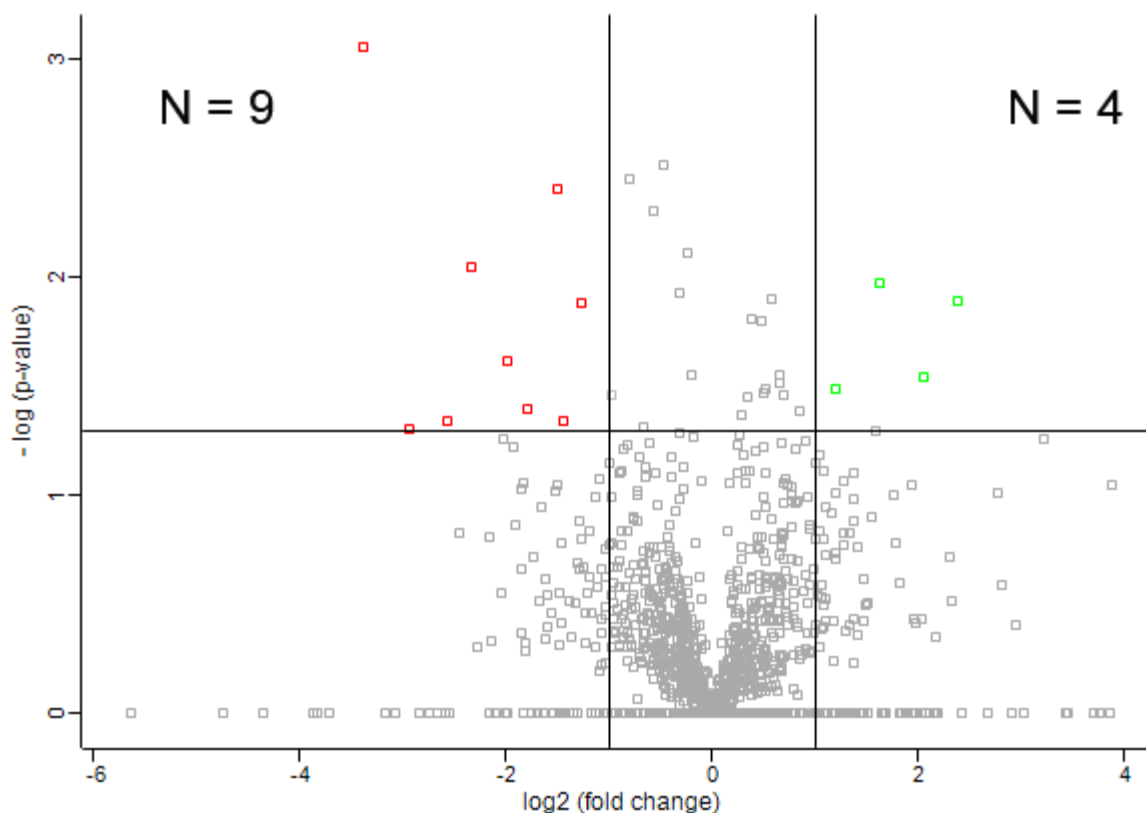


Figura 9R: Niveles de expresión de proteínas en condiciones de crecimiento aeróbico y a-OS. *Volcano plot* que representa $-\log$ (P-valor) vs \log_2 (veces de cambio). Los círculos verdes (panel superior derecho) y rojos (panel superior izquierdo) representan proteínas sobre-expresadas y reprimidas ($P < 0,05$, veces de cambio > 2) respectivamente. a-OS vs. Aerobiosis. No se muestran las proteínas ON/OFF.

El análisis funcional de las proteínas expresadas diferencialmente, incluyendo las que presentan perfiles ON / OFF, mostró una disminución general de la expresión de proteínas en la mayoría de las categorías evaluadas (Figura 10R) en presencia de H₂O₂, sugiriendo que en condiciones de estrés las células se encuentran menos activas metabólicamente. Se detectaron varios reguladores genéticos ausentes en a-OS (proteínas OFF). Uno de ellos, DksA (A0A023CIL3), se ha asociado con fenómenos de *quorum sensing* y la formación de *biofilms* en *Pseudomonas* (Venturi, 2006). Las vías asociadas con la producción de metabolitos secundarios y el metabolismo de los aminoácidos también estuvieron reprimidas en presencia de estrés oxidativo, incluido el metabolismo de la alanina, aspartato, glutamato, valina, leucina e isoleucina. Además, detectamos dos copias del GcvH involucrada en el metabolismo de la glicina (A0A023CC80 y A0A023C7J8) y en la β-oxidación de ácidos grasos (A0A023CHF7, A0A023C1P0 y A0A023CEU3) que fueron menos abundantes en las condiciones de a-OS en comparación con aerobiosis.

Resulta interesante remarcar que diversas proteínas de respuesta a estrés oxidativo y nitrosativo, como una peroxidasa (A0A023C536), una tiorredoxina (A0A023C565) y una glutathion S-transferasa (A0A023C355), no presentaron expresión diferencial en a-OS, pero si se encontraron sobre-expresadas en aerobiosis vs. microaerobiosis.

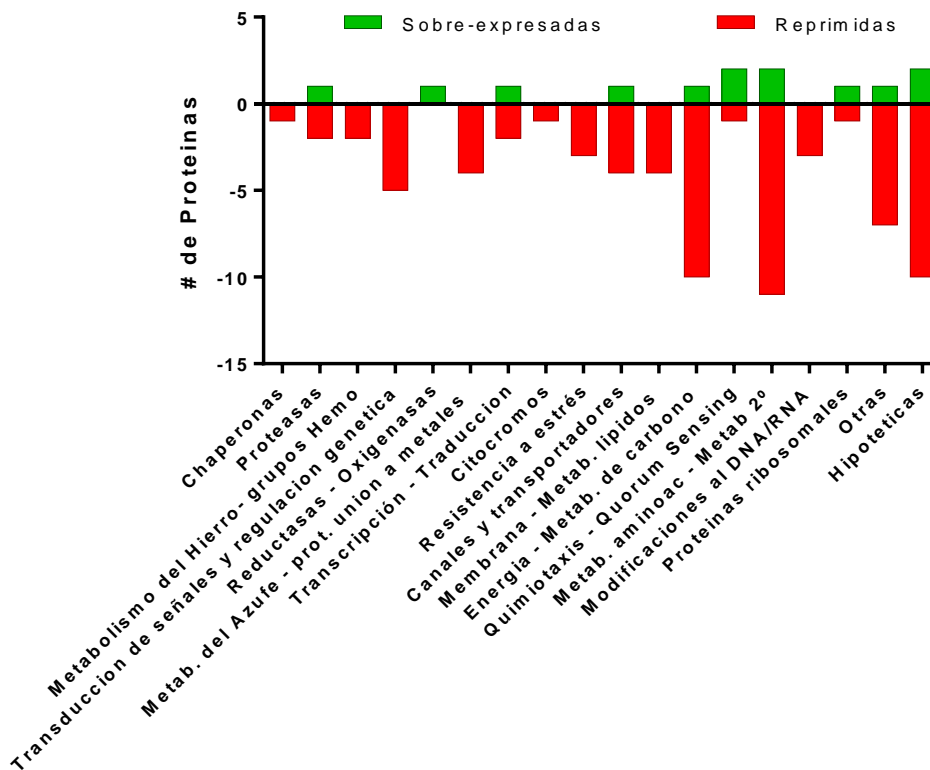


Figura 10R: Clasificación en categorías funcionales de proteínas diferencialmente expresadas. Proteínas diferencialmente expresadas ($P < 0,05$, veces de expresión > 2 / Proteínas ON-OFF) en a-OS vs aerobiosis. Las barras rojas (inferiores) y verdes (superiores) representan genes reprimidos y sobre-expresados respectivamente. No se muestran las proteínas ON/OFF.

Análisis comparativo entre condiciones de m-OS y microaerobiosis

La comparación entre condiciones microaeróbicas y m-OS mostró 27 proteínas con niveles de abundancia diferenciales, 8 reprimidas y 19 sobre-expresadas en m-OS (Figura 11R). Además, se detectaron 31 y 52 proteínas exclusivamente en microaerobiosis (OFF) y m-OS (ON), respectivamente (Anexo Tabla 3A), representando un total de 39 reprimidas y 71 sobre-expresadas en condiciones de estrés.

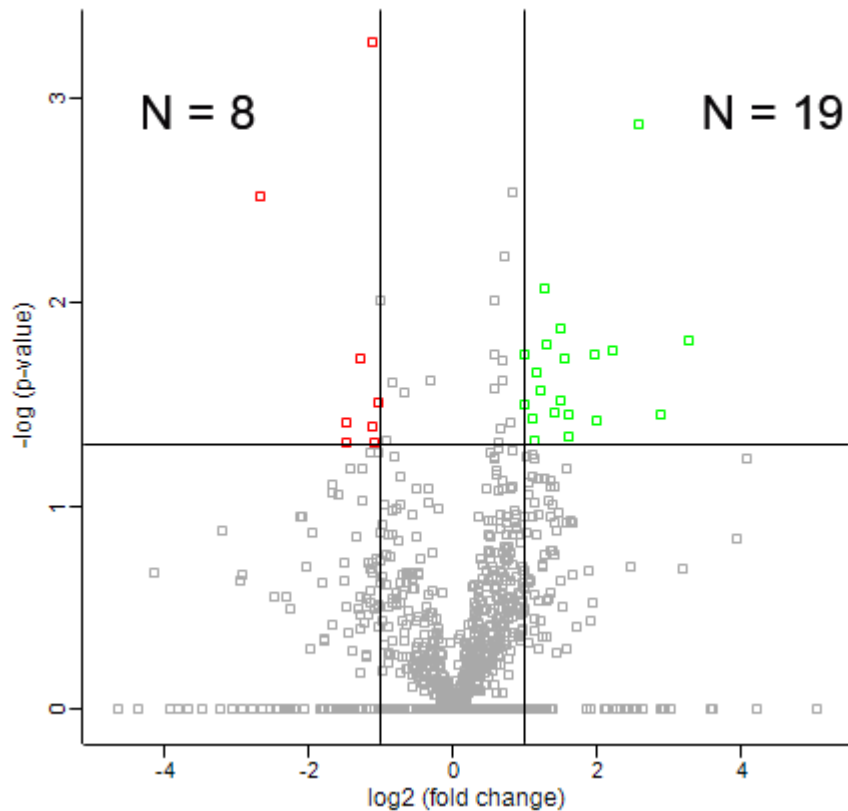
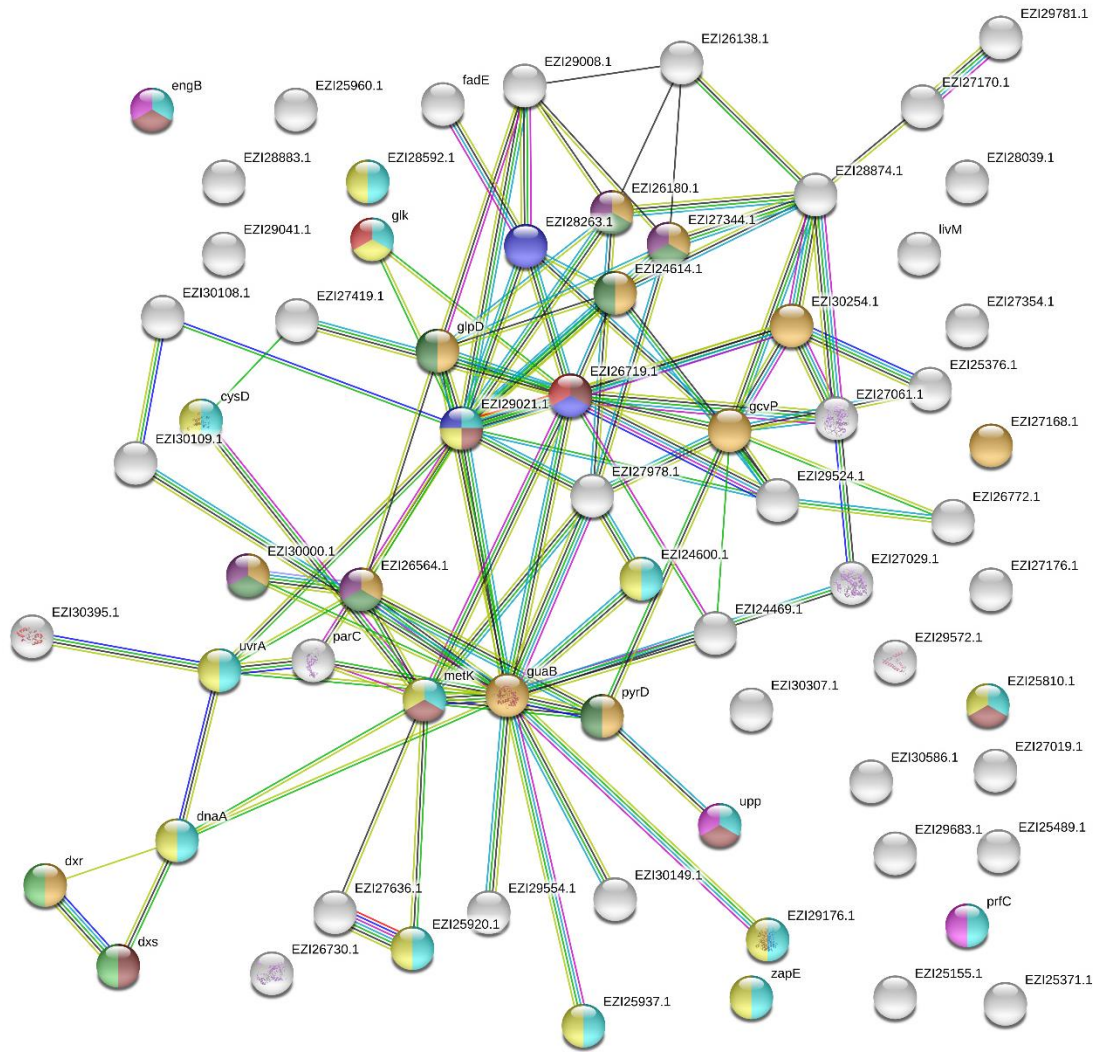


Figura 11R: Niveles de expresión de proteínas en condiciones de crecimiento microaeróbico y m-OS. *Volcano plot* que representa $-\log(P\text{-valor})$ vs \log_2 (veces de cambio). Los círculos verdes (panel superior derecho) y rojos (panel superior izquierdo) representan proteínas sobre-expresadas y reprimidas ($P < 0,05$, veces de cambio > 2) respectivamente. m-OS vs. Microaerobiosis. No se muestran las proteínas ON/OFF.

El análisis realizado con el programa STRING, mostró que la exposición a estrés oxidativo en microaerobiosis provocó un enriquecimiento significativo de las proteínas del tipo oxido-reductasas y de unión a nucleótidos y ATP. En cuanto a las vías metabólicas, se vieron aumentadas aquellas relacionadas con metabolismo del piruvato, la glucólisis y la biosíntesis de terpenoides (Figura 12R).



keyword	description	count in gene set	false discovery rate
KW-0560	Oxidoreductase	12 of 264	0.0030
KW-0547	Nucleotide-binding	16 of 467	0.0030
KW-0285	Flavoprotein	7 of 76	0.0030
KW-0460	Magnesium	7 of 125	0.0135
KW-0067	ATP-binding	13 of 428	0.0189
KW-0274	FAD	4 of 44	0.0262
KW-0670	Pyruvate	3 of 22	0.0296
KW-0414	Isoprene biosynthesis	2 of 7	0.0414
KW-0342	GTP-binding	3 of 27	0.0414
KW-0324	Glycolysis	2 of 9	0.0499

Figura 12R: Redes de interacciones para proteínas sobre-expresadas en m-OS. Redes de interacciones generadas por el programa STRING. Cada círculo representa una proteína. Los nodos coloreados corresponden a grupos funcionales enriquecidos significativamente (código de colores en panel inferior)

Adicionalmente, la clasificación funcional (Figura 13R) reveló que la exposición al H₂O₂ en microaerobiosis resultó en una disminución de las proteínas pertenecientes a varias categorías, como las chaperonas, incluyendo una proteína del tipo *cold shock* (PE143B_0120120) y proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro y / o la presencia de grupos hemo. Teniendo en cuenta que el hierro potencia la toxicidad del oxígeno mediante la reacción de Fenton, una disminución en su presencia podría ser beneficioso para la célula. También se encontró que la mayoría de los elementos asociados con la transducción de señales y la regulación génica se encontraron reprimidos, entre ellos reguladores transcripcionales de la familia TetR y DeoR. Cabe mencionar que después de la exposición al H₂O₂, y en concordancia con lo observado en el análisis de enriquecimiento funcional, se detectó un aumento en las proteínas involucrados en el metabolismo de los aminoácidos y en la producción de metabolitos secundarios, como la biosíntesis de terpenoides mediante la vía MEP/DOXP (DxR - A0A023CEF0, DxS - A0A023C568). Se ha reportado que algunos terpenoides cíclicos pueden estar involucrados en la respuesta a estrés oxidativo, ejerciendo un rol protector ante el mismo (Bosak, Losick and Pearson, 2008). En cuanto a las defensas oxidativas, se observó que la exposición a H₂O₂ provocó la sobre-expresión de diversas enzimas, entre las que se destacan una alquilhidroperoxidasa (A0A023CG88), tres proteínas de respuesta a estrés (*universal stress proteins*; A0A023CGH8, A0A023CF21, A0A023CGD1) y una enzima glutatión S-transferasa (A0A023C4H0).

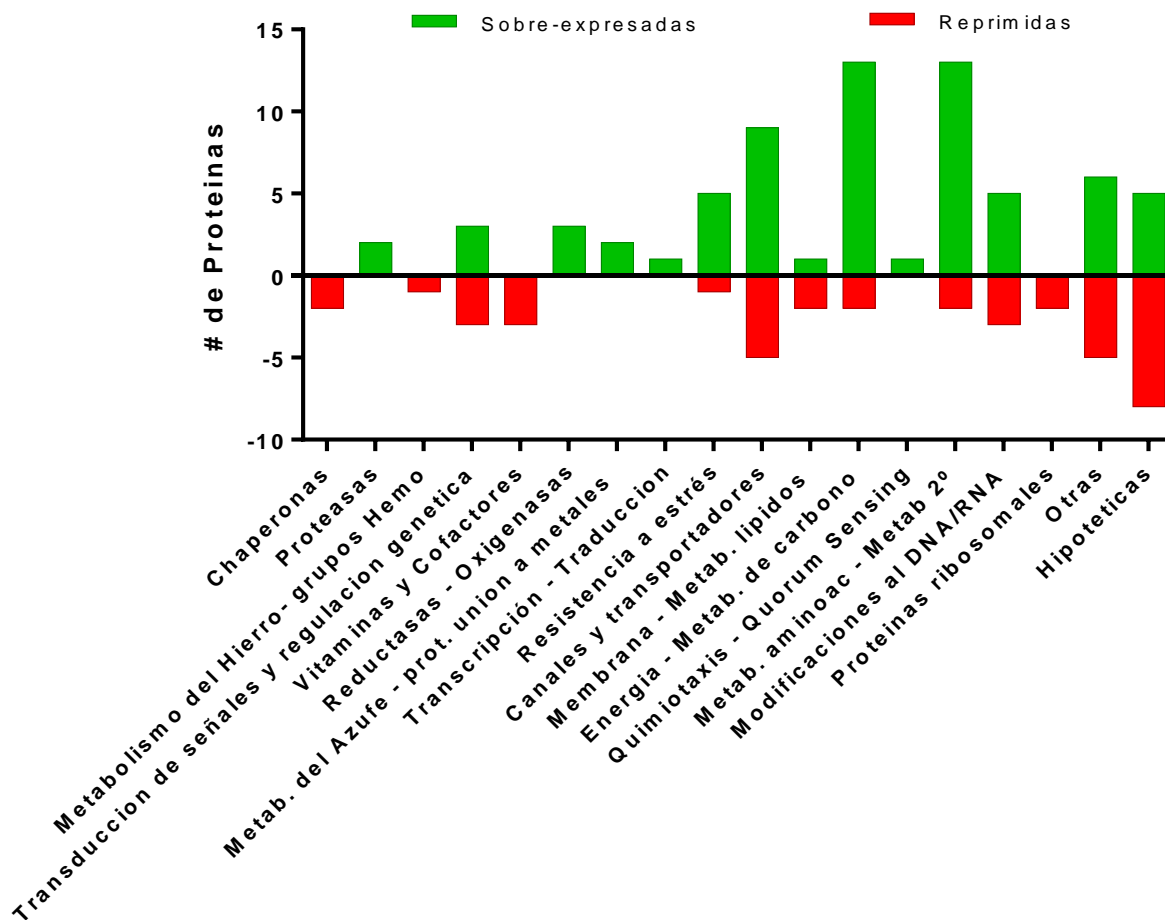


Figura 13R: Clasificación en categorías funcionales de proteínas diferencialmente expresadas. Proteínas diferencialmente expresadas ($P < 0,05$, veces de expresión > 2 / Proteínas ON-OFF) en m-OS vs. microaerobiosis. Las barras rojas (inferiores) y verdes (superiores) representan genes reprimidos y sobre-expresados respectivamente.

Evaluación diferencial de la respuesta a estrés oxidativo en condiciones de alta y baja aireación

Con el objeto de identificar los mecanismos que actúan diferencialmente en respuesta a estrés oxidativo en condiciones de aerobiosis y microaerobiosis, se compararon los perfiles proteicos en condiciones m-OS relativos a a-OS. Esta comparación mostró 117 proteínas con niveles de

abundancia diferenciales, 62 reprimidas y 55 sobre-expresadas en m-OS (Figura 14R). Además, se detectaron 138 y 37 proteínas exclusivamente en a-OS (OFF) y m-OS (ON), respectivamente (Anexo Tabla 4A), lo que representa un total de 200 proteínas reprimidas y 90 sobre-expresadas en microaerobiosis con estrés oxidativo.

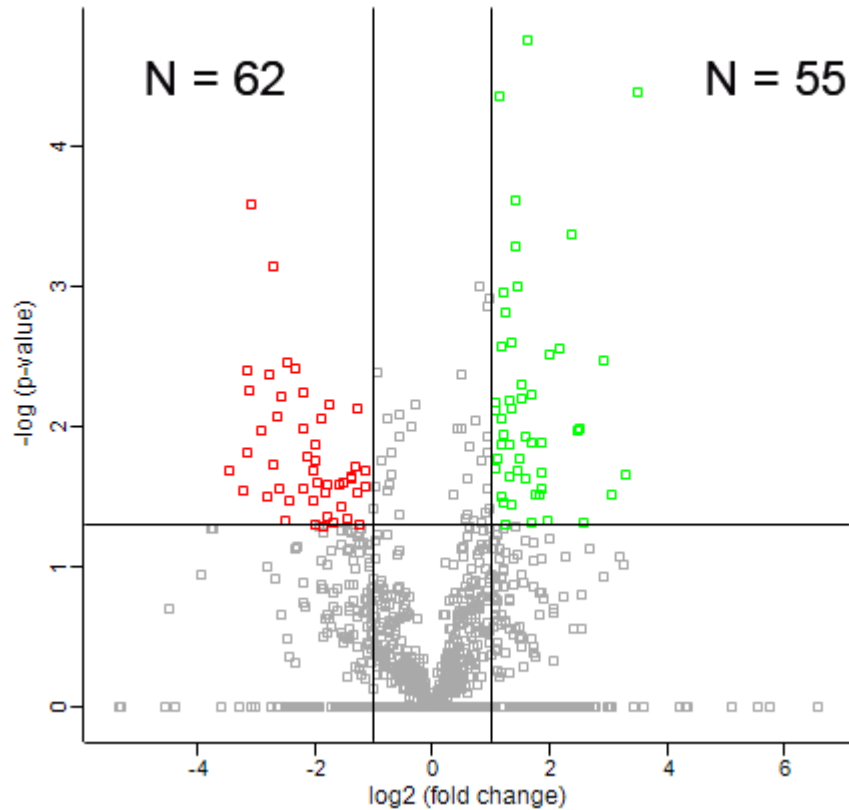


Figura 14R: Niveles de expresión de proteínas en condiciones m-OS y a-OS. *Volcano plot* que representa $-\log$ (P-valor) vs \log_2 (veces de cambio). Los círculos verdes (panel superior derecho) y rojos (panel superior izquierdo) representan proteínas sobre-expresadas y reprimidas ($P < 0,05$, veces de cambio > 2) respectivamente. m-OS vs. a-OS. No se muestran las proteínas ON/OFF.

El análisis de enriquecimiento funcional mostró que luego de la exposición a H_2O_2 en microaerobiosis diversas vías del metabolismo del carbono se encontraron reprimidas, entre las que se encuentra el metabolismo del piruvato (A0A023CGI8, A0A023CH52, A0A023CAS1, A0A023C1Q2, A0A023CGX8, A0A023C6D0, A0A023C6R3, A0A023C8G1, A0A023C8E2, A0A023C272). Por otra parte, entre las categorías funcionales que se vieron enriquecidas encontramos proteínas de unión a

metales, incluyendo aquellas relacionadas con el metabolismo del hierro y del grupo hemo (Figura 15R). Asimismo, se encontraron sobre-expresadas en m-OS proteínas relacionadas con la detoxificación de peróxido de hidrogeno (Grupos: *hydrogen peroxide / peroxidases*).

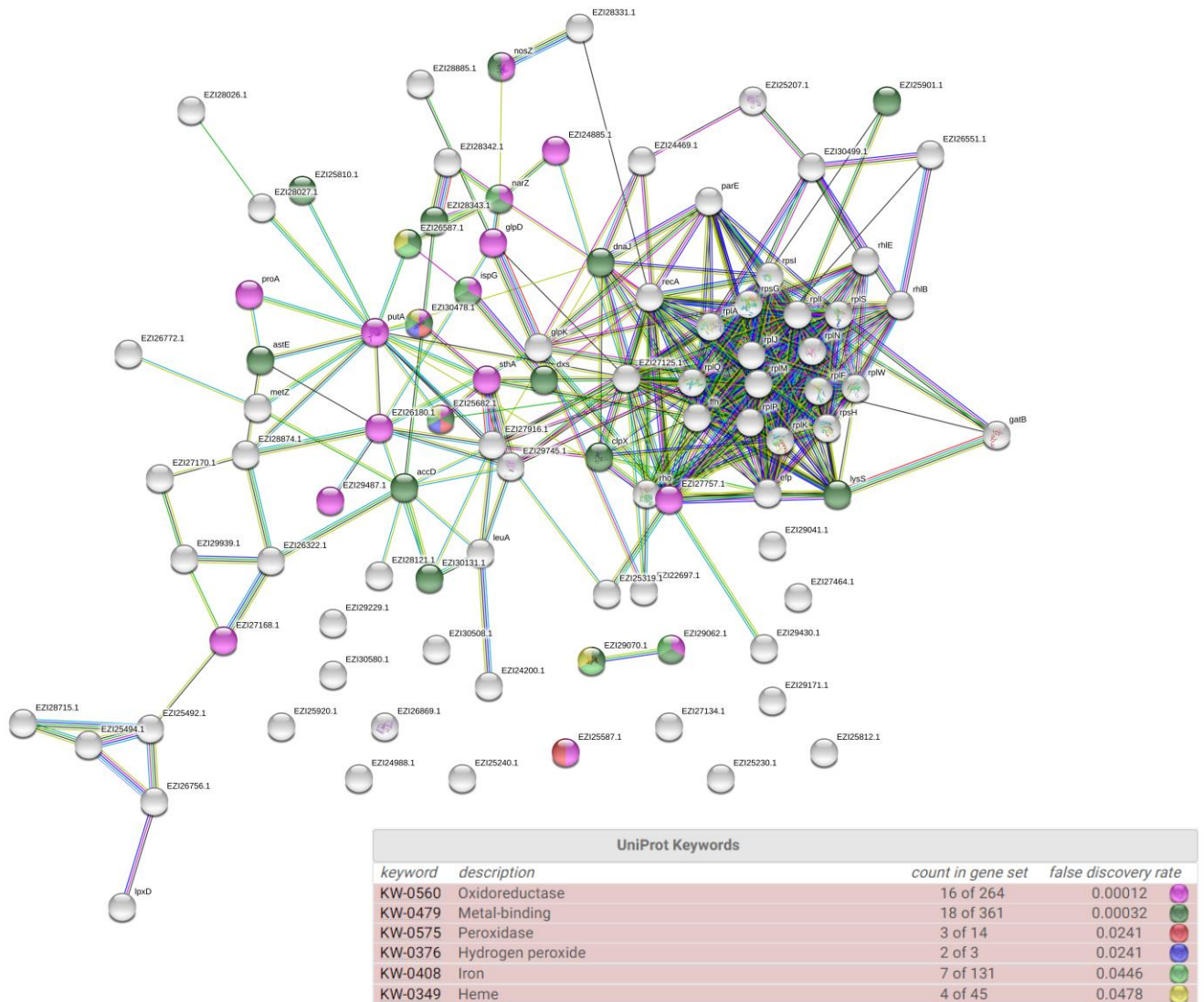


Figura 15R: Redes de interacciones para proteínas sobre-expresadas en m-OS (en relación a a-OS). Redes de interacciones generadas por el programa STRING. Cada círculo representa una proteína. Los nodos coloreados corresponden a grupos funcionales enriquecidos significativamente (código de colores en panel inferior derecho)

La clasificación funcional también mostró que diversos reguladores o sistemas de transducción de señales presentaron expresión diferencial entre las condiciones m-OS y a-OS (Figura 16R). Entre aquellos que se encontraron reprimidos en m-OS podemos identificar: GlnD (A0A023CEQ6) y GlnA (A0A023CC59 - EZI26840.1), que regulan el metabolismo del nitrógeno mediando en la asimilación de amonio o modificando la actividad del sistema NtrB/NtrC (Hervás, Canosa and Santero, 2010) y AatJ (A0A023CC51), involucrada en el transporte de Glutamato y Arginina.

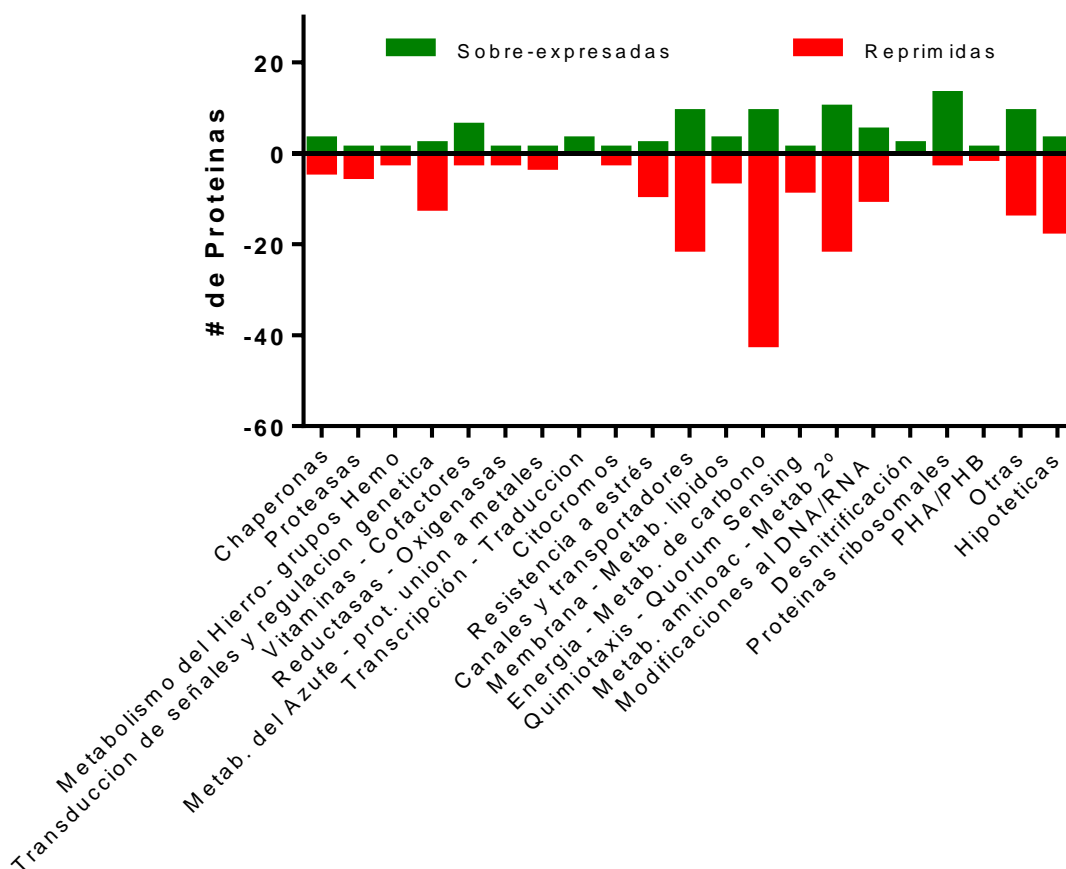


Figura 16R: Clasificación en categorías funcionales de proteínas diferencialmente expresadas. Proteínas diferencialmente expresadas ($P < 0,05$, veces de expresión > 2 / Proteínas ON-OFF) en m-OS vs a-OS. Las barras rojas (inferiores) y verdes (superiores) representan genes reprimidos y sobre-expresados respectivamente.

Análisis comparativo general de la expresión de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo en las condiciones estudiadas

Los resultados obtenidos indican que los cultivos microaeróbicos presentan una mayor sensibilidad al H_2O_2 que los cultivos aeróbicos, lo que también se asocia con tasas de supervivencia menores y mayores niveles de daño proteico. Notoriamente, en condiciones aeróbicas a pesar de registrarse una mayor resistencia al estrés, los niveles de expresión abundancia de numerosas enzimas detoxificantes de ROS permanecieron sin cambios después de una hora de exposición al H_2O_2 . En contraste, en microaerobiosis la exposición a H_2O_2 resultó en un aumento de las proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, como glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa y alquilhidroperóxido reductasas. El análisis comparativo del perfil de expresión de varias proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo en las condiciones estudiadas (Figura 17R) mostró que la mayoría de las proteínas de detoxificación de ROS y RNS están presentes en niveles más altos en condiciones aeróbicas, incluso antes de la adición de H_2O_2 . Varias de las proteínas que se encontraron expresadas en aerobiosis mantuvieron sus niveles luego de la adición de H_2O_2 . Sin embargo, en otros casos los niveles descendieron luego de la exposición a estrés (Figura 17R). Esto no se observó en microaerobiosis, donde el nivel de estas proteínas, como las catalasas y las superóxido-dismutasas, fue bajo y se incrementó después de la exposición al agente oxidante. Algunas enzimas, como dos alquil hidroperóxido reductasas (AHPs), una superóxido dismutasa (SOD) y una catalasa (KatA), presentaron expresión en todas las condiciones evaluadas. Esto podría indicar que estas enzimas son necesarias para el mantenimiento de las células, detoxificando las ROS que se producen como consecuencia del metabolismo basal.

Estas observaciones en conjunto con la mayor resistencia al estrés detectada podrían sugerir que las células expuestas a aireación elevada poseen mayor expresión de enzimas detoxificantes, previo a la presencia del agente oxidante, y por lo tanto desplegarían una respuesta más rápida y eficiente frente a la exposición al estrés. Cabe destacar que, al evaluar las proteínas presentes, observamos la sobre-expresión en m-OS de los elementos relacionados con los sistemas antioxidantes que comprenden las vías tiorredoxina (TRX) y glutatión-glutarredoxina. Estas vías tienen particular relevancia en la protección de las proteínas que presentan grupos tioles o residuos cisteína expuestos (Ezraty *et al.*, 2017).

Si bien todas estas proteínas contribuyen a la detoxificación de especies reactivas y a la supervivencia celular, todas actúan de distinta manera. Las enzimas del tipo catalasas y superóxido

dismutadas, intervienen directamente sobre las especies reactivas (O_2^- y H_2O_2 , respectivamente), reduciéndolas. En las células bacterianas se encuentran presentes distintos tipos de catalasas (entre ellas KatA, KatB y KatE), que responden a distintos estímulos y tienen actividades no redundantes, permitiendo una respuesta coordinada al estrés oxidativo (Guo *et al.*, 2012). Las enzimas del tipo TRX, en cambio, se encargan de mantener a las proteínas presentes en las células en un estado reducido en presencia de agentes oxidantes. Para ello, estas enzimas requieren de poder reductor en forma de NADPH (Lu and Holmgren, 2014). El glutatión reducido (GSH) por otra parte, puede actuar directamente sobre las ROS y RNS o sobre los subproductos de sus reacciones con los componentes celulares o bien indirectamente mediante su interacción con enzimas específicas. Entre ellas podemos mencionar a las glutatión S-transferasas (GSTs) que coordinan la conjugación de glutatión reducido a complejos oxidantes (Potter, Trappetti and Paton, 2012). Para ello las células necesitan una producción estable de glutatión (mediante la acción, por ejemplo, de la enzima glutatión reductasa y/o glutatión sintetasa). Por último, las enzimas del tipo alquil hidroperóxido reductasas (en conjunto con otras peroxirredoxinas), a su vez, utilizan tioles reactivos para reducir los peróxidos (Dubbs and Mongkolsuk, 2007).

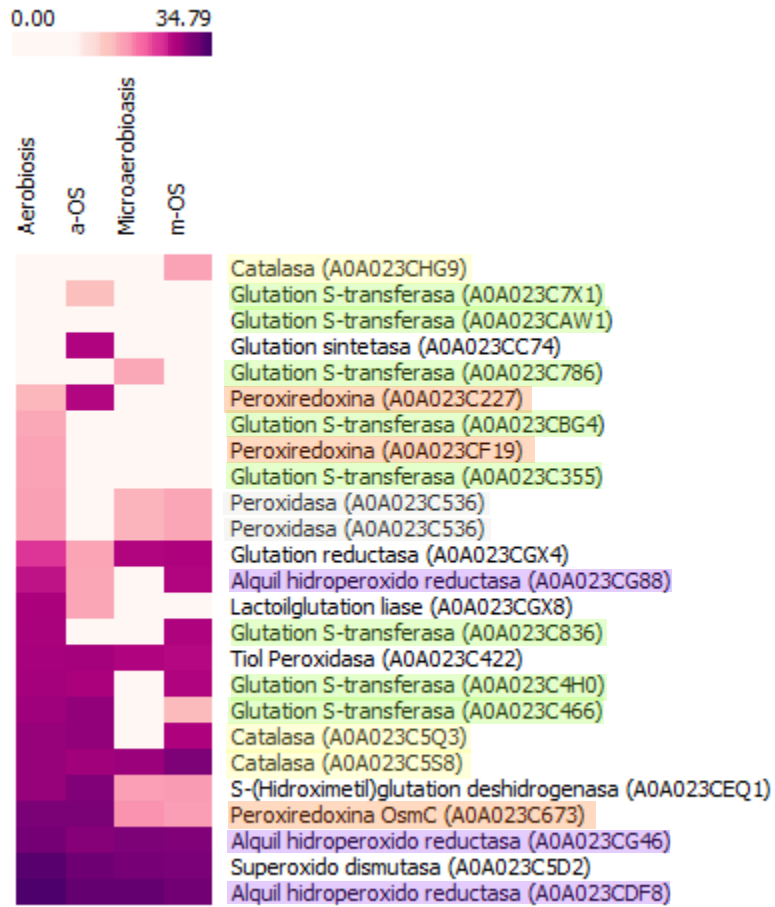


Figura 17R: Perfil de expresión de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo en condiciones de crecimiento aeróbico, a-OS, microaeróbico y m-OS. El *heat map* ilustra los niveles de expresión de las proteínas detectadas por NanoLC-MS / MS. La escala de colores representa el log2 promedio (área de pico normalizado).

Resumen de resultados relevantes del capítulo

En este capítulo se analizó la respuesta estrés oxidativo en distintas condiciones de aireación en *P. extremaustralis*, utilizando enfoques fisiológicos y globales. El análisis proteómico reveló que *P. extremaustralis* exhibe respuestas marcadas a los cambios de aireación y exposición a estrés, los cuales se enumeran, a modo de resumen, en la figura 18.

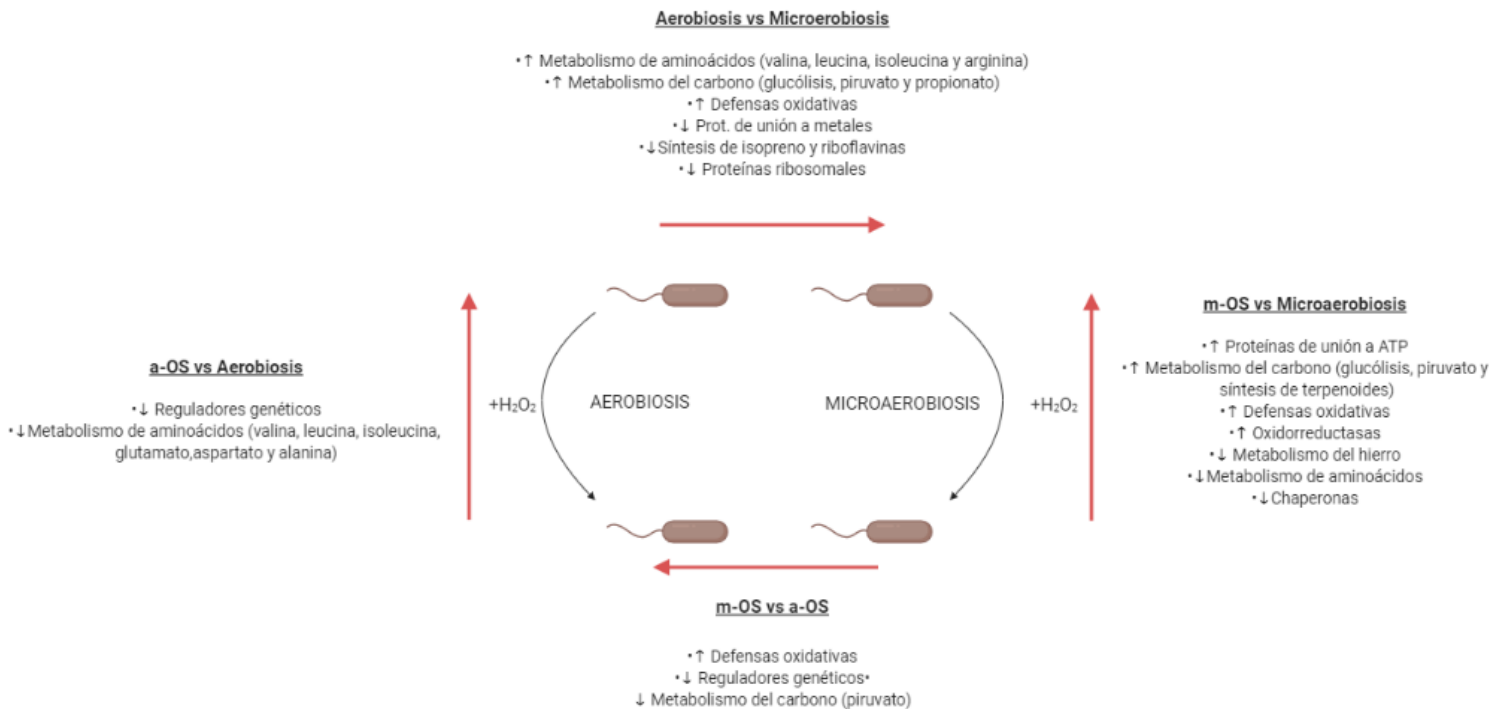


Figura 18R: Metabolismos con expresión diferencial en aerobiosis, a-OS, microaerobiosis y m-OS detectados por análisis proteómicos.

Las enzimas pertenecientes al metabolismo central del carbono se encontraron más expresadas en condiciones de crecimiento aeróbico, la condición más favorable para el desarrollo bacteriano. A esto se le suma una mayor activación del metabolismo de aminoácidos.

Tal vez lo más relevante resulte ser el análisis de las defensas oxidativas en las distintas condiciones de aireación y exposición a H₂O₂. Muchas de las enzimas relacionadas con la detoxificación de ROS y RNS, así como con el mantenimiento de la integridad de macromoléculas, se encontraron expresadas en condiciones de aerobiosis. Esto podría ser indicativo de que las condiciones de aireación y agitación utilizadas para los análisis en el laboratorio son suficientes para generar un nivel de especies reactivas

que induzca este tipo de respuestas. La exposición a H_2O_2 en cultivos aeróbicos no produjo un aumento significativo de estas enzimas, y en varios casos las mismas disminuyeron. Por otra parte, y en relación probablemente con un entorno intracelular más reducido, en condiciones de microaerobiosis la expresión de defensas antioxidativas fue menor. Sin embargo, la presencia de varias de ellas resultó activada luego de la exposición a H_2O_2 . En relación a esto, el análisis comparativo entre m-OS y a-OS, reveló la sobre-expresión de enzimas relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo en m-OS.

CAPÍTULO 2

*Análisis de la respuesta a estrés oxidativo en
microaerobiosis mediante técnicas
transcriptómicas*

CAPÍTULO 2

Análisis de la respuesta a estrés oxidativo en microaerobiosis mediante técnicas transcriptómicas.

En el capítulo anterior se analizó, mediante estudios proteómicos, la respuesta a estrés oxidativo en condiciones de alta y baja aireación. En función de los resultados obtenidos que mostraron una respuesta interesante en condiciones de microaerobiosis con estrés oxidativo y teniendo en cuenta que este aspecto está poco estudiado en especies de *Pseudomonas*, en este capítulo se analizará la respuesta a estrés oxidativo en microaerobiosis mediante estudios transcriptómicos globales (RNA-seq).

Análisis transcriptómico de *P. extremaustralis* en condiciones de baja aireación y estrés oxidativo.

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación de RNA se analizaron utilizando el software Rockhopper (McClure *et al.*, 2013). Luego de este análisis se verificó la concordancia entre las dos réplicas biológicas secuenciadas para cada una de las condiciones analizadas M y m-OS (Figura 19R). En ambos casos se observó que las réplicas correlacionan entre sí en ambas condiciones (*Spearman r* = 0,9265 y *Spearman r* = 0,9197, respectivamente).

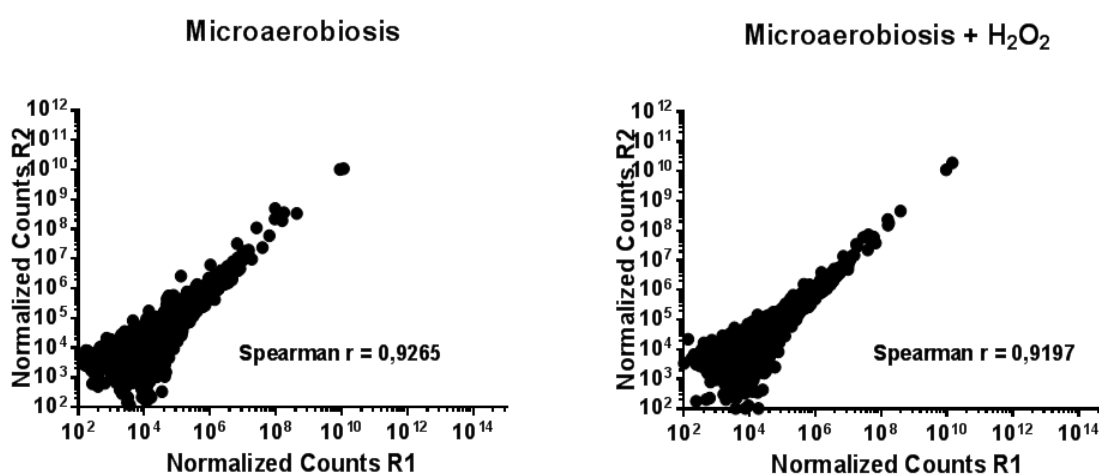


Figura 19R: Análisis de correlación de *Spearman* para lecturas normalizadas de dos réplicas biológicas (R1 y R2). A: Condición de microaerobiosis B: Condición de microaerobiosis con agregado de H₂O₂ 3mM (m-OS).

La técnica de RNA-seq permitió identificar 6091 transcritos y 178 posibles pequeños RNAs con función regulatoria (sRNAs), cuyo análisis se profundizará en el capítulo 3 de esta tesis. Entre los transcritos detectados, 336 resultaron expresados de manera diferencial en m-OS en comparación con microaerobiosis con relevancia estadística ($P < 0,05$, $Q < 0,05$), de los cuales 93 genes se encontraron sobre-expresados y 243 reprimidos (Tabla 5 – Anexo) luego de una hora de exposición a H_2O_2 , lo que indica que alrededor del 5% de los genes respondieron al tratamiento (Figura 20R).

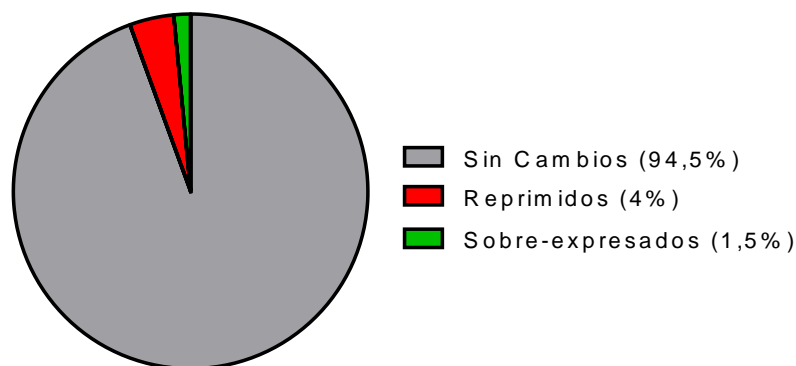


Figura 20R: Distribución porcentual de genes con expresión diferencial luego de la exposición a H_2O_2

Validación experimental de los datos obtenidos por RNA-seq

Debido a que la secuenciación masiva de RNA resulta una técnica global, es necesario realizar experimentos que analicen la expresión de genes individuales en las mismas condiciones para validar los resultados obtenidos. Los datos se validaron por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), seleccionándose como blanco genes tanto reprimidos como sobre-expresados según los resultados de RNA-seq. Se analizaron los niveles de expresión de *ahpF* (PE143B_0102495) y *grx* (PE143B_0121455), que codifican una alquil hidropéroxido reductasa y una glutarredoxina respectivamente, que se encontraron sobre-expresados en condiciones m-OS frente a microaerobiosis según el análisis por RNA-seq. Entre los genes reprimidos, se verificó el perfil de expresión del gen *tam*, que codifica la enzima trans-aconitato metil transferasa (PE143B_0123680) y *hbo* (PE143B_0110705), que codifica una proteína de la familia de las hemoglobinas. En todos los casos, el análisis individual de genes mostró la misma tendencia que la observada por RNA-seq (Figura 21R).

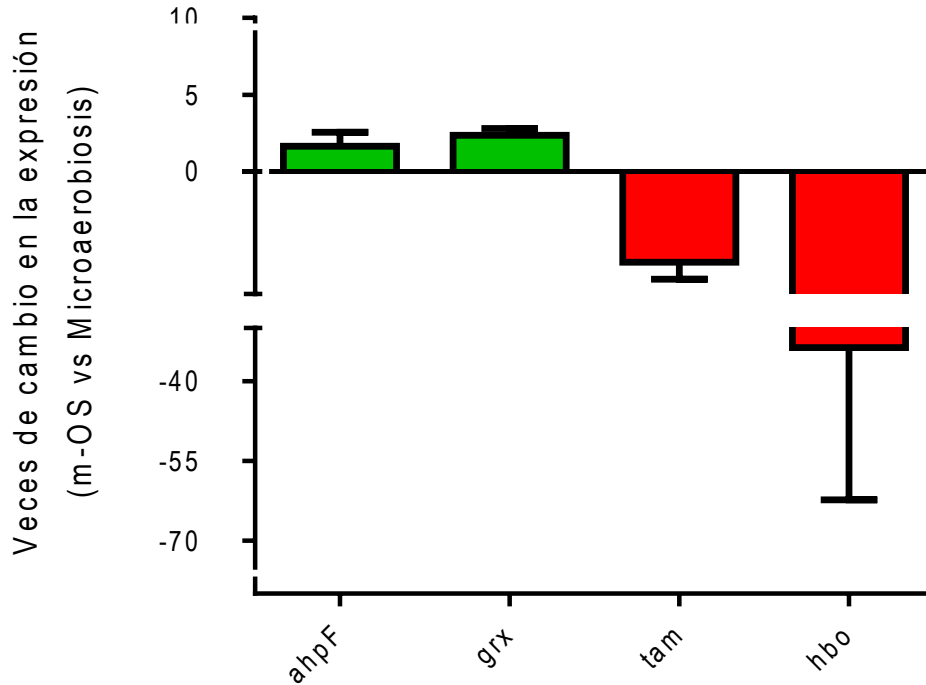


Figura 21R: Análisis comparativo de la expresión génica (RT-qPCR) de 4 genes seleccionados entre m-OS y microaerobiosis. Los valores representan la media \pm desvío estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados se analizaron para determinar si existe un enriquecimiento funcional de transcritos pertenecientes a alguna categoría particular utilizando la herramienta bioinformática BLAST2GO. Este programa clasifica los genes diferencialmente regulados en categorías GO (*gene ontology*) y determina estadísticamente mediante el Test de Fischer aquellas categorías que se encuentran sobre-representadas dentro de dicho set de datos (Figura 22R). Dentro de las categorías GO sobre-expresadas se destacan aquellas relacionadas con la actividad antioxidante, la homeostasis celular y la respuesta a estrés. Por su parte, dentro de los genes reprimidos podemos mencionar aquellos con dominio de unión a oxígeno y aquellos relacionados con la traducción y regulación post-transcripcional.

A



B

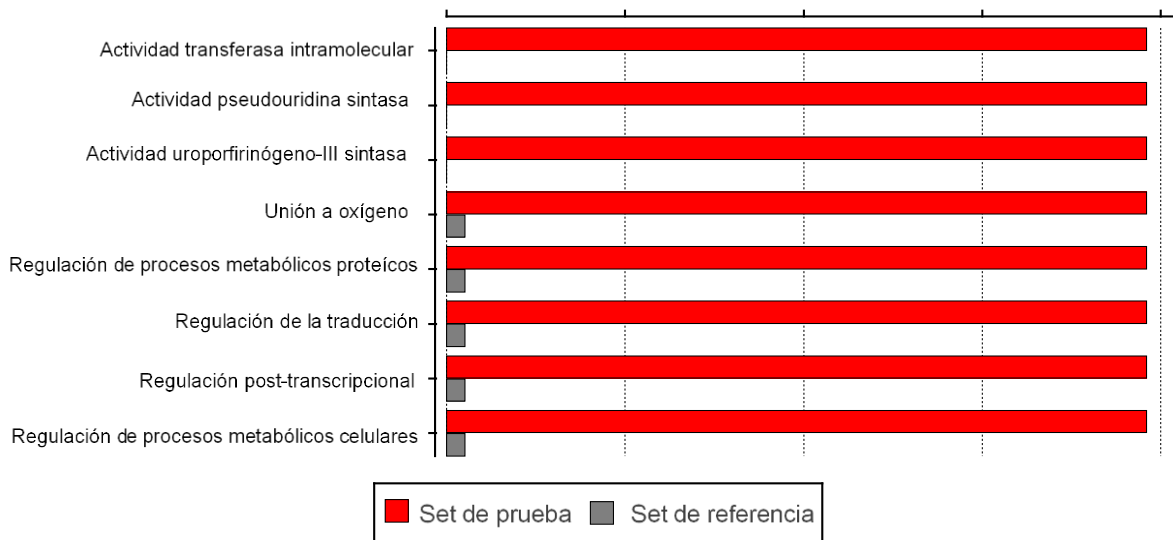


Figura 22R: Análisis de enriquecimiento funcional utilizando el programa Blast2GO. Test de Fisher con $P < 0,05$ **A:** Genes sobre-expresados. **B:** Genes reprimidos

Adicionalmente, los genes con expresión diferencial se clasificaron según su función utilizando las herramientas Metacyc, Biocyc y KEGG (Figura 23R). Este análisis mostró que la mayoría de los transcritos correspondían a proteínas hipotéticas, que representan el 26,9% y el 32,7% de los genes expresados diferencialmente (sobre-expresados y reprimidos, respectivamente). Entre los genes reprimidos, pudimos identificar varios genes que codifican citocromos (citocromos *c2*, *c551*, *cioB* y *cydA*) y proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro y / o la presencia de grupos hemo. Por otra parte, entre los genes reprimidos también se detectó el que codifica una proteína del tipo *cold shock* (PE143B_0120120) y en concordancia con lo observado anteriormente en el perfil proteómico, la exposición al H₂O₂ en microaerobiosis resultó en una disminución en la expresión de genes correspondientes a proteínas tipo chaperonas, como *cspA*, *cspG* y dos chaperonas con homología a Hsp20 (PE143B_0127215 y PE143B_0129760), con la excepción de *hscB*, una enzima relacionada con la maduración de proteínas con centros Fe-S, que se encontró sobre-expresada. Algunos genes implicados en el metabolismo de lípidos, diversos elementos de membrana y genes que codifican proteínas *carrier*, incluidas varias lipoproteínas de la membrana externa como *pgsA*, *vacJ*, *potI* y *oprI*, también se encontraron reprimidos en condiciones de m-OS. Estos hallazgos podrían apuntar a un aumento en el estrés de membrana derivado de las condiciones altamente oxidantes. Asimismo, y en concordancia con los resultados obtenidos a partir del análisis de enriquecimiento funcional, se encontraron reprimidos varios genes relacionados con los procesos de transcripción y traducción, sugiriendo una caída en la síntesis proteica. Adicionalmente, la mayoría de los genes asociados con la transducción de señales y la regulación génica se encontraron reprimidos a nivel de mRNA, en coincidencia con los resultados de proteómica.

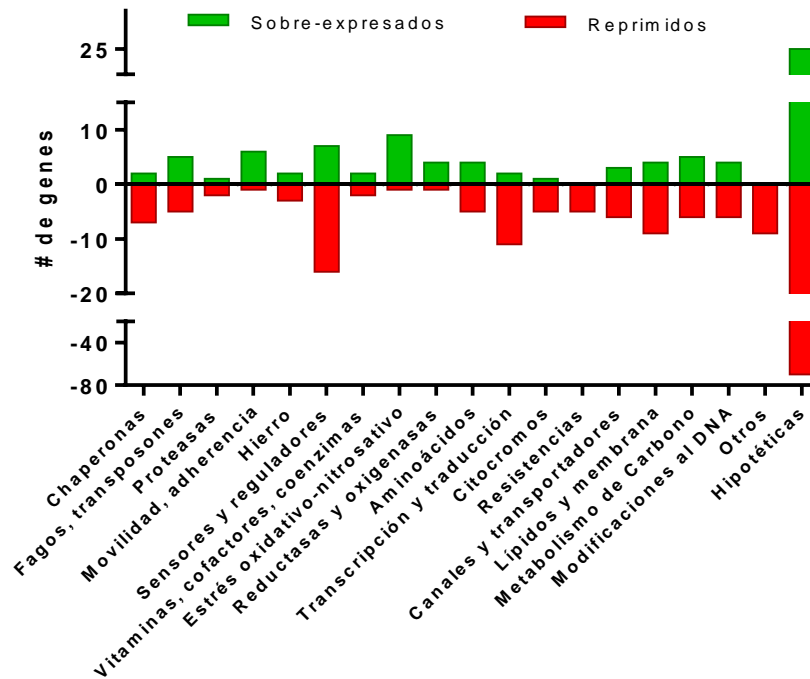


Figura 23R: Clasificación en categorías funcionales de genes con expresión diferencial (m-OS vs. Microaerobiosis, $P < 0,05$ y $Q < 0,05$). Las barras verdes y rojas representan genes sobre-expresados y reprimidos, respectivamente.

Se observó una mayor expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo, entre ellos catalasa (*katA*) y glutarredoxina (*grxC*), así como alquil hidroperóxido reductasas (*ahpC* y *ahpF*), relacionadas también con la detoxificación de RNS. Sin embargo, *hbo*, tradicionalmente relacionado con la respuesta a RNS en aerobiosis (Coppola *et al.*, 2013), se vio reprimido. Cabe destacar un incremento de casi 50 veces de los transcriptos correspondientes al gen que codifica la proteína de resistencia a peróxidos orgánicos (*Ohr*). Esta enzima cumple un rol fundamental en la defensa contra peróxidos

derivados de ácidos grasos y ha sido relacionada recientemente con mecanismos de defensa ante especies reactivas de nitrógeno (Alegria *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que después de la exposición al H₂O₂ se observó un aumento en proteínas y transcriptos involucrados en el metabolismo de los aminoácidos y en la producción de metabolitos secundarios, como la biosíntesis de terpenoides. Además, se identificaron numerosos transcriptos involucrados en la motilidad celular y la formación de *biofilms*, como *fliN*, *pgaD*, *fliJ*, *fliQ* y *flhC* (Tabla 5-Anexo). Estos genes, con excepción de *flhC* y *pgaD*, se encuentran dentro de un *cluster* de biosíntesis de flagelos que incluye *fliEFGHIJ*, *fliKLMNQPQR* y *flhB*.

Análisis del efecto del H₂O₂ en la presencia de flagelos y movilidad

Los resultados de RNA-seq mostraron numerosos genes implicados en la biosíntesis de flagelos, incluido el que codifica el regulador transcripcional FhIC, con sobre-expresión en m-OS. *P. extremaustralis* posee dos grupos de genes flagelares, ubicados en diferentes regiones de su genoma. El grupo I (PE143B_0108675 - PE143B_0108755) se asemeja a los genes canónicos para la síntesis de flagelos polares en la mayoría de las especies de *Pseudomonas*, presentando similitud tanto en la identidad como en la organización genómica con otras especies de este género. El segundo *locus* de flagelos, denominado *cluster* II (PE143B_0126760 - PE143B_0126835), muestra sintenia con *Azotobacter vinelandii* y especies del género *Salmonella* (Figura 24R). Esta organización genómica particular de *loci* flagelar no es común entre *Pseudomonas spp.* y solo se ha descrito anteriormente para *Pseudomonas fluorescens* F113 (Redondo-Nieto *et al.*, 2013).

Los genes de ensamblaje flagelar que se encontraron sobreexpresados en m-OS, incluyendo *fliN*, *fliJ* y *fliQ*, están codificados dentro del *cluster* I. Además, otros genes de este grupo incrementaron su expresión después de la exposición al H₂O₂, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (P o $Q > 0,05$). Por otro lado, el gen *flhC*, que codifica un regulador que funciona como activador transcripcional flagelar y está ubicado en una región cercana al *cluster* II, presentó una sobre-expresión de 9 veces en condiciones m-OS. El resto de los genes pertenecientes al *cluster* II no mostró expresión diferencial entre las condiciones analizadas.

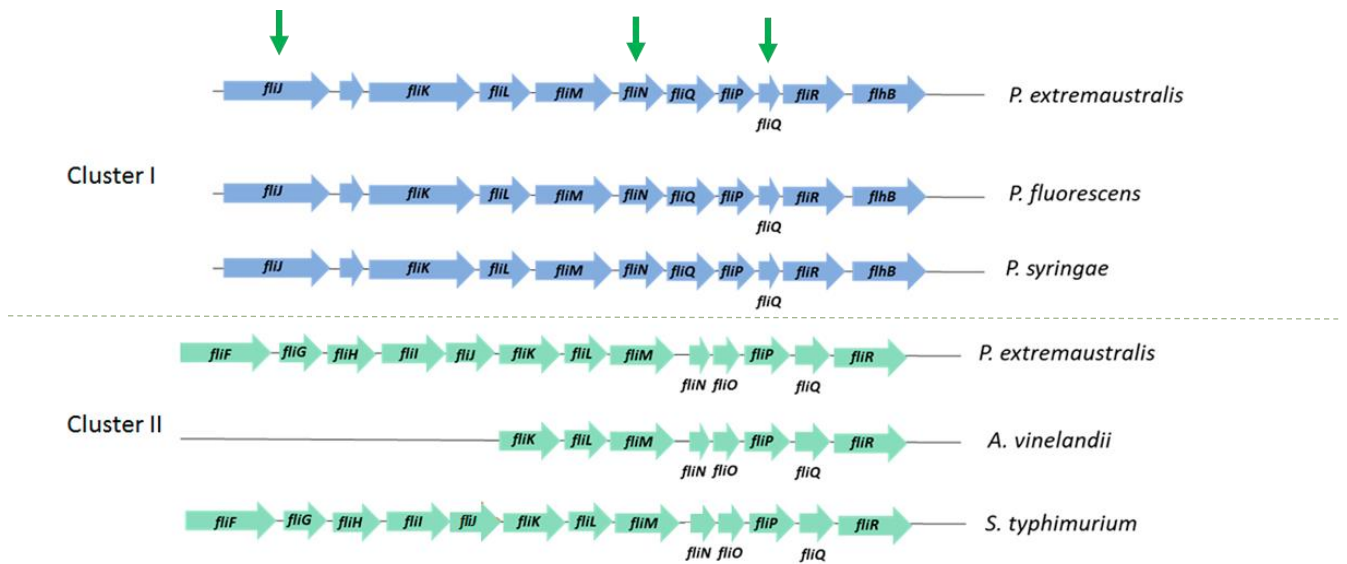


Figura 24R: Organización genómica de grupos de genes flagelares en *P. extremaustralis* y otras especies de *Pseudomonas*. Las flechas indican dirección y tamaño relativo de los genes. Las flechas verdes indican que dichos genes se encuentran sobre-expresados en condiciones m-OS

Asimismo, se observó expresión diferencial en diversos genes implicados en el comportamiento quimiotáctico, un tipo de movimiento basado en flagelos que responde a gradientes de estímulos ambientales. CheR es un regulador transcripcional involucrado en este tipo de comportamiento en bacterias móviles. *P. extremaustralis* posee 5 copias del gen *cheR*, codificado en diferentes partes del genoma: *cheR1* (PE143B_0105995), *cheR2* (PE143B_0122300), *cheR3* (PE143B_0102625), *cheR4* (PE143B_0103730) y *cheR5* (PE143B_0126050). El alineamiento de las secuencias de las distintas copias de *cheR* presentes en *P. extremaustralis*, mostró baja homología entre parálogos, con excepción de *cheR3* y *cheR4*. Estos genes se encuentran dentro de la misma región genómica y presentan una identidad del 99,63%. El análisis de expresión de los genes *cheR* indicó sobre-expresión de *cheR5* y represión de *cheR1* después del desafío con H₂O₂. Para analizar la relación entre estos reguladores se construyeron árboles filogenéticos utilizando secuencias de proteínas disponibles en bases datos y el programa MEGA 6.0. El árbol filogenético obtenido para secuencias *CheR* correspondientes a distintas especies de *Pseudomonas* se puede observar en la Figura 25R. El homólogo WspC de *P. aeruginosa* PAO1 y *cheR1* de *P. putida* KT2440 se han asociado previamente con el control de vías de formación de biopelículas, mientras que *CheR1* de *P. aeruginosa* PAO1 y *CheR2* de *P. putida* KT2440 están involucrados en el comportamiento quimiotáctico (García-Fontana et al., 2013).

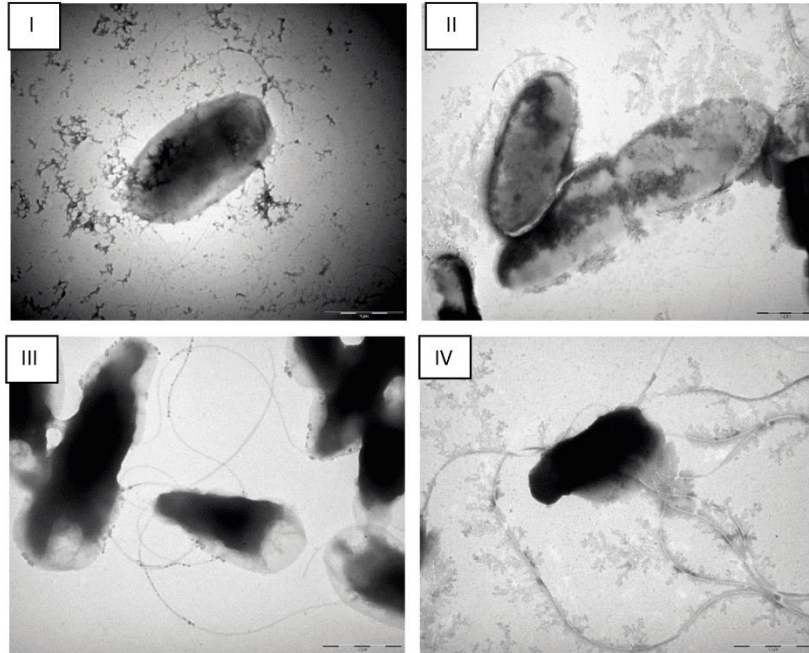


Figura 26R: Microscopía electrónica de transmisión. I: Cultivos en aerobiosis (46000X) II: Cultivos en aerobiosis expuestos a H_2O_2 3mM durante 1h (a-OS) (46000X). III: Cultivos en microaerobiosis (46000X) IV: cultivos en microaerobiosis expuestos a H_2O_2 3Mm durante 1h (m-OS) (46000X)

Se analizó además la movilidad de tipo *swarming*, dependiente de flagelos, mediante ensayos en placas semisólidas en distintas condiciones de aireación y estrés oxidativo. La motilidad no pareció afectada por la adición de H_2O_2 en condiciones de crecimiento aeróbicas (Figura 27R A y B). En contraste, el *swarming* fue mayor en condiciones de microaerobiosis en comparación con aerobiosis y mostró también diferencias significativas en presencia de estrés oxidativo (m-OS) (Figura 27R A y B). Esto se correlaciona con el mayor número de flagelos observados en condiciones microaeróbicas y m-OS por microscopía TEM.

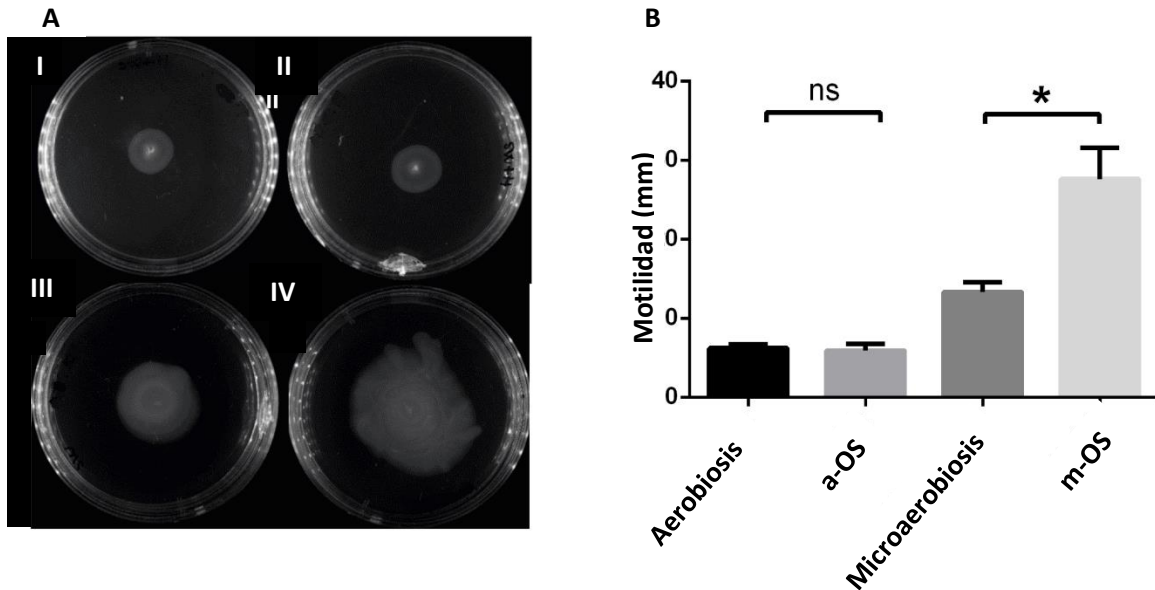


Figura 27R: **A:** Ensayos de *swarming*. I: Cultivos en aerobiosis II: a-OS III: Cultivos en microaerobiosis. IV: m-OS **B:** Cuantificación de la motilidad de tipo *swarming* en *P. extremaustralis*. Los valores representan la media \pm SD de 6 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas usando ANOVA de un factor, prueba de comparación múltiple de Dunn ($P < 0,05$).

Estudio de la formación de *biofilms*

Para analizar si las diferencias observadas en los patrones de flagelación de acuerdo a las condiciones de cultivo generaban otros cambios fenotípicos, se evaluó la capacidad de formación de *biofilms* mediante ensayos en placas multipocillo y tinción con cristal violeta. Los ensayos se realizaron a partir de cultivos en aerobiosis y microaerobiosis con y sin exposición a H_2O_2 . No se observaron diferencias significativas en la formación de biopelículas cuando se trabajó con células provenientes de cultivos en aerobiosis en comparación a condiciones a-OS. Sin embargo, se observó un mayor índice de formación de *biofilms* cuando las células provenían de cultivos microaeróbicos en relación a cultivos aeróbicos y esta diferencia fue incluso mayor en cultivos microaeróbicos con exposición a H_2O_2 (m-OS) en comparación a las otras condiciones analizadas (Figura 28R).

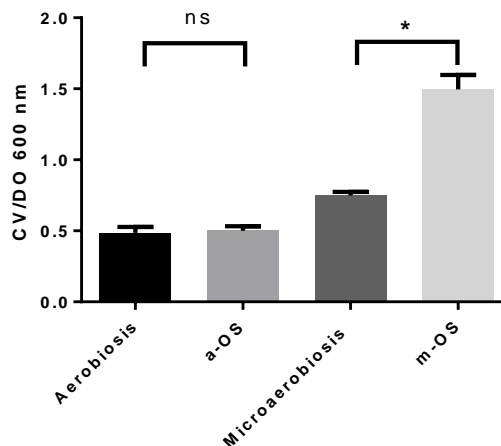


Figura 28R: Análisis de la formación de *biofilms*. Se usaron cultivos aeróbicos, microaeróbicos, a-OS y m-OS para la inoculación de placas *multiwell* que se incubaron durante 24 h. Los valores representan la media \pm SD de 7 experimentos independientes con 10 repeticiones (pocillos) por condición. Los asteriscos (*) denotan diferencias significativas usando ANOVA de un factor, prueba de comparación múltiple de Dunn ($P < 0,05$).

Adicionalmente, se evaluó la producción de exopolisacáridos (EPS), un componente importante en la matriz de los *biofilms*. Como puede observarse en la Tabla 3R, se incrementó en m-OS en relación con la microaerobiosis, pero no en a-OS en comparación con la aerobiosis. En concordancia con esto, el análisis transcriptómico mostró un aumento de 7,5 veces en la expresión de *pgaD*, que codifica una proteína de biosíntesis de poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (dPNAG), en condiciones m-OS con respecto a microaerobiosis. El dPNAG interviene en la adhesión célula-célula y en la interacción de las mismas a superficies abióticas y participa en la integridad estructural de las biopelículas (Little *et al.*, 2014).

Tabla 3R: Producción de EPS en condiciones aeróbicas, a-OS, microaeróbicas y m-OS. Los valores representan la media \pm SD de 4 experimentos independientes.

EPS (g) / DO600	Aerobiosis	Microaerobiosis
Control	3,33 \pm 0,21	8,69 \pm 0,94
H ₂ O ₂	3,16 \pm 0,09	11,72 \pm 1,18

Resumen de resultados relevantes del capítulo

En este capítulo se exploró el efecto del estrés oxidativo en condiciones de bajo oxígeno en *P. extremaustralis*, mediante la combinación de análisis transcriptómicos y estudios fisiológicos. El análisis de RNA-seq mostró la sobre-expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, flagelos, quimiotaxis y formación de *biofilms*, mientras que las chaperonas y los citocromos se encontraron reprimidos.

Los cultivos microaeróbicos expuestos al H₂O₂ mostraron un fenotipo de hiperflagelación en conjunto con un comportamiento de alta motilidad. Además, las células sometidas a estrés oxidativo presentaron índices de formación de *biofilms* más elevados y una mayor producción de EPS.

En conjunto, estos resultados sugieren que un aumento en la motilidad celular sumada a una mayor capacidad para formar estructuras complejas como *biofilms*, podrían funcionar en conjunto con la acción de enzimas antioxidantes y mecanismos no enzimáticos de eliminación de ROS para hacer frente al estrés oxidativo a bajas tensiones de oxígeno.

CAPÍTULO 3

*Identificación y análisis de posibles pequeños
RNA (sRNA) regulatorios en distintas condiciones
de aireación y estrés oxidativo*

CAPÍTULO 3

Identificación y análisis de posibles sRNA regulatorios en distintas condiciones de aireación y estrés oxidativo

Como se detalló en el capítulo 2, el protocolo utilizado para realizar los estudios transcriptómicos permite la recuperación de transcriptos pequeños, que pueden corresponder a pequeños RNA (sRNA), pudiendo establecer no solo su expresión diferencial en diversas condiciones, sino también la direccionalidad de los mismos. Teniendo en cuenta sus características, algunos de estos podrían presentar funciones regulatorias en la respuesta a diversos estímulos ambientales. A lo largo de este capítulo se analizan los sRNAs detectados ante los cambios en la aireación y exposición a estrés.

Se analizó el perfil transcriptómico de cultivos aeróbicos (A), microaeróbicos (M) y microaeróbicos expuestos a estrés oxidativo (m-OS) y se empleó el programa Rockhopper para determinar los transcriptos cortos que corresponden a potenciales sRNA. Adicionalmente, se aplicaron algoritmos que permiten seleccionar aquellas secuencias que corresponden a regiones intergénicas (en el caso de los sRNA en *trans*) o que se superponen completamente con regiones codificantes, pero que se transcriben desde las hebras complementarias a las mismas (sRNA *antisense*). Mediante esta estrategia se detectaron 238 transcriptos cortos correspondientes a secuencias intergénicas y 20 transcriptos antisentido, es decir, que se encuentran codificados en la hebra complementaria de regiones codificantes. Estos sRNA se nombraron con números al azar, de manera de poder identificarlos. De este conjunto, sólo algunos presentaron expresión diferencial entre las condiciones analizadas.

sRNA antisense en P. extremaustralis

Entre los 20 *antisense* encontrados, 12 presentaron expresión diferencial entre las condiciones analizadas, lo que equivale a un 60% de sRNA antisentido con expresión diferencial. Entre estos sRNA, 6 de presentaron expresión diferencial en todas las condiciones analizadas, es decir, mostraron patrones de expresión diferencial en aerobiosis vs. microaerobiosis y en microaerobiosis vs. m-OS (Figura 29R). Al hacer la comparación por condiciones observamos que 5 sRNA se encontraron sobre-expresados y 2 reprimidos en microaerobiosis en comparación con aerobiosis ($P < 0,05$, $Q < 0,05$ según análisis con Rockhopper), mientras que 11 sRNA se encontraron reprimidos en m-OS vs microaerobiosis (Figura 30R y Tabla 6A y 7A – Anexo).

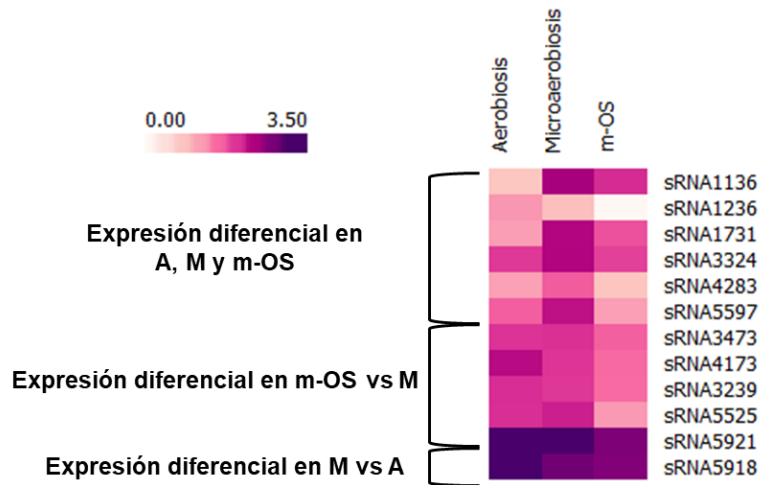


Figura 29R: Perfil de expresión de sRNA *antisense* con expresión diferencial en aerobiosis (A), microaerobiosis (M) y m-OS. El primer grupo corresponde a la expresión diferencial entre M vs. A y M vs. m-OS. La escala de colores representa el log10 de los niveles de expresión expresados como RPKM (*reads per kilo base per million mapped reads*).

sRNA en *trans* en *P. extremaustralis*

Entre los 238 posibles sRNA que se transcriben a partir de regiones intergénicas solo algunos presentaron expresión diferencial entre condiciones. Al comparar aquellos encontrados en condiciones de crecimiento microaeróbicas y aeróbicas, se detectaron 48 sobre-expresados y 25 reprimidos en microaerobiosis (Figura 30R y Tabla 8A – Anexo). Por otra parte, al analizar comparativamente los sRNA detectados en presencia de estrés oxidativo (m-OS) en comparación a microaerobiosis, se observaron 62 sRNA con expresión diferencial. Entre ellos 10 resultaron sobre-expresados y 52 reprimidos (Figura 30R y Tabla 9A – Anexo).

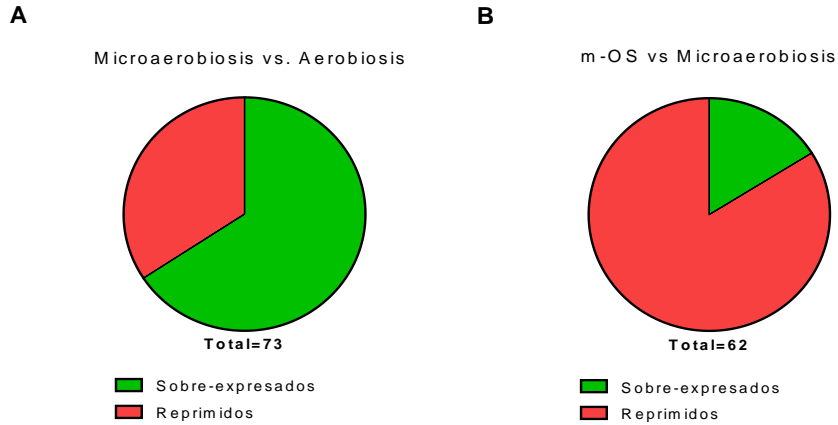


Figura 30R: sRNA con expresión diferencial en diversas condiciones de aireación y exposición a agentes estresantes. **A:** Microaerobiosis vs. Aerobiosis **B:** m-OS vs. Microaerobiosis

Al analizar conjuntamente las tres condiciones evaluadas, se determinó que en total se observaron 108 posibles sRNA en *trans* con expresión diferencial en diversas condiciones de aireación y estrés oxidativo, lo que representa al 45% de los sRNA detectados. 27 de ellos presentaron expresión diferencial en todas las condiciones analizadas, es decir, mostraron patrones de expresión diferencial en aerobiosis vs microaerobiosis y en microaerobiosis vs. m-OS (Figura 31R)

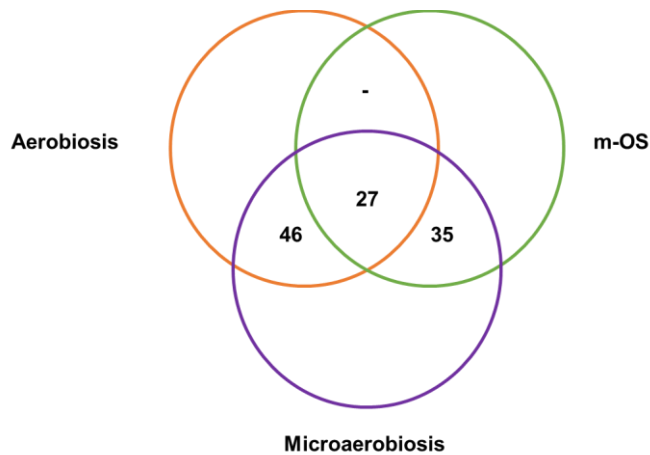


Figura 31R: Diagrama de Venn ilustrando los sRNA correspondientes a regiones intergénicas con expresión diferencial entre condiciones.

Análisis de los posibles sRNA

Con objeto de profundizar en el estudio del perfil de sRNA de *P. extremaustralis* se analizaron los tamaños de estos transcritos. En general, los pequeños RNA regulatorios poseen tamaños que varían entre los 50 y 400 nucleótidos (Wang and Fu, 2019). El análisis de la distribución por tamaño de estos posibles sRNA muestra que son similares a los observados en otras especies bacterianas y que la mayoría posee un largo de entre 80 y 200 nucleótidos (Figura 32R).

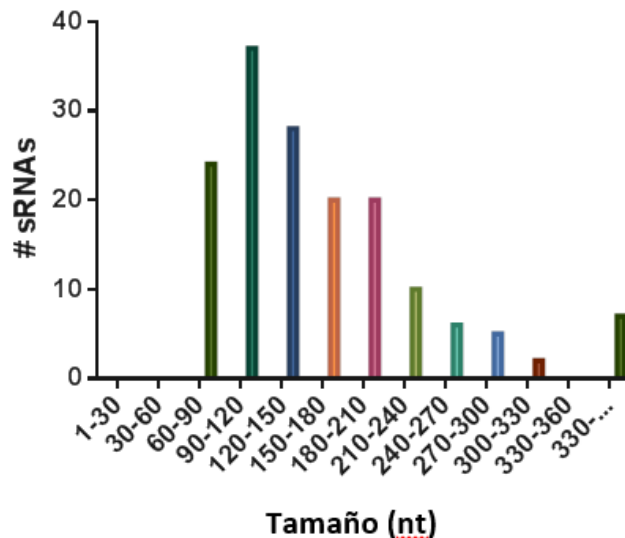


Figura 32R: Distribución por tamaño de los diversos sRNA detectados por RNAseq en diversas condiciones de aireación y estrés oxidativo.

Por otra parte, se analizó si los transcritos encontrados habían sido descritos anteriormente y, de ser así, a que funciones celulares se encontraban asociados. Se observó que la mayor parte de los sRNA detectados no han sido identificados al momento, por lo que se desconoce su función (Figura 33R). Entre aquellos con funciones descritas, se encontraron varios relacionados con procesos de traducción, estabilidad del RNA y el *turnover* ribosomal, así como en el metabolismo del hierro, como PrrF. Se analizó el contexto genómico en el cual se encuentran codificados algunos de los posibles sRNAs identificados (Figura 34R).

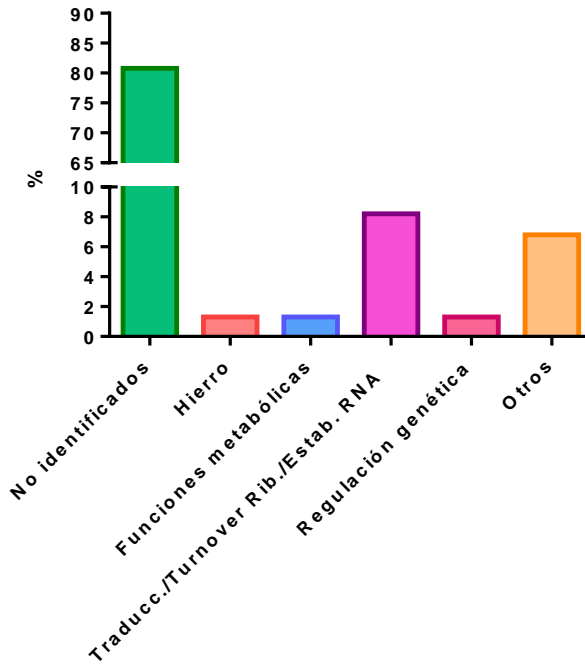


Figura 33R: Clasificación funcional de posibles sRNAs con expresión diferencial de acuerdo a condiciones de aireación y estrés oxidativo.

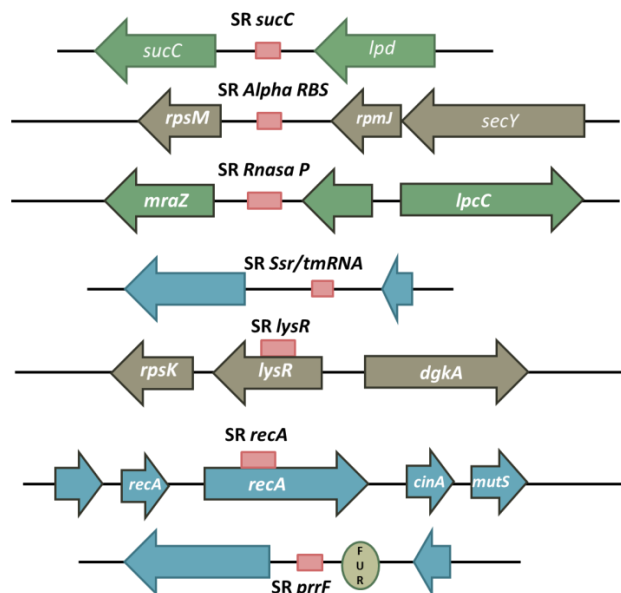


Figura 34R: Organización genómica de diversos sRNA detectados por RNAseq en *P. extremaustralis*. Los rectángulos indican posibles sRNA (SR), las flechas indican secuencias correspondientes a genes y los círculos posibles promotores.

Validación de sRNA detectados por RNAseq

Debido a que la predicción de sRNA que podrían estar actuando en diversas condiciones de aireación y estrés oxidativo se realizó en base a datos obtenidos por una técnica global, es necesario validar la entidad de estos pequeños sRNA y su presencia en la célula. La validación se efectuó mediante experimentos de *Northern blot* de 8 probables sRNA que presentaron expresión diferencial. Los resultados obtenidos, que se observan en la figura 35R, permiten determinar la presencia de los sRNA en las condiciones analizadas, su identidad de secuencia (debido a que se utilizaron sondas específicas) y su tamaño. La totalidad de los sRNA analizados presentaron un tamaño y patrón de expresión similar al observado por RNA-seq (Figura 35R).

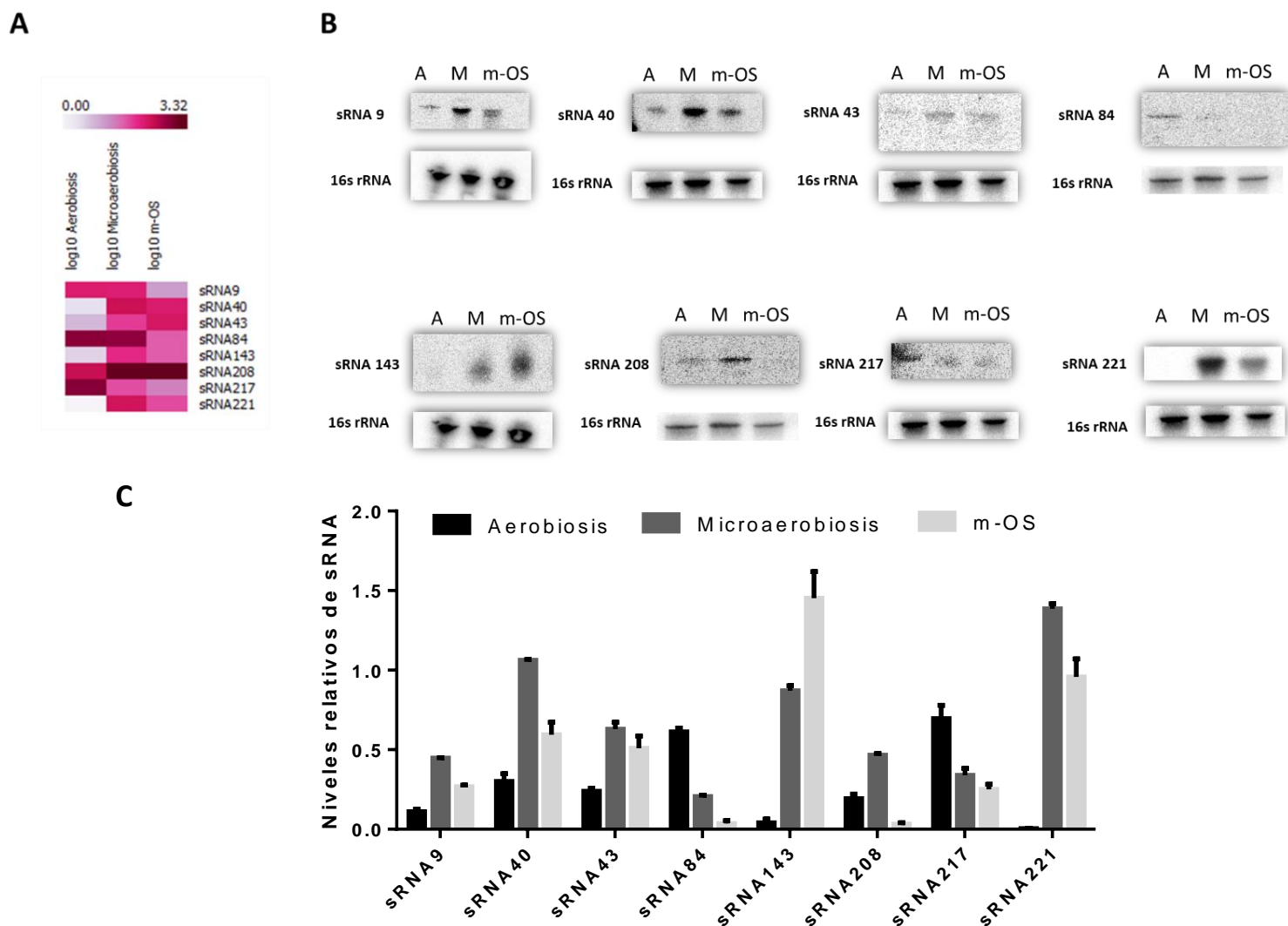


Figura 35R: **A.** Perfil de expresión de sRNA en aerobiosis (A), microaerobiosis (M) y m-OS. La escala de colores representa el \log_{10} de los niveles de expresión expresados como RPKM (*reads per kilo base per million mapped reads*) **B.** Expresión de sRNA en aerobiosis (A), microaerobiosis (M) y m-OS por *Northern blot*. Se utilizó una sonda correspondiente al gen del 16S rRNA como control de carga. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes para cada caso. **C.** Cuantificación de los niveles de expresión de sRNA a partir de datos de *Northern blot*. Los niveles de expresión de sRNA se encuentran relativizados a la expresión del rRNA 16S. Los valores representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

Rol del sRNA40 en la regulación genética de *P. extremaustralis*

Debido a que la regulación genética dada por sRNA es considerada como un tipo de regulación de *fine-tuning* o ajuste fino, el impacto de estas moléculas en la fisiología celular es más evidente en los casos de sobreexpresión. Esta estrategia es útil para determinar los blancos de regulación de los mismos y su rol en la fisiología celular (Podkaminski, Bouvier and Vogel, 2014). La combinación de estrategias de expresión pulsada de sRNA con técnicas de RNA-seq permiten identificar sistemáticamente sRNA que afectan los niveles celulares de mRNA blanco (Fröhlich *et al.*, 2016).

Con el objeto de analizar la funcionalidad de sRNA en el metabolismo microaeróbico y estrés oxidativo, se seleccionó al sRNA40 para realizar experimentos de sobre-expresión seguidos de RNA-seq. Este sRNA tiene una longitud de 276 pb y posee expresión diferencial en las condiciones analizadas, encontrándose sobre-expresado en condiciones de microaerobiosis respecto de aerobiosis y levemente reprimido en condiciones de m-OS respecto de microaerobiosis (Tabla 4R, Fig. 35R).

Tabla 4R: Niveles de expresión (expresados como RPKM) del sRNA40 en distintas condiciones de aireación y estrés oxidativo.

	Expresión (RPKM)		
	Aerobiosis	Microaerobiosis	m-OS
sRNA40	2,5	258,5	170

La secuencia codificante para este *trans* sRNA se encuentra ubicada entre las regiones correspondientes a los genes *livF* (región 5') y *hflK* (región 3') (Figura 36R). *livF* es el último gen del operón *livJHMGF*, que codifica un transportador del tipo ABC encargado del transporte de aminoácidos ramificados. En particular, *livF*, codifica una proteína de unión a ATP (Hosie and Poole, 2001). Por otra parte, el gen *hflK* codifica, junto con *hflC*, una proteasa. Adicionalmente, se encontraron posibles sitios de unión a los factores de transcripción Anr, ArgR y LexA río arriba del inicio de transcripción del sRNA40.

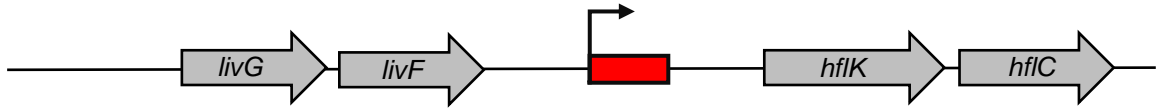


Figura 36R: Esquema de la región intergénica donde se encuentra codificado el sRNA40. En rojo se indica la posición de la región que codifica para el sRNA40. La flecha negra indica el inicio de transcripción. Las flechas grises indican direccionalidad y tamaño relativo de los genes flanqueantes.

El plegamiento de los sRNA en el espacio es fundamental para que puedan cumplir su función regulatoria, es por eso que analizamos la estructura secundaria del sRNA40 utilizando el programa RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). La posible estructura secundaria del sRNA se puede observar en la figura 37R.

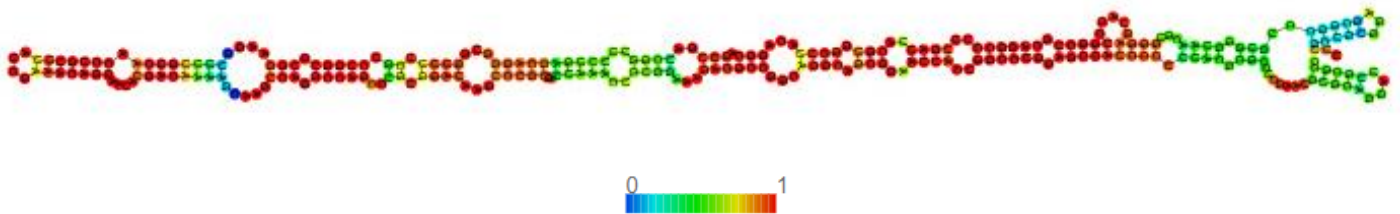


Figura 37R: Estructura secundaria del sRNA40. El modelado se realizó utilizando el programa *RNAfold* (*ViennaRNA web services*). La escala de colores representa la probabilidad de apareamiento de bases.

También se analizó si existía una conservación de esta región intergénica para intentar determinar si este sRNA, no descrito hasta el momento, se encuentra presente en otras especies de *Pseudomonas*. Esto se evaluó utilizando en primer lugar la herramienta bioinformática BLAST, la cual reveló que la secuencia perteneciente al sRNA40 se encuentra conservada en diversas especies de *Pseudomonas* (Figura 38R, se seleccionaron especies representativas que poseen entre el 75% y 95% de similitud en la secuencia intergénica). En todos los casos la secuencia codificante de este sRNA se encontró flanqueada en el extremo 5' por el gen *livF*, de manera análoga a lo observado en *P. extremaustralis*. Por el contrario, en la mayor parte de las especies analizadas, hacia el extremo 3' se encuentra el gen *ydfG*, que codifica una oxidorreductasa. En *P. extremaustralis*, existe una inserción río abajo del sRNA40, ya que el gen *ydfG* se encuentra por detrás del operón *hflKC* y de una secuencia que codifica una proteína hipotética (Figura 38R).

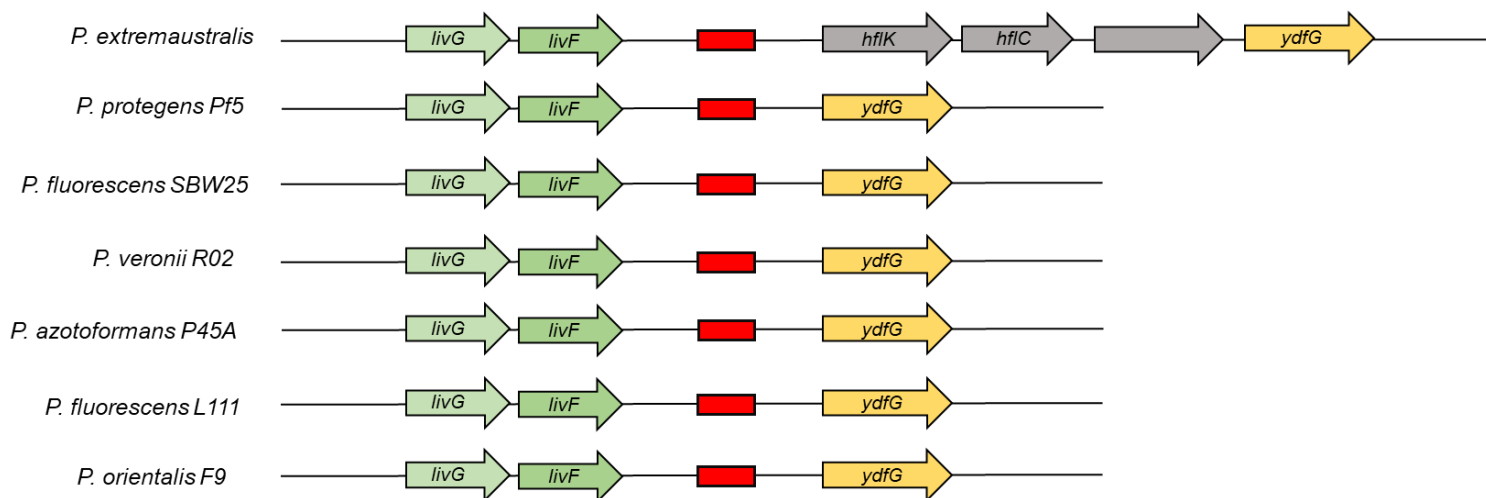


Figura 38R: Organización genómica la región intergénica donde se encuentra codificado el sRNA40 en *P. extremaustralis* y otras especies de *Pseudomonas*. Las flechas indican dirección y tamaño relativo de los genes. Los rectángulos rojos indican las regiones que codifican el sRNA40.

Los mecanismos moleculares de acción de los sRNA dependen tanto de la secuencia como la estructura que adoptan estas moléculas en el espacio ya que esta determina la interacción con las moléculas de mRNA blanco (Lagares Jr and Valverde, 2018). Debido a esto, se analizó si existía, además de una conservación de secuencia, una conservación de estructura entre estas regiones intergénicas. Para eso se seleccionaron 15 especies en las cuales se encontraba conservada la secuencia del sRNA40, las cuales se analizaron utilizando el programa SCA (**Structure Conservation Analysis server**, <http://rna.tbi.univie.ac.at>). Este programa analiza alineamientos de secuencias de RNA para encontrar estructuras secundarias conservadas (Gruber, Bernhart and Lorenz, 2015). Las secuencias correspondientes al sRNA40 de las distintas especies se alinearon utilizando el programa ClustalO (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). El valor de SCI (**Structural Conservation Index**) obtenido a partir de este análisis fue de 3,859 (donde un valor mayor a 1 indica conservación estructural), indicando que existe una conservación de estructura secundaria entre las secuencias intergénicas correspondientes al sRNA40 en las especies de *Pseudomonas* analizadas en comparación con *P. extremaustralis*.

Predicción *in silico* del regulón del sRNA40

Como paso inicial en el análisis del rol del sRNA40 en la regulación genética de *P. extremaustralis* se realizó una predicción *in silico* de los posibles blancos del mismo, utilizando el programa IntaRNA (Mann, Wright and Backofen, 2017). El algoritmo utilizado por este programa permite identificar los 100 genes que mayor probabilidad de interacción poseen con el RNA no codificante, medida como ΔG , y que región está más implicada en la interacción.

Los resultados obtenidos muestran que la región del sRNA40 más favorecida para la interacción con sus posibles blancos corresponde a los primeros 120 nucleótidos de la molécula (Figura 39R A), siendo la más implicada la región comprendida entre los nucleótidos 70 y 95. El modelado de esta región se puede observar con mayor detalle en la figura 39R B, donde se pueden ver diversas estructuras tipo bucle o *loop*, que podrían estar involucradas en la interacción sRNA-mRNA. Si bien esta estructura se encuentra bastante plegada es rica en nucleótidos uracilo y adenina, lo que hace que la fuerza de interacción sea más débil y la estructura pueda abrirse para favorecer la interacción del sRNA con sus posibles blancos.

Entre los posibles blancos del sRNA40 encontramos algunos genes relacionados con el metabolismo del carbono como *icd* (codifica una isocitrato deshidrogenasa), *accC* (acetil-CoA carboxilasa) y *davT* (4-aminobutirato aminotransferasa). También se observaron algunos componentes de transportadores y sistemas de secreción como *argT*, *afuA*, *yscC* y *gspG*.

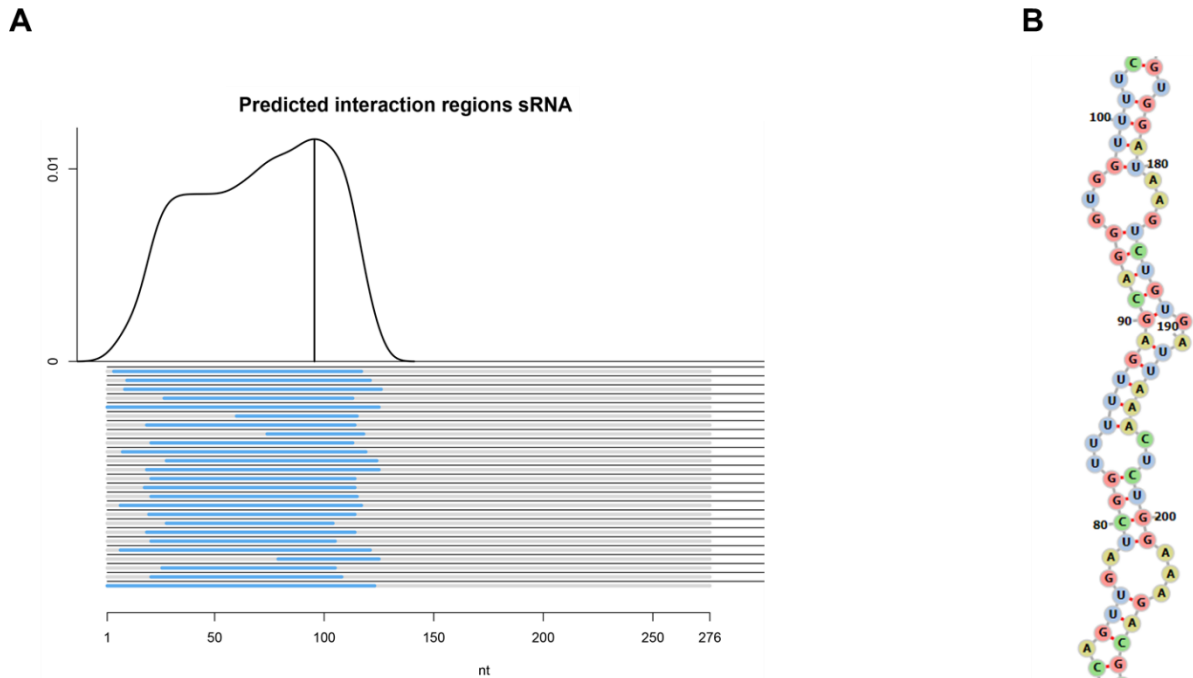


Figura 39R: **A.** Predicción de las regiones de interacción del sRNA40. Se grafica las regiones de interacción del sRNA con sus blancos más probables. **B.** Detalle de la región 75-100 nt del sRNA40.

Expresión pulsada del sRNA40 seguido de RNA-seq

Para intentar elucidar de manera experimental los blancos de regulación del sRNA40 se utilizó una estrategia de sobre-expresión seguida de un análisis transcriptómico. Se construyó la cepa *P. extremaustralis* / pBAD18-sRNA40, que posee el plásmido pBAD18 en el que se clonó la secuencia codificante del sRNA40 bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. La construcción se verificó por PCR y por secuenciación previamente a ser introducida en *P. extremaustralis* por electroporación. Adicionalmente se transformó *P. extremaustralis* con el plásmido pBAD vacío (cepa *P. extremaustralis* / pBAD18) para utilizar como control en los diversos experimentos.

En primer lugar, se verificó la inducción de la expresión del sRNA40 en la cepa pBAD18-sRNA40 y la cepa control por *Northern blot*. Los experimentos se realizaron luego de 5 y 10 min de exposición a arabinosa 0,1% en cultivos crecidos en condiciones de microaerobiosis. Se verificó la inducción de la expresión a ambos tiempos, siendo los niveles de expresión mayores luego de 10 min de exposición a arabinosa. Por este motivo se seleccionó este tiempo de inducción para experimentos posteriores. En la cepa control no se observó expresión del sRNA40 (Figura 40R).

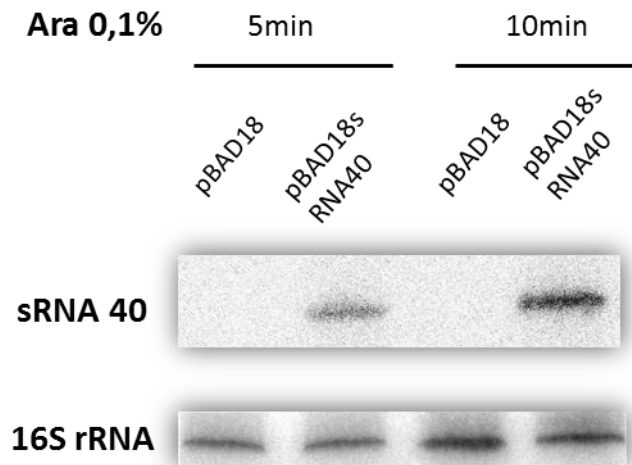


Figura 40R: Expresión del sRNA40 luego de 5 y 10 minutos de inducción (arabinosa 0,1%) para las cepas *P. extremaustralis* / pBAD18 y *P. extremaustralis* / pBAD18-sRNA40 por *Northern blot*. Se utilizó una sonda correspondiente al 16S rRNA como control de carga. El tiempo de exposición de las membranas fue menor que el utilizado en los ensayos de validación, por lo cual no se observa la expresión del sRNA40 en el caso de la cepa control. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes para cada caso.

Adicionalmente se realizaron curvas de crecimiento en presencia y ausencia de arabinosa para las cepas pBAD18-sRNA40 y control para determinar si la sobre-expresión del sRNA40 tenía algún efecto sobre el crecimiento de *P. extremaustralis*. El agregado de arabinosa 0,1% no alteró sustancialmente el crecimiento de *P. extremaustralis* (Figura 41R).

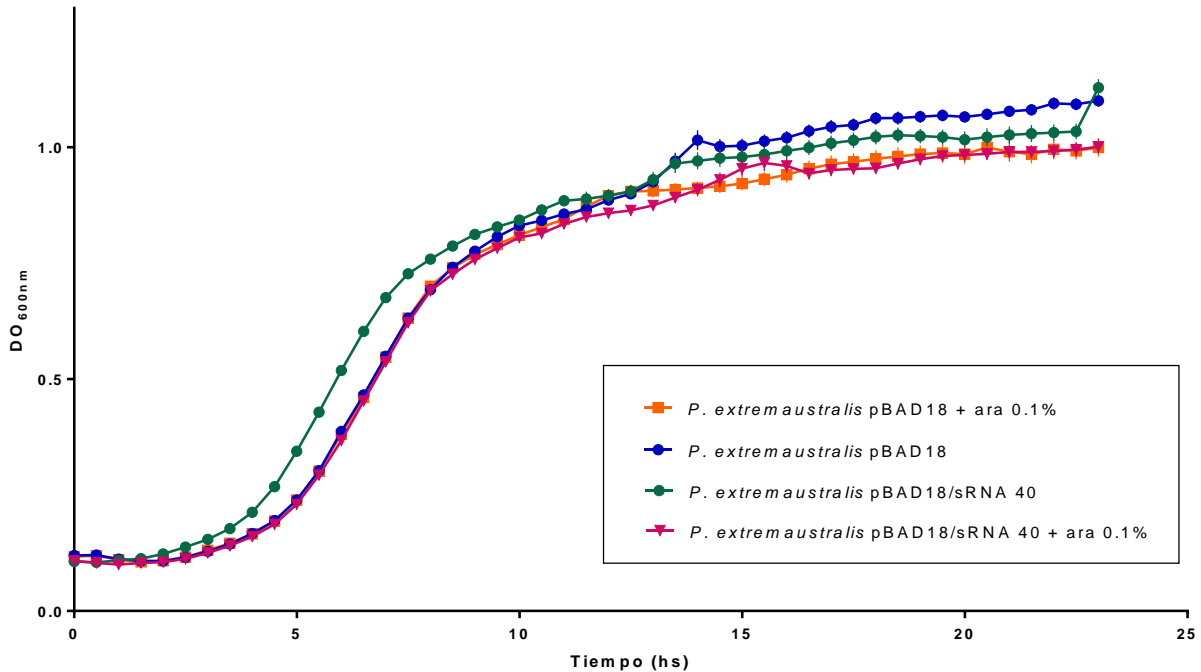


Figura 41R: Curvas de crecimiento en microaerobiosis a 28°C en presencia o ausencia de arabinosa 0,1% en *P. extremaustralis*. Se grafica la variación de DO_{600nm} en función del tiempo. Los valores representan media ± SD de 6 experimentos independientes

El análisis transcriptómico mostró 19 genes con expresión diferencial entre ambos tratamientos, sugiriendo que el sRNA40 afecta un grupo reducido de genes específicos. Entre los genes con expresión diferencial, la mayoría se encontraron sobre-expresados luego de la inducción de la expresión del sRNA (14 genes sobre-expresados vs. 5 reprimidos). La interacción entre el sRNA40 y los mRNA correspondientes a estos 19 genes se modeló utilizando el programa IntaRNA, obteniéndose en todos los casos valores de ΔG negativos, es decir que las interacciones se encuentran energéticamente favorecidas (Tabla 5R).

Tabla 5R: Genes con expresión diferencial luego de inducción de la expresión del sRNA40. Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Locus tag	Función	Categoría	FC	ΔG interacción (kcal/mol)
PE143B_0110040	Sistema general de secreción (<i>gspH</i>)	Canales/Transportadores	342,50	-16,84
PE143B_0110060	Sistema general de secreción (<i>gspK</i>)		2,52	-24,53
PE143B_0110070	Sistema general de secreción (<i>gspM</i>)		3,52	-12,55
PE143B_0111655	Transportador del tipo ABC-type Fe ³⁺		-3,04	-24,98
PE143B_0113375	Sistema de transporte TRAP		2,64	-17,34
PE143B_0115050	ATPasa de transportador de potasio (cadena C)		3,17	-18,04
PE143B_0119700	Efactor de sistema de secreción tipo 3		7,27	-12,22
PE143B_0123410	RspO		4,11	-14,35
PE143B_0123415	RspP		15,38	-12,76
PE143B_0123430	RscS		-3,01	-13,88
-	Proteína hipotética	Hipotéticas	-2,82	
-	Proteína hipotética		-2,65	
-	Proteína hipotética		2,41	
PE143B_0121535	Proteína hipotética		2,99	-20,18
PE143B_0101275	Regulador transcripcional	Varias	1,81	-18,03
PE143B_0108770	CspA		2,53	-11,42
-	FliH		3,35	
PE143B_0106695	Deacetilasa de polisacáridos		1,90	-25,30
PE143B_0103615	Rubredoxina (HoxR)		-2,84	-12,03

La clasificación funcional de estos transcritos mostró que muchos de los mismos corresponden a genes pertenecientes a componentes de transportadores y sistemas de secreción (Figura 42R).

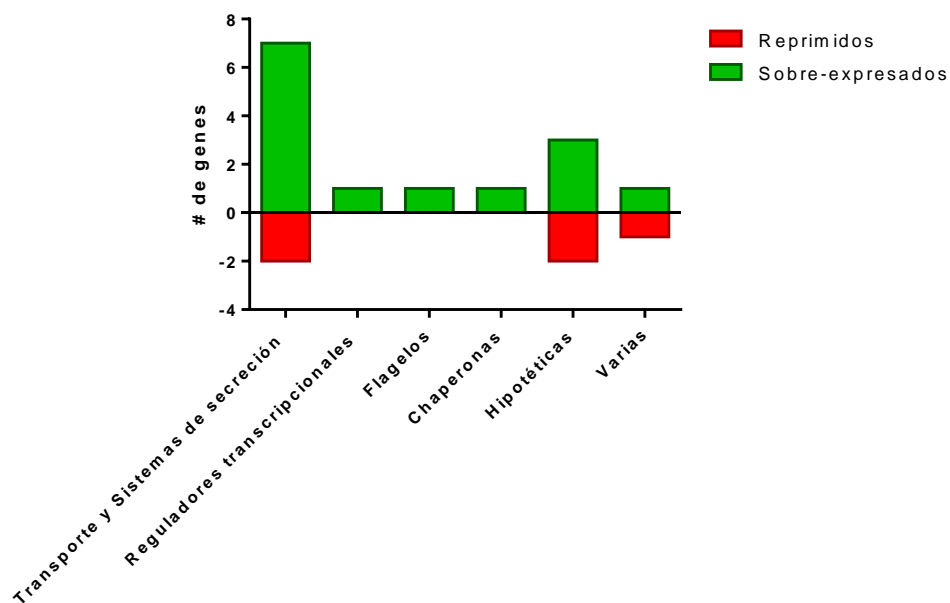


Figura 42R: Clasificación en categorías funcionales de genes con expresión diferencial antes luego de la inducción de la expresión del sRNA 40 ($P < 0,05$ y $Q < 0,05$). Las barras verdes y rojas representan genes sobre-expresados y reprimidos, respectivamente.

Análisis de la respuesta a la sobre-expresión del sRNA40

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos por RNAseq permitieron detectar diversos transcritos que modifican su expresión como respuesta a una inducción del sRNA40, la mayoría de ellos relacionados con el transporte transmembrana.

El análisis de las redes de interacción de los transcritos expresados diferencialmente mostró que algunos se encuentran relacionados entre sí, ya sea por organización genómica, co-expresión o interacción de las proteínas que codifican (Figura 43R). Adicionalmente, mediante el análisis transcriptómico se pudo determinar que algunos de estos genes pertenecen a unidades transcripcionales u operones, entre ellos *gspH*, *gspK* y *gspM* y *rspP*, *rspO* y *rscS*.

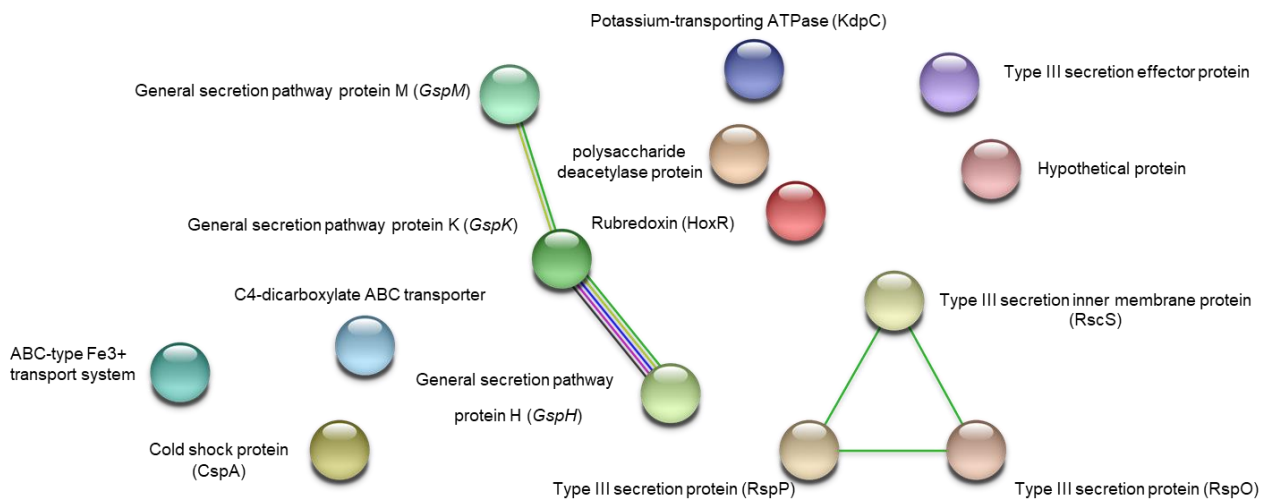


Figura 43R: Redes de interacciones para genes con expresión diferencial. Redes de interacciones generadas por el programa STRING. Cada círculo representa un gen. Las líneas representan las relaciones entre los genes y/o sus productos proteicos.

Los genes *gspH*, *gspM* y *gspK* codifican proteínas de un sistema general de secreción que corresponde a un sistema de secreción tipo II (T2SS) (Figura 44R). Este tipo de sistemas de secreción suele relacionarse con el transporte de toxinas y de enzimas degradadoras (lipasas, proteasas, etc.) desde el interior de la célula hacia el medio extracelular. Asimismo, se ha reportado que las proteínas del sistema general de secreción pueden formar *pseudopilus* que no se extienden hacia el exterior de la célula pero que podría ayudar a movilizar a las proteínas que deben ser secretadas (Zhang *et al.*, 2018).

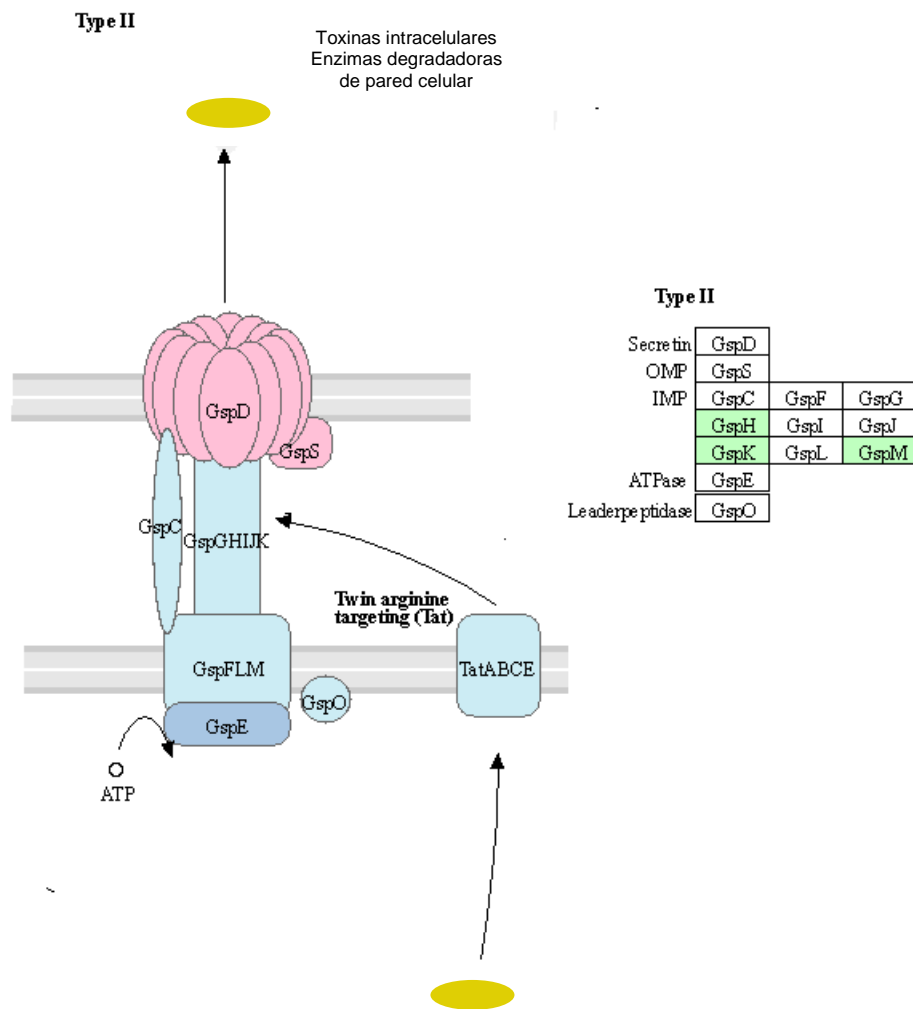


Figura 44R: Sistema de secreción tipo II (T2SS) Esquema general de la estructura del sistema general de secreción en *P. extremaustralis*. Los genes que presentan expresión diferencial luego de la sobre-expresión del sRNA40 se encuentran coloreados en verde (Figura tomada de la base de datos KEGG).

También se encontraron sobre-expresados luego de la inducción del sRNA40 diversos componentes del sistema de secreción tipo III (T3SS), tales como *rspO* y *rspP* (también conocidos como *hrpP* y *hrpO*). En las bacterias patógenas (tanto vegetales como animales), la estructura en forma de aguja del T3SS cumple la función de detectar la presencia de organismos hospedadores y secretar proteínas para infectarlos. Estas proteínas efectoras ayudan al patógeno a sobrevivir y escapar de la respuesta inmune (Galle, Carpentier and Beyaert, 2012). Cabe destacar que *rscS*, se encontró reprimido luego

de la inducción del sRNA40. *P. extremaustralis* no es una especie patógena vegetal ni animal, por lo que el papel que juega la expresión de este sistema de secreción queda por ser elucidado.

Resumen de resultados relevantes del capítulo

En el presente capítulo se analizó la presencia y funcionalidad de sRNA involucrados en la respuesta a diferentes condiciones de aireación y estrés oxidativo, los cuales se identificaron a partir de experimentos de RNAseq, observándose diversos transcritos con expresión diferencial. La identidad, tamaño y perfil de expresión de algunos de ellos fue verificada experimentalmente.

La mayor parte de los sRNA no han sido identificados hasta el momento y no se conocen sus blancos ni mecanismos de acción. Sin embargo, se identificaron sRNA involucrados en la homeostasis del hierro (PrrF) y en el metabolismo del succinato (*sucC*). Adicionalmente, pudimos observar transcritos antisentido correspondientes a *recA* y *lysR*.

Por último, se investigó el rol del sRNA40 en la respuesta genética a la baja aireación. La estrategia de sobre-expresión seguida de secuenciación masiva de RNA utilizada permitió identificar posibles blancos de regulación de este nuevo sRNA. De acuerdo con los resultados obtenidos, el sRNA40 podría estar afectando la regulación de mecanismos de secreción como T2SS y T3SS.

CAPÍTULO 4

*Análisis de la exposición a especies reactivas de
nitrógeno RNS*

CAPÍTULO 4

Análisis de la exposición a especies reactivas de nitrógeno RNS

Cuando la disponibilidad de oxígeno es baja o nula, muchas especies del género *Pseudomonas* son capaces de obtener energía mediante la fermentación de arginina o piruvato o la reducción del nitrato (NO_3^-) en la respiración anaeróbica (Arai, 2011). De esta última pueden derivar especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico (NO) y sus derivados peroxinitrito (ONOO^-), nitrosotioles (de la reacción con grupos tiol) y nitrotirosina, de la nitración de tirosina por parte de NO, ONOO^- o NO_2^- (Crack, Thomson and Brun, 2014; Czaja, 2017; Tharmalingam *et al.*, 2017). El proceso de desnitrificación en *P. extremaustralis* es incompleto, ya que esta especie no posee la mayoría de los genes correspondientes al operón *nir* que codifica las enzimas encargadas de catalizar la conversión de NO_2^- a NO, uno de los pasos secuenciales de la desnitrificación (Tribelli, 2011; Raiger lustman *et al.*, 2015). Curiosamente, todos los genes *nor* relacionados con la reducción de óxido nítrico están presentes en el genoma de *P. extremaustralis*, así como la vía completa de reducción de óxido nitroso codificada por los genes *nos* (Raiger lustman *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta la importancia que pueden tener las RNS y sus derivados provenientes de la respiración anaeróbica, combinados con aquellos que puedan surgir por reacciones cruzadas en el ambiente a partir de la acumulación de nitrito, nos propusimos evaluar el efecto del estrés nitrosativo en el crecimiento microaeróbico de *P. extremaustralis*.

Para inducir la respuesta a estrés nitrosativo se empleó el compuesto S-nitrosoglutation (GSNO) como dador de NO, uno de los principales compuestos nitrosilantes (Poole, 2005). En primer lugar, se analizó el crecimiento de *P. extremaustralis* utilizando diversas concentraciones de GSNO (Sigma-Aldrich) como agente causante de estrés. La densidad óptica se monitoreó a lo largo de 23 h, a intervalos de 30 min, utilizando un lector automatizado de placas. La adición de GSNO no generó cambios en la velocidad de crecimiento de las células a concentraciones de 1 y 10 μM con respecto al control, sin embargo, cuando la concentración de GSNO fue igual a 100 μM se observó una caída en el crecimiento luego de 16 h de cultivo (Anova de 2 factores, múltiples comparaciones, $P < 0,05$,) (Figura 45R).

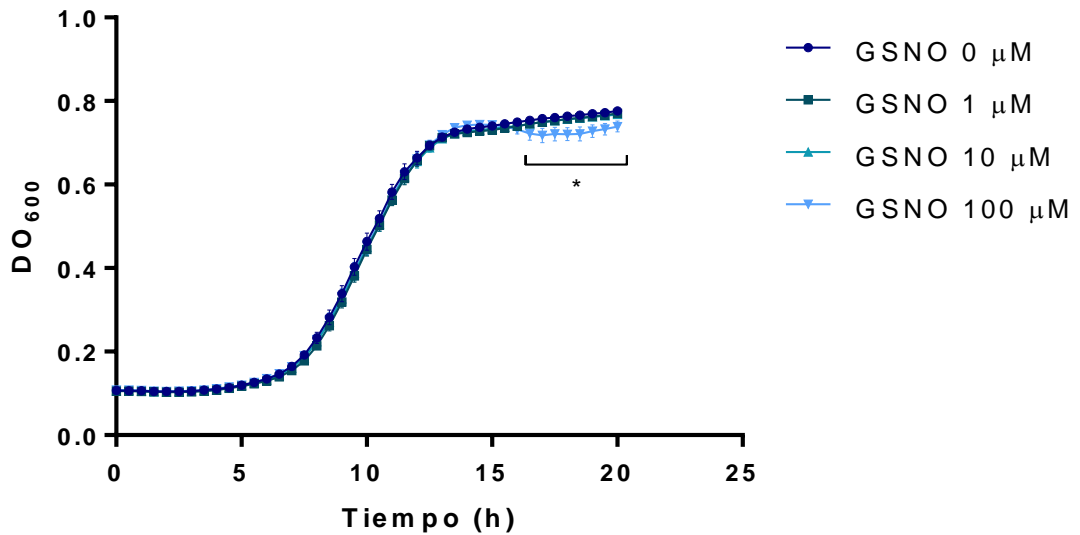


Figura 45R: Curvas de crecimiento de *P. extremaustralis* en microaerobiosis con distintas concentraciones de GSNO. Los valores representan media \pm SD de 6 experimentos independientes.

Por otra parte, se evaluó la tolerancia a GSNO en distintas condiciones de aireación, realizando recuentos de células viables en placa. En aerobiosis se pudo observar una leve disminución en la viabilidad celular luego de la adición de GSNO, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. En condiciones de microaerobiosis, en cambio, la supervivencia cayó cerca del 60 %, 70 % y 75 % luego de una hora de exposición al agente estresante en concentraciones de 1 μM , 10 μM y 100 μM , respectivamente (Figura 46R). Estos resultados indican que en microaerobiosis, si bien el crecimiento general no se vio afectado, el tratamiento supone una condición estresante para las células afectando negativamente su supervivencia. Cabe destacar que, de manera similar a lo observado para la exposición a H_2O_2 , la adición de GSNO provocó una mayor caída de la supervivencia en microaerobiosis que en aerobiosis.

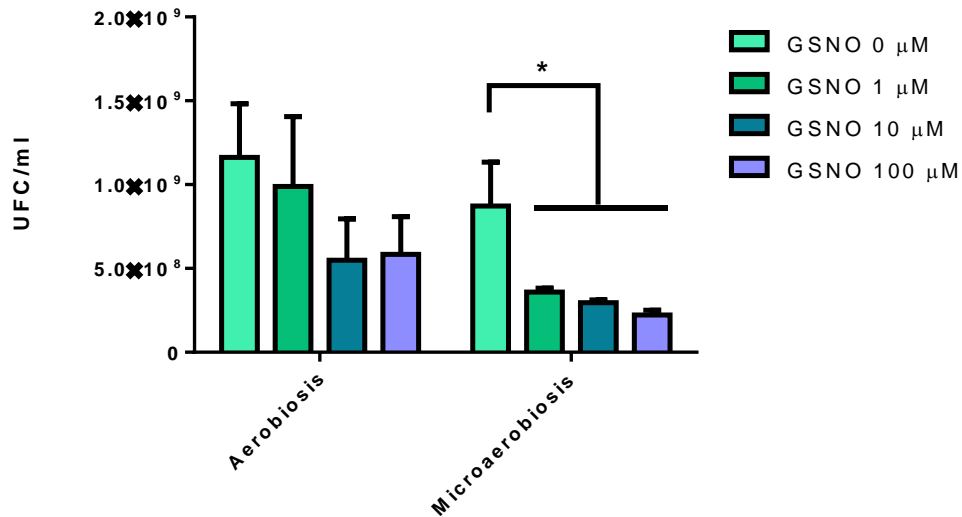


Figura 46R: Supervivencia a diversas concentraciones de GSNO en aerobiosis y microaerobiosis. Los valores representan media \pm SD de 4 experimentos independientes.

Análisis transcriptómico de *P. extremaustralis* en condiciones de baja aireación y estrés nitrosativo.

Para analizar la respuesta a estrés nitrosativo a bajas tensiones de O₂ se obtuvieron datos de transcriptómica por secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq), comparando cultivos de 24h en condiciones microaeróbicas con o sin exposición a GSNO 100 μM durante una hora (condiciones M y m-NS, respectivamente). La concentración y el tiempo de exposición fueron seleccionados en base a los análisis mostrados anteriormente.

Para proceder al análisis de los resultados en primer lugar se verificó la concordancia entre las dos réplicas biológicas secuenciadas para cada una de las condiciones analizadas M y m-NS (Figura 47R). Las réplicas correspondientes a ambas condiciones mostraron buena correlación, con coeficientes de *Spearman* (*r*) de 0,9563 y 0,9734, respectivamente.

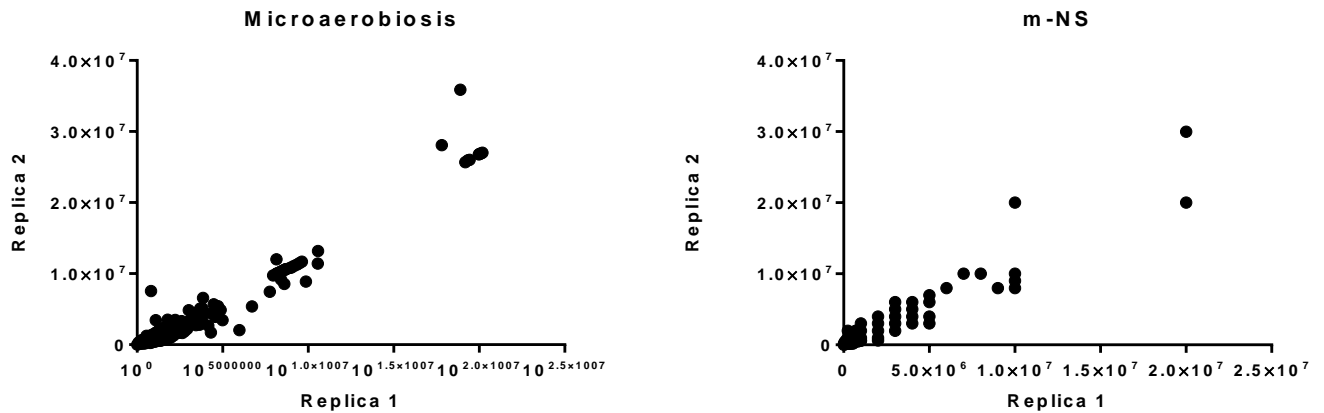


Figura 47R: Análisis de correlación de *Spearman* para lecturas normalizadas de dos réplicas biológicas. A: Condición de microaerobiosis B: Condición de microaerobiosis con agregado de GSNO 100mM (m-NS).

El análisis de los datos obtenidos mostró que 249 transcritos presentaron expresión diferencial en m-NS en comparación con microaerobiosis con relevancia estadística ($P < 0,05$, $Q < 0,05$). Entre ellos, 86 genes se encontraron reprimidos y 163 sobre-expresados, lo que representa un 1,4% y 2,7% del total, respectivamente (Tabla 10A – Anexo), mientras que el resto de los genes permaneció sin cambios significativos (Figura 48R).

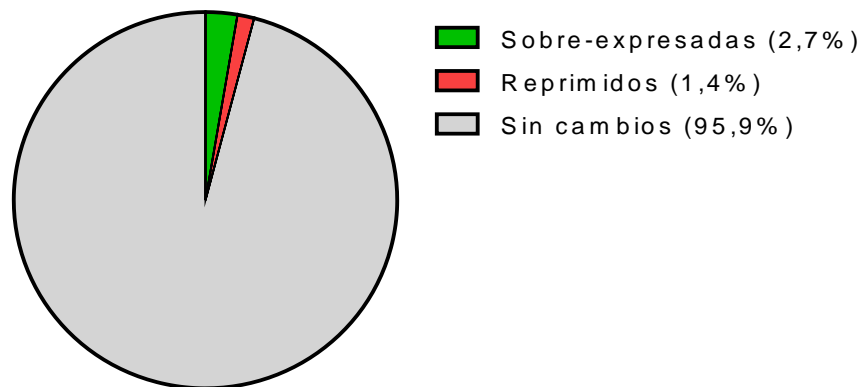


Figura 48R: Distribución porcentual de genes con expresión diferencial luego de la exposición a GSNO.

Los genes con expresión diferencial se clasificaron según su función utilizando las herramientas Metacyc, Biocyc y KEGG (Figura 49R). Como se ha podido observar en los análisis globales realizados anteriormente, la mayor parte de los genes con expresión diferencial no poseen funciones asociadas definidas, clasificándose como “hipotéticos”, lo que pone evidencia la presencia de una gran cantidad de funciones por descubrir en el genoma de *P. extremaustralis*. En este caso, este tipo de transcritos representaron el 11,6% y el 21% de los genes expresados diferencialmente (sobre-expresados y reprimidos, respectivamente sobre el total de genes con expresión diferencial).

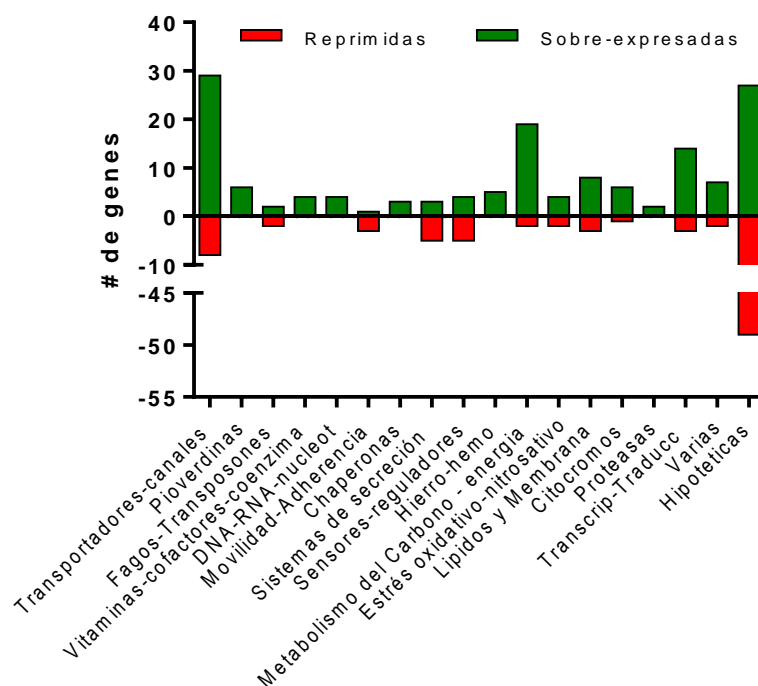


Figura 49R: Clasificación en categorías funcionales de genes con expresión diferencial (m-NS vs. Microaerobiosis, $P < 0,05$ y $Q < 0,05$). Las barras verdes y rojas representan genes sobre-expresados y reprimidos, respectivamente.

Análisis de la respuesta fisiológica al estrés nitrosativo en *P. extremaustralis*

A partir de las funciones bioquímicas que responden a la exposición a GSNO, se procedió a analizar en mayor profundidad 5 grupos relevantes de genes que presentaron expresión diferencial y que resultaron de interés. Se seleccionaron para ello los genes relacionados con la transcripción y

traducción, con el transporte y biosíntesis de aminoácidos, con la resistencia a estrés, con el flujo de carbono y con el metabolismo del hierro.

Resistencia a estrés

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos poseen una amplia batería de defensas para hacer frente al estrés nitro-oxidativo. Debido a que el GSNO es un agente liberador de NO, y que este a altas concentraciones puede resultar perjudicial para las células, analizamos si su agregado provocó cambios en la expresión de enzimas relacionadas con la detoxificación de RNS.

El agregado del compuesto provocó un aumento en la expresión de genes codificantes para distintas enzimas detoxificadoras de RNS como una superóxido dismutasa dependiente de hierro (PE143B_0125285) y una alquil hidroperóxido reductasa (*ahpC*, PE143B_0111245). Se detectó también, un aumento de la expresión del mRNA de una tiorredoxina (PE143B_0111145). Adicionalmente, se detectaron dos enzimas del tipo glutatión S-transferasas, encontrándose una sobre-expresada y una inhibida en m-NS (PE143B_0109905 y PE143B_0100180, respectivamente). Sin embargo, llama la atención que *hbO* (PE143B_0110705), una hemoglobina típicamente relacionada con la resistencia a estrés nitrosativo, resultara reprimida en estas condiciones.

Transcripción y traducción

En respuesta al agregado de GSNO se observó un enriquecimiento en transcritos relacionados con la transcripción y traducción, que indicarían un aumento en la síntesis proteica. En primer lugar, se observó una represión de casi dos veces en un inhibidor de la transcripción, lo que podría derivar en su aumento. Esto se ve respaldado por la observación de una mayor cantidad de transcritos sobre-expresados que reprimidos. Entre los que presentaron expresión diferencial, podemos observar un aumento en los genes que codifican proteínas ribosomales (Figura 50R). Además, cabe destacar un aumento en la presencia de transcritos relacionados con la biosíntesis de purinas y pirimidinas. Las purinas y pirimidinas forman parte de los nucleótidos y un aumento en las enzimas de las vías metabólicas de las mismas podrían responder a una mayor necesidad de nucleótidos provocados por un aumento de la transcripción.

A su vez, se vió aumentada la expresión de *gltI* y *gltJ*, que codifican un transportador de glutamato y aspartato, que permiten la entrada de ambos compuestos al medio intracelular. Con relación a esto también se observó un aumento de la expresión en los genes *aspB* y *glnA*, cuyos productos participan en la interconversión de glutamina a glutamato.

Metabolismo del carbono

Diversos genes involucrados con el metabolismo central presentaron expresión diferencial en condiciones de estrés nitrosativo. Entre ellos, se encontraron sobre-expresados en m-NS en comparación a microaerobiosis, algunos relacionados con el metabolismo del piruvato y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), como los que codifican la acetil-CoA carboxilasa (PE143B_0105625), la fumarato hidratasa (PE143B_0119840) y la malato deshidrogenasa (PE143B_0104565).

Por otra parte, se encontró que genes pertenecientes al metabolismo del inositol resultaron sobre-expresados luego de la exposición a GSNO. El inositol es un polialcohol derivado del ciclohexano. Debido a su estructura existen diversos estereoisómeros de este compuesto, siendo el más común en la naturaleza el mioinositol. El rol de este compuesto ha sido principalmente descrito en relación a las interacciones planta-bacteria por ser un compuesto presente en la rizósfera (Kohler, Choong and Rossbach, 2011). El catabolismo del inositol comprende varios pasos en los que se encuentran involucradas las enzimas *iolA*, *iolB*, *iolC*, *iolD*, *iolE*, *iolG* e *iolJ*. Sin embargo, los genes que codifican las enzimas del catabolismo del inositol se encuentran ausentes en la mayoría de las especies de *Pseudomonas* (incluyendo *P. aeruginosa* y *P. putida*) pudiéndose encontrar en especies como *P. protegens* y *P. fluorescens*. *P. extremaustralis* posee los genes de esta vía metabólica *iolB*, *iolC*, *iolD*, *iolE* y dos copias de *iolG* (Figura 51R A). Río arriba de este *cluster* se encuentra un gen que codifica un regulador transcripcional del metabolismo del mioinositol, mientras que río abajo se ubican tres genes que codifican proteínas pertenecientes a un sistema de transporte de este compuesto (Figura 51R). Notablemente *iolJ*, cuyo producto enzimático está encargado de la conversión de 2-deoxi-5-ceto-D-gluconato-6-fosfato (DKGP) a semialdehído malónico no se encuentra presente en el genoma de *P. extremaustralis* ni en otras especies de *Pseudomonas* analizadas (entre ellas *P. fluorescens* y *P. protegens*). En relación a esta vía metabólica, se observó un aumento en la abundancia de transcritos correspondientes a *iatA*, que codifica uno de los componentes del sistema de transporte del inositol. Esto podría provocar un aumento de la entrada de este compuesto del medio extracelular al interior del microorganismo. Cabe aclarar que, si bien no presentaron diferencias significativas en su abundancia luego de la adición de GSNO con respecto al control, los genes *iatP* y *ibpA* se expresan en estas condiciones. Sumado a esto, el regulador transcripcional del operón catabólico del mioinositol

(PE143B_0113035) presentó una sobre-expresión de 2,66 veces en condiciones m-NS. Esto concuerda con el aumento transcripcional observado en varios de los genes involucrados en la degradación del inositol, entre ellos *ioIE*, *ioIB*, *ioID* e *ioIG* (Figura 51R y Figura 52R). *ioIC*, por otra parte, no presentó diferencias significativas, sin embargo, se detectó presencia del mRNA correspondiente. Como ya se mencionó, *ioIJ*, que completa la vía degradativa hacia Acetil-CoA, para su posterior entrada en la vía del TCA, no se encuentra presente en el genoma de *P. extremaustralis*.

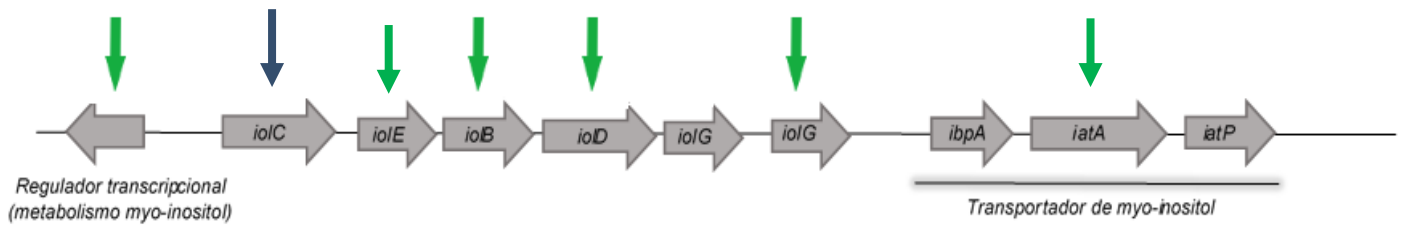


Figura 51R: Organización genómica de los genes involucrados en el metabolismo del mioinositol en *P. extremaustralis*. Las flechas indican dirección y tamaño relativo de los genes. Las flechas verdes indican genes que se encontraron sobre-expresados en m-NS y la azul indica que el gen se encuentra expresado en m-NS, pero su expresión no presentó diferencias significativas con respecto a microaerobiosis

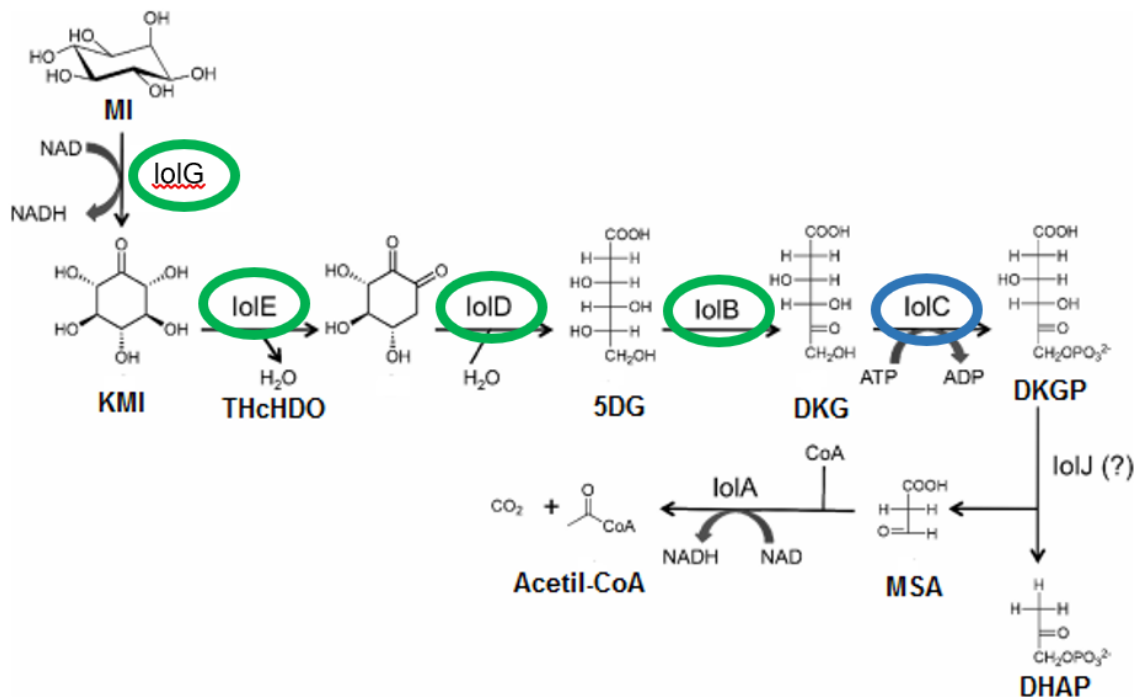


Figura 52R: Catabolismo del mioinositol. Las enzimas marcadas en verde corresponden a aquellas en las que se detectó la sobre-expresión del gen en condiciones m-NS, mientras que el gen correspondiente a la enzima marcada en azul se encuentra expresado en m-NS, pero su expresión no presentó diferencias significativas con respecto a microaerobiosis. Imagen modificada de Kohler, Zheng, Schoffers, & Rossbach, 2010. **MI:** mioinositol **KMI:** 2-ceto-mio-inositol **THcHDO:** 3D-(3,4/5) trihidroxíciclohexano-1,2-diona **5DG:** ácido 5-deoxiglucurónico **DKG:** ácido 2-deoxi-5-ceto-d-glucurónico **DKGP:** ácido 6-fosfato 2-deoxi-5-ceto-d-glucurónico **DHAP:** dihidroxiacetona fosfato **MSA:** semialdehído malónico

Metabolismo del hierro

El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los organismos vivos, ya que se encuentra en un gran número de proteínas en forma de grupo prostético, generalmente como parte de núcleos de hierro mononucleares o binucleares, en *clusters* de Fe-S o integrando grupos hemo (Andrews, Robinson and Rodríguez-Quñones, 2003; Frawley and Fang, 2014). Sin embargo, el requerimiento metabólico de este compuesto resulta problemático ya que su biodisponibilidad es baja (a pH neutro es poco soluble) y a concentraciones altas resulta tóxico, por lo que las bacterias han desarrollado varios mecanismos para contrarrestar estas dificultades, lo que les permite lograr una homeostasis efectiva de este metal.

Luego de la exposición a GSNO, *P. extremaustralis* mostró un aumento en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de pioverdinas (PVDs). Las PVDs son péptidos no ribosomales sintetizados por bacterias del género *Pseudomonas* que poseen actividad de sideróforo (quelantes de hierro involucrados en el transporte de este a la célula). Estos compuestos suelen ser sintetizados y secretados al medio extracelular cuando las células detectan que los niveles intracelulares de hierro son bajos.

P. extremaustralis posee 33 genes asociados a la producción de este compuesto, situados en distintas regiones del genoma (Ibarra, 2017). Entre ellos encontramos 6 sobre-expresados en condiciones m-NS: *pvdF*, *pvdE* y *fpvA*, localizados en una región genómica que contiene otros 3 genes que no sufrieron cambios (Figura 53R); *pvdA* y *fpvK* y *fpvE*.

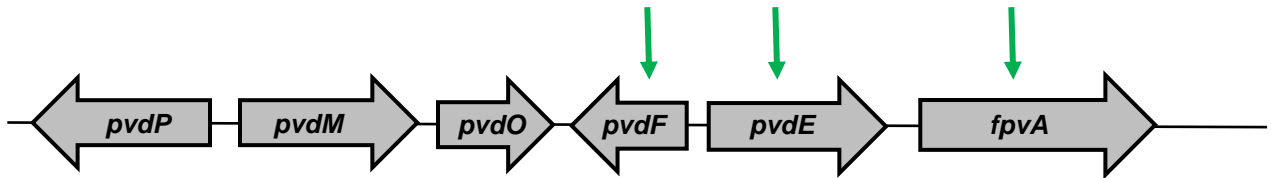


Figura 53R: Organización genómica de algunos de los genes relacionados con la producción de pioverdinas de *P. extremaustralis*. Las flechas indican dirección y tamaño relativo de los genes. Las flechas verdes indican aquellos genes que se encontraron sobre-expresados en m-NS

Los genes *fpv* codifican proteínas de la membrana que reconocen a los complejos pioverdina-hierro (PVD-Fe) y los internalizan (Ringel and Brüser, 2018). Se ha descrito que el ingreso de PVD requiere la interacción de las proteínas Fpv con el complejo TonB-ExbBD, que proporcionaría la energía necesaria para el transporte. Notoriamente los genes *tonB* y *exbD* se encontraron reprimidos en condiciones m-NS.

También en relación con el metabolismo del hierro, luego de la exposición a GSNO en microaerobiosis se distinguió un aumento en la transcripción de *ctaB*, cuyo producto proteico está involucrado en la síntesis de grupos hemo así como también en el gen que codifica LrpA, una proteína que resulta esencial para el crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro.

Adicionalmente, se identificaron otros genes relacionados con la incorporación de hierro a la célula, lo que refuerza la idea de que las células estarían respondiendo a una situación de déficit o de mayor requerimiento de este compuesto. Por un lado, se identificaron dos genes que codifican transportadores de Fe³⁺ del tipo ABC (*afuA* y PE143B_0115140). A su vez, se detectaron otros dos genes que codifican un transportador de dipéptidos, *dppA* y *dppB*, que recientemente ha sido

relacionado con el transporte de grupos hemo (Mitra *et al.*, 2019). Finalmente, se observó la activación en la transcripción de *ybaN*, relacionado con el transporte de hierro (Seo *et al.*, 2014).

Los principales blancos del NO, liberado a partir de GSNO, y sus especies reactivas derivadas son las metaloproteínas, los grupos tioles, el glutatión y la homocisteína (Poole, 2005). Los grupos tioles están presentes principalmente en las cadenas laterales del aminoácido cisteína. Asimismo, otro aminoácido que es blanco de las RNS, es la tirosina, que en presencia de NO sufre procesos de nitración.

Teniendo esto en cuenta nos preguntamos si los genes que codifican proteínas que pueden ser blancos de nitrosilación (es decir aquellas que poseen cisteínas o tirosinas libres y las que se encuentran unidas a metales) presentaron un enriquecimiento entre aquellos genes con expresión diferencial. Para esto se determinó el número de proteínas nitrosilables presentes en el genoma de *P. extremaustralis* utilizando el programa Target Pathogen (Sosa *et al.*, 2018). De la misma manera se determinaron aquellas proteínas nitrosilables cuyos genes codificantes presentaron expresión diferencial en condiciones m-NS. Estos datos, en conjunto con el número de genes totales y diferencialmente expresados, se utilizaron para realizar una prueba de Chi-cuadrado (Figura 53R). Este análisis nos permitió determinar que, entre aquellos genes que presentaron expresión diferencial, la proporción de los que codifican proteínas nitrosilables se encuentran sobre-representados ($P=0,0313$). Cabe destacar que la mayor parte de estos genes se encontraron sobre-expresados luego de la exposición a GSNO.

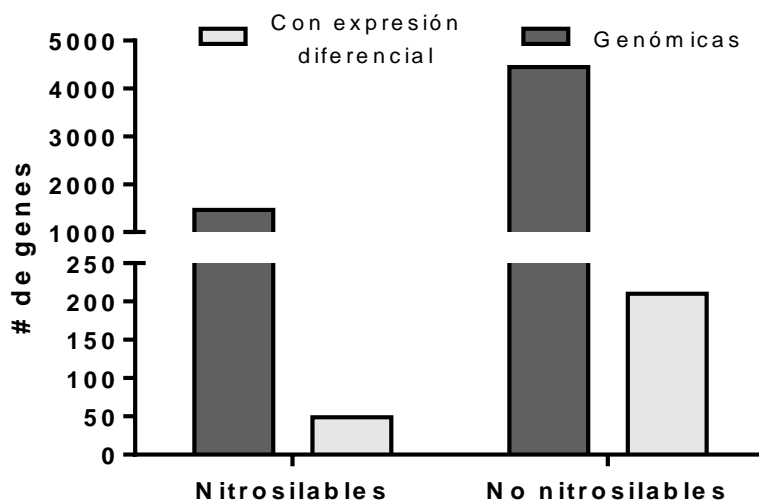


Figura 53R: Análisis de enriquecimiento funcional de genes que codifican para proteínas blanco de nitrosilación. Test de Chi-cuadrado con $P < 0,05$

Como ya se ha mencionado anteriormente, uno de los principales blancos de las RNS son las proteínas que poseen hierro, siendo especialmente susceptibles al daño inducido por NO aquellas que poseen *clusters* Fe-S (Crack, Thomson and Brun, 2014). En ese sentido, una mayor entrada de hierro a la célula, derivada de la sobre-expresión de genes que codifican sideróforos y transportadores, podría ser necesaria para reponer aquellas proteínas que poseen este elemento como cofactor. De hecho, se ha reportado que la activación de Irp1 (nombrada como IrpA en *P. extremaustralis*, el gen que la codifica está sobre-expresado en m-NS) por NO dio como resultado una mayor absorción y un menor almacenamiento de hierro, manteniendo así los suministros de hierro necesarios para la biosíntesis de *clusters* Fe-S (Crack and Brun, 2017). Debido a la importancia que poseen este tipo de proteínas en el metabolismo celular, ya que suelen estar involucradas en reacciones redox, el mantenimiento de las mismas puede resultar clave para la supervivencia.

Resumen de resultados relevantes del capítulo

En este capítulo se analizó la respuesta de *P. extremaustralis* a estrés nitrosativo utilizando un compuesto dador de NO, el GSNO. El NO es una molécula que cumple varios roles en el metabolismo bacteriano, ya sea como intermediario en los procesos de desnitrificación, actuando como molécula de señalización a bajas concentraciones o, a concentraciones más altas, su presencia puede derivar en condiciones de estrés para las células. Es por esto que se seleccionaron condiciones de estudio en las cuales el GSNO tuviera efectos sobre la supervivencia y crecimiento de *P. extremaustralis*.

El análisis transcriptómico mostró la expresión diferencial de diversos genes, siendo los más relevantes aquellos relacionados con la respuesta a estrés, los procesos de transcripción y traducción, la síntesis y transporte de aminoácidos, el metabolismo del carbono (especialmente los involucrados en el metabolismo del inositol) y el metabolismo del hierro. Nuestras observaciones nos permitieron determinar, también, que la exposición al agente nitrosilante afectó de manera diferencial la expresión de genes cuyos productos proteicos son blanco de nitrosilación (metaloproteínas y proteínas con residuos cisteína y/o tirosina libres).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Como se mencionó a lo largo de esta tesis, el oxígeno es un factor clave para la supervivencia bacteriana. Por un lado, su presencia o ausencia provoca modificaciones metabólicas importantes para optimizar la producción de energía que asegure la supervivencia y crecimiento bacterianos (Nikel *et al.*, 2006). Por otra parte, la presencia de oxígeno, y su utilización en procesos respiratorios particularmente, deriva en la generación de especies reactivas que pueden generar daño celular (Imlay, 2013). La situación se complejiza aún más debido a que la distribución de oxígeno en el ambiente es desigual, generando un espectro dinámico de condiciones de aerobiosis, microaerobiosis y anaerobiosis para los microorganismos que se desarrollan en ellos (Chayabutra and Ju, 2000). Para hacer frente a esto, las bacterias poseen redes regulatorias complejas e interrelacionadas que les permiten activar y desactivar la expresión de distintas vías metabólicas según sea necesario.

Las especies del género *Pseudomonas* han sido consideradas tradicionalmente como organismos aerobios, que obtienen su energía principalmente a través de la cadena respiratoria empleando oxígeno como último aceptor de electrones. De hecho, las condiciones de alta aireación son las más utilizadas experimentalmente y las más presentes en la bibliografía en relación a este género. Sin embargo, en el ambiente, es común encontrar distintas especies de *Pseudomonas* ocupando nichos ecológicos donde la disponibilidad de O₂ es limitada, como pueden ser los *biofilms*, el suelo, formando parte de la rizósfera o incluso en ambientes acuáticos donde el flujo de O₂ es bajo (Højberg *et al.*, 1999; Chayabutra and Ju, 2000; Højby, Ciofu and Bjarnsholt, 2010; Brown *et al.*, 2012). Cuando la disponibilidad de oxígeno cae, las bacterias de este género son capaces de utilizar especies oxidadas de nitrógeno como aceptores alternativos de electrones o fermentar piruvato y el aminoácido arginina (Eschbach *et al.*, 2004; Arai, 2011).

Debido a esto, durante este trabajo de tesis, nos propusimos analizar el efecto de los cambios de aireación y el estrés nitro-oxidativo en *P. extremaustralis*, una especie que, por sus características, consideramos un buen modelo de estudio de la adaptación ambiental. Para ello se emplearon técnicas globales, como transcriptómica y proteómica que permiten obtener una visión general de los procesos que ocurren en las células ante diversas condiciones. Este tipo de estrategias han sido previamente utilizados en *P. extremaustralis* para el estudio de la adaptabilidad a las bajas temperaturas y el metabolismo microaeróbico (Tribelli *et al.*, 2015, 2018). En esta bacteria se reportó que cuando las tensiones de O₂ bajan, ocurre una activación de la transcripción de genes relacionados con la desnitrificación y el metabolismo fermentativo de arginina y piruvato en conjunto con genes

involucrados en distintas vías de transporte y secreción. En cambio, los genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos y proteínas regulatorias se vieron inhibidas (Tribelli et al., 2018).

En el presente trabajo, la comparación de los perfiles proteicos de cultivos aeróbicos y microaeróbicos de *P. extremaustralis* mostró un aumento del metabolismo de aminoácidos en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno, una tendencia similar a lo observado previamente mediante estudios transcriptómicos (Tribelli et al., 2018). En condiciones de aerobiosis también resultaron activadas las vías centrales del metabolismo del carbono, como la glucólisis, el metabolismo del piruvato y del propionato. La glucólisis y el metabolismo oxidativo del piruvato son las vías clásicas de obtención de energía en bacterias aerobias, pero también aportan equivalentes de reducción que pueden ser empleados por enzimas detoxificadoras (Shimizu and Matsuoka, 2019a). Además, en aerobiosis se encontraron inhibidas la vía de biosíntesis de riboflavina, que forma parte de los cofactores FMN y FAD. De acuerdo con esto, también se vieron reprimidas las flavoproteínas (proteínas que presentan grupos FAD o FMN como cofactores) y que se encuentran involucradas en reacciones metabólicas redox.

Las defensas oxidativas

El estudio de la resistencia a estrés nitro-oxidativo se ha basado, generalmente, en la caracterización de mecanismos directos de detoxificación de los mismos. Estos mecanismos involucran la acción de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas) (Heo et al., 2010; Kim and Park, 2014) y mecanismos no enzimáticos, como aquellos que involucran ciclos de glutatión y sistemas de tiorredoxina (Apel and Hirt, 2004; Reniere, 2018), que desintoxican las especies reactivas y evitan un mayor daño. El genoma de *P. extremaustralis* muestra un sistema de defensa antioxidante bien desarrollado, que incluye incluye cinco catalasas, una superóxido dismutasa, un citocromo c551peroxidasa y dos alquilhidroperóxido reductasas. Adicionalmente, posee tres flavohemoglobinas, una hemoglobina (HbO), dos glutatión sintetasas y diversas glutatión S-transferasas (Tribelli et al., 2012).

Los resultados obtenidos a partir de técnicas proteómicas mostraron la relevancia de algunas de estas enzimas, como dos alquil hidroperóxido reductasas (AHPs), una superóxido dismutasa (SOD), y una catalasa (KatA) que se encontraron presentes en todas las condiciones estudiadas. Estas proteínas están directamente relacionadas con la detoxificación de ROS, ya que se encargan de dismutar O_2^- (SOD) y de reducir H_2O_2 (AHP y KatA). Muchas de las enzimas relacionadas con la detoxificación de ROS y RNS, así como con el mantenimiento de la integridad de macromoléculas, se encontraron sobre-expresadas diferencialmente en condiciones de aerobiosis indicando que para

crecer con altos niveles de O_2 . *P. extremaustralis* expresa casi todo su potencial de defensas antioxidantes. Esto determinó que la exposición al H_2O_2 en esta condición solo implicó la activación de la expresión de una glutatión sintetasa y algunas peroxidasa, sugiriendo que las defensas desplegadas fueron suficientes para hacer frente al estrés. Por otra parte, y en relación probablemente con un entorno intracelular más reducido, en condiciones de microaerobiosis la expresión de las defensas antioxidativas fue menor en comparación con aerobiosis. Sin embargo, varias de estas enzimas resultaron activadas luego de la exposición a H_2O_2 .

El análisis proteómico permitió detectar la presencia de tres catalasas, KatA, KatB y KatE. Las catalasas son las proteínas detoxificadoras de ROS por excelencia, catalizando la reacción de reducción de H_2O_2 a H_2O , sin embargo se ha reportado que las distintas catalasas responden a distintos tipos de estímulos generadores de ROS (Pezzoni *et al.*, 2016). KatA es considerada la catalasa principal de las bacterias, ya que se encuentra expresada en todas las fases del crecimiento bacteriano y está involucrada tanto en procesos de resistencia a H_2O_2 , como en la osmoprotección y resistencia a radiación UVA en *P. aeruginosa* (Pezzoni, Pizarro and Costa, 2014). Esta isoenzima se encontró expresada en todas las condiciones analizadas, siendo su presencia mayor en condiciones m-OS. KatE, en cambio, no se detectó en microaerobiosis, pero si en las otras condiciones evaluadas. Por último, KatB, solo se detectó en condiciones m-OS, por lo que se podría pensar que en aerobiosis la detoxificación de ROS no involucra a esta enzima o lo hace en tiempos más cortos de exposición. En general, KatB solo se detecta en presencia de H_2O_2 o paraquat y está parcialmente involucrada en la resistencia al estrés oxidativo (Pezzoni *et al.*, 2016). La sobre-expresión de *katA* también se pudo observar a nivel transcripcional en condiciones de m-OS, reforzando aún más la idea de que esta constituye la catalasa principal de *P. extremaustralis*. Las AHPs son enzimas involucradas en la detoxificación de ROS, pero que generalmente actúan cuando las concentraciones de H_2O_2 son más bajas o como las primeras líneas de defensa ante las ROS producidas endógenamente. En el análisis proteómico se pudieron identificar dos copias de AhpC en todas las condiciones analizadas con similar nivel de expresión, mientras que AhpF no se detectó en microaerobiosis, pero si lo hizo en el resto de las condiciones analizadas. A nivel transcriptómico, en cambio, se detectó la sobre-expresión de una *ahpC* y *ahpF*, luego de la exposición a estrés oxidativo. Además, dentro de los mecanismos antioxidativos se destacan las enzimas del tipo glutatión S-transferasa. Estas enzimas catalizan la unión de GSH a diversos sustratos (Chen, 2011). Los genomas de las bacterias del género *Pseudomonas* suelen presentar aproximadamente diez copias de genes que codifican estas enzimas (Vuilleumier, 2002), sin embargo la información referida a las mismas es escasa en especies de este género y se limita a su rol en la degradación de contaminantes (Kunze *et al.*, 2009; Barmana *et al.*, 2017) *P. extremaustralis* presenta 13 copias de genes que codifican enzimas del tipo glutatión S-

transferasas (o probables glutatión S-transferasas). De las mismas, hemos verificado la expresión de 8 en distintas condiciones de aireación y exposición a estrés, lo que nos permite pensar que son funcionales. El análisis proteómico puso en evidencia que estas enzimas presentaron distintos patrones de expresión en las condiciones estudiadas, sugiriendo que los roles que cumplen son distintos y que su activación diferencial podría contribuir a un ajuste fino de la respuesta al estrés. La activación de la expresión de este tipo de enzimas se observó, en general, acompañado de un aumento en la presencia de enzimas del tipo glutatión sintetasa y glutatión reductasa, necesarias para el mantenimiento de GSH reducido, indispensable para su funcionamiento. Adicionalmente, el estudio transcriptómico permitió determinar que, tras la exposición a H₂O₂ en microaerobiosis, otros de los genes de respuesta al estrés oxidativo, como *grx*, *ohr* y citocromo c551, también se encontraron sobre-expresados.

Los resultados obtenidos indican que las condiciones de cultivo utilizadas en el laboratorio, con elevada presencia de O₂ y alta agitación, generaría la expresión de numerosas enzimas de detoxificación de ROS detectadas en aerobiosis. De esta manera se produciría la eliminación de las especies oxidantes en forma más rápida y eficiente, explicando la mayor resistencia a H₂O₂, comprobada en base a la observación de menor halo de inhibición, mayor supervivencia y menor nivel de daño proteico, que presentaron los cultivos aeróbicos en comparación a los microaeróbicos.

En base a lo discutido previamente y teniendo en cuenta que el efecto del estrés oxidativo/nitrosativo en condiciones de microaerobiosis está menos estudiado en especies de *Pseudomonas* nos centramos en el análisis de esta condición.

Además de las enzimas antioxidantes ya descritas, consideramos que pueden existir otros mecanismos indirectos que contribuyen a la resistencia a estrés oxidativo. Estos podrían ser relevantes en el estrés persistente o cuando las defensas clásicas no son suficientes para enfrentarlo. En este sentido, la utilización de técnicas globales puede contribuir a obtener una visión integral de los procesos celulares que actúan en respuesta a diferentes condiciones y permiten identificar procesos novedosos cuyo estudio puede profundizarse analizando los fenotipos relacionados.

Hiperflagelación, motilidad y formación de biofilms

La exposición a estrés oxidativo en microaerobiosis provocó la expresión diferencial de dos grupos de genes flagelares presentes en *P. extremaustralis*, *Cluster I* y *Cluster II* que guardan similitud con las especies de *Pseudomonas* y *Azotobacter*, respectivamente. Además de la sobreexpresión de

genes de ensamblaje flagelar, incluidos *fliN*, *fliJ*, *fliQ* (*Cluster I*) y el regulador *flhC* (*Cluster II*), la exposición a H₂O₂ en condiciones microaeróbicas dio lugar a un patrón de flagelación diferencial con presencia de múltiples flagelos polares. Resultados similares han sido reportados en *P. fluorescens* F113, donde la sobreexpresión de los genes *flhCD* pertenecientes al *cluster II* (similar a *A. vinelandii*) provocó un fenotipo multi-flagelado y con mayor motilidad, que fue reconocido como un factor importante para la colonización de raíces en esta especie (Redondo-Nieto *et al.*, 2013; Barahona *et al.*, 2016). Estas observaciones también estuvieron acompañadas de un incremento en la movilidad de tipo *swarming*, que consiste en el movimiento multicelular de bacterias a través de superficies semisólidas y depende de la rotación flagelar (Kearns, 2010), en microaerobiosis luego de la exposición a H₂O₂. Esto sugiere que la motilidad podría ser un mecanismo que actúe en respuesta al estrés oxidativo cuando la disponibilidad de oxígeno es baja. También se observó mayor expresión de *cheR5*, que codifica una metiltransferasa involucrada en la adaptación a estímulos quimiotácticos que, junto con *cheB*, permite al sistema quimiotáctico mantener una actividad concertada (Bi and Sourjik, 2018). Las vías de quimiotaxis están relacionadas con la motilidad basada en flagelos e involucran varias proteínas con diferentes mecanismos de acción. Los resultados obtenidos se encuadran dentro de la denominada quimiotaxis negativa que consiste en el movimiento de los microorganismos en contra de los gradientes químicos y se ha propuesto como una forma de escapar de los compuestos nocivos o tóxicos (Sampedro *et al.*, 2015; Tunchai *et al.*, 2017). Dado que CheR, y CheA, actúan en respuesta a la presencia de sustancias quimiorrepelentes (Bi and Sourjik, 2018), como H₂O₂, es plausible que en *P. extremaustralis* los patrones de flagelación diferencial, el aumento de la motilidad y la sobreexpresión de los genes de quimiotaxis, provoque en las células un movimiento negativo para escapar del compuesto tóxico (H₂O₂).

La exposición al estrés oxidativo a bajas tensiones de oxígeno también dio lugar a una mayor capacidad de formación de *biofilms*. La relevancia de los flagelos en diferentes etapas de la formación de biopelículas, incluyendo la unión inicial a superficies y la expansión de los mismos ha sido señalada (Belas, 2014). Mutantes de *P. aeruginosa* y *E. coli* que carecen de flagelos funcionales no son capaces de adherirse a superficies abióticas, por lo que se encuentran afectadas las etapas iniciales de la formación de *biofilms* (O'Toole and Kolter, 1998; Pratt and Kolter, 1998). Además, los *biofilms* maduros de *P. aeruginosa* suelen presentar diferentes fenotipos celulares, con células no móviles en el interior de la matriz de dichas estructuras, rodeadas por células altamente móviles (Kim and Lee, 2016). Esto muestra que los flagelos tienen diferentes roles en el comportamiento celular, que van desde la motilidad celular hasta la unión a superficies y la dispersión de biopelículas. La regulación de la transición entre la unión reversible e irreversible de las células a diversas superficies podría involucrar

también elementos quimiotácticos (Caiazza *et al.*, 2007), algunos de los cuales presentaron una regulación diferencial en las condiciones analizadas, como se mencionó anteriormente.

Adicionalmente, los exopolisacáridos (EPS) son uno de los componentes principales de la matriz de los *biofilms* y juegan un papel importante en su desarrollo y maduración. En *P. extremaustralis* se ha descrito que los genes *pga* participan en la producción de EPS sugiriendo que poseen un rol importante en la resistencia a estrés (Raiger Lustman *et al.*, 2015). Algo similar fue reportado en *E. coli*, donde los genes *pgaABCD* son necesarios para la síntesis de un polisacárido que desempeña un papel fundamental en la adhesión de las células y en la formación de biopelículas (Wang, Preston and Romeo, 2004). En *P. extremaustralis* se observó un aumento de la transcripción de *pgaD*, un gen que codifica una proteína de biosíntesis poli-N-acetil-D-glucosamina (dPNAG), después de la exposición al H₂O₂ en cultivos microaeróbicos. Esto concuerda con los resultados que mostraron el aumento en la producción de EPS en esas condiciones, así como con el aumento de formación de esas estructuras complejas observado. Como las biopelículas confieren protección contra los agentes de estrés exógenos (Anderson and O'Toole, 2008), una mejor capacidad para formar estas estructuras podría constituir un mecanismo de respuesta al estrés oxidativo. Por otra parte, es posible que las estructuras flagelares que permiten que las bacterias se muevan para alejarse de compuestos quimiorepelentes también estén involucradas en la unión a las superficies sólidas, lo que explica el aumento de la motilidad y la mayor capacidad para formar estructuras de resistencia lo que *a priori* parecerían fenómenos opuestos. En relación a esto, también se ha sugerido que las bacterias pueden inhibir la motilidad en sí misma y solo después de períodos más prolongados se reprime la expresión de los genes flagelares. En *P. aeruginosa* se observó que la motilidad y la formación de biopelículas están moduladas inversamente por SadB (Caiazza *et al.*, 2007). *P. extremaustralis* posee una copia de *sadB*, sin embargo, este gen no se encuentra diferencialmente expresado entre microaerobiosis y m-OS. En conjunto, estas observaciones pueden ayudar a explicar parte de los resultados obtenidos, dado que las células se expusieron primero al estrés oxidativo en cultivos microaeróbicos líquidos y, después de esto, se enfrentaron a diferentes tipos de superficies, ya sean sólidas o semisólidas. La información disponible indica que los elementos genéticos involucrados en la regulación de la motilidad, la formación de *biofilms*, la quimiotaxis y la producción de exopolisacáridos son vastos y complejos. La modulación de la expresión de los genes flagelares podría representar una ventaja ecológica, permitiendo que las células actúen contra el estrés oxidativo de acuerdo con el nicho ecológico en el que se desarrollan, ya sea escapando o formando *biofilms*.

Regulación genética

La capacidad de las bacterias para modular la expresión génica en respuesta a las condiciones ambientales en constante cambio es fundamental para su supervivencia. Tradicionalmente, se ha relacionado la regulación genética en bacterias a la actividad de factores de transcripción, o reguladores, que activan o reprimen la transcripción de grupos determinados de genes en respuesta a diversas señales (Papenfort and Vogel, 2010). En las especies del género *Pseudomonas*, la regulación de las respuestas fisiológicas en condiciones de bajo oxígeno es un fenómeno complejo en el que el regulador global Anr tiene un papel central (Trunk *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2013; Tribelli *et al.*, 2013). Por este motivo se realizó una búsqueda de sitios de unión de Anr en los genes relevantes. Se encontraron secuencias de unión a este factor de transcripción en la región río arriba de varios genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, incluido FhIC, un activador de la transcripción de genes flagelares que se encontró sobre-expresado en m-OS. Esto podría ser de particular importancia, considerando los rasgos fisiológicos con respecto a los flagelos observados en *P. extremaustralis*. Además, también se encontraron sitios de unión (Anr-boxes) en las regiones reguladoras de *ohr*, un gen que presentó una sobre-expresión de 50 veces en condiciones m-OS, lo que sugiere que Anr también puede participar en estas respuestas. Por otra parte, en las bacterias Gram negativas, la respuesta al estrés oxidativo en condiciones de crecimiento aeróbico generalmente está coordinada por OxyR, un regulador transcripcional de tipo LysR (Horn *et al.*, 2015). En *P. extremaustralis*, *oxyR* no presentó mayores niveles de transcripción en m-OS en comparación a microaerobiosis. Es posible que, si la expresión del regulador se modifica levemente en una condición, este no pueda ser correctamente detectado por las técnicas globales, lo cual no implica que no produzca cambios significativos en la fisiología celular. El tiempo transcurrido luego de la adición a H₂O₂ podría estar jugando otro papel importante en la detección de este regulador. En relación a esto resultaría interesante observar si existe un cambio en la expresión a tiempos más cortos de exposición a estrés. Por otra parte, no pudimos encontrar en las regiones promotoras secuencias de unión a OxyR en genes sobre-expresados que se describieron como controlados por este regulador. Para este análisis se utilizaron las secuencias consenso determinadas para *P. aeruginosa* (Wei *et al.*, 2012), teniendo en cuenta que la conservación de secuencia aminoacídica entre las proteínas de ambas especies es superior al 90%.

En los últimos años los estudios de los procesos regulatorios en bacterias han establecido que los pequeños RNA regulatorios constituyen elementos adicionales importantes en la regulación genética. Los estudios transcriptómicos realizados en *P. extremaustralis* permitieron identificar algunos posibles sRNA que actúan como respuesta a las variaciones en la aireación y el estrés oxidativo.

Entre los sRNA identificados, podemos destacar PrrF, un homólogo al sRNA RhyB descrito en *E.coli* y otras enterobacterias (Sonnleitner and Haas, 2011). Se ha reportado en otras especies de *Pseudomonas* que este tipo de sRNA reprimen la traducción de proteínas que utilizan hierro como cofactor (Sonnleitner and Haas, 2011). La regulación de la expresión de PrrF responde al regulador del metabolismo del hierro Fur. En condiciones de alta disponibilidad de hierro, Fur reprime la transcripción de PrrF, mientras que en condiciones de deficiencia de este metal, su transcripción se ve activada. La presencia de PrrF afecta la expresión de diversas enzimas involucradas en el metabolismo del hierro, la resistencia a estrés oxidativo y el metabolismo central del carbono. De esta manera, PrrF es capaz de reprimir la traducción de *katA* y *sodB*, involucradas en la defensa antioxidativa, así como de diversas bacterioferritinas. También causa la inhibición de diversas aconitasas y succinato deshidrogenasas y activa la expresión de pioverdinas (Sonnleitner and Haas, 2011; Oglesby-Sherrouse and Murphy, 2013). En *P. extremaustralis*, PrrF se encontró reprimido luego de la exposición a H₂O₂ en microaerobiosis. Esto implicaría que, en condiciones de estrés, PrrF no se encuentra presente para reprimir enzimas antioxidativas y promueve una baja en los niveles de hierro intracelular, en concordancia con las tendencias observadas por proteómica y transcriptómica.

En este trabajo se profundizó en el estudio de un sRNA codificado en trans no descrito hasta el momento, el sRNA40, que fue identificado en primer lugar como un transcripto de función desconocida. El estudio de la función biológica de estos elementos regulatorios es compleja y su función en los diversos metabolismos de *Pseudomonas* recién se está empezando a dilucidar (Valverde, 2009; Lu *et al.*, 2016; Sofía *et al.*, 2016). Los análisis realizados permitieron determinar que está conservado dentro de otras especies de *Pseudomonas* relacionadas con *P. extremaustralis* y que comparten sintenia, lo que podría sugerir una función conservada compartida para los homólogos. Utilizando técnicas de sobre-expresión seguidas de secuenciación masiva de RNA, pudimos establecer que los blancos de regulación del sRNA40 se relacionan con sistemas de transporte y de secreción. Si bien no se pudo esclarecer la función de estos sistemas en condiciones de microaerobiosis, la identificación de los blancos de acción provee información de utilidad para continuar los estudios sobre estos genes empleando otras aproximaciones.

Estrés nitrosativo

Adicionalmente, se trabajó en el análisis de la respuesta a estrés nitrosativo inducido por GSNO. Este tipo de estrés cobra particular relevancia en condiciones de microaerobiosis en bacterias del género *Pseudomonas* como consecuencia de los procesos de desnitrificación (Cole, 2018). En *P.*

extremaustralis este efecto puede verse aumentado por la acumulación de NO_2^- producto de la ausencia de los genes *nir*, que puede interactuar con otras especies reactivas encontradas en el ambiente derivando en especies altamente nitrosilantes (Cole, 2018). Los análisis fenotípicos realizados muestran que la exposición a GSNO supone una condición de estrés para las células, evidenciada por una disminución de la supervivencia luego de la adición del compuesto. De manera análoga a lo que ocurrió ante la exposición a H_2O_2 , los efectos del GSNO en la supervivencia bacteriana fueron mayores en condiciones de crecimiento microaeróbicas. Adicionalmente, el NO puede cumplir un rol como molécula de señalización (Sasaki *et al.*, 2016).

Entre los cambios más destacados en la expresión genética luego de la exposición al agente nitrosilante se destaca el aumento en la expresión de diversos genes relacionados a la producción y transporte de pioverdinas. Las pioverdinas son compuestos sideróforos sintetizados generalmente por bacterias del género *Pseudomonas*, compuestas por una porción peptídica y una porción dihidroxiquinolina con propiedades de cromóforo, que le otorgan características fluorescentes. El rol de las pioverdinas ha sido ampliamente estudiado en distintas especies de *Pseudomonas*. En *P. aeruginosa* PAO1, cumplen un rol importante en la patogenicidad, regulando la producción de diversos factores de virulencia (Lamont *et al.*, 2002) mientras que en *P. protegens* Pf-5 y *P. fluorescens* SBW25 poseen un papel importante en la protección contra patógenos vegetales (Ruiz, Bernar and Jung, 2015). También en relación con el metabolismo del hierro, se observó un aumento en la transcripción de el gen que codifica LrpA, una proteína que resulta esencial para el crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro (Xu *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que también se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con el transporte de este compuesto, es posible que en presencia de GSNO, las bacterias se comporten como en una situación de deficiencia de hierro. En este sentido, la respuesta a RNS con respecto al metabolismo del hierro parece ser opuesta a la que presentan las células ante la exposición a estrés oxidativo, donde las proteínas involucradas se encuentran reprimidas. Una de las principales funciones del hierro a nivel celular es su integración a las proteínas, formando parte de centros de hierro o como *clusters* de Fe-S (Crack, Thomson and Brun, 2014). Estas proteínas cumplen roles diversos en el metabolismo celular, siendo claves en procesos como el catabolismo, el ensamblaje de ribosomas, la fijación de nitrógeno y la reparación del DNA (Melber and Winge, 2018), por lo que su mantenimiento es fundamental para el desarrollo de los organismos. Puesto que las enzimas de estas características son blanco de las RNS una mayor entrada de hierro a la célula podría ser necesaria para reponer aquellas proteínas que poseen este elemento como cofactor. Posiblemente asociado a esto, se verificó un aumento en la expresión de genes que codifican proteínas ribosomales y proteínas de los caminos biosintéticos de purinas y pirimidinas, así como el aumento en la biosíntesis de aminoácidos y su entrada a las células. Esto sugiere que la exposición a

GSNO deriva en una mayor síntesis de proteínas y un incremento del *turnover* proteico. Teniendo en cuenta que la mayor parte de las proteínas que se sintetizan son blanco probable de nitrosilación tal como se determinó mediante análisis *in-silico*, proponemos que esto puede estar relacionado con la necesidad de producir proteínas *de novo* que sufrieron daño nitrosativo y que ya no pueden cumplir su función celular. Teniendo en cuenta esta hipótesis, el aumento de la producción de sideróforos, que derivaría en una mayor entrada de hierro en la célula, podría implicar la producción de proteínas que utilizan este metal como cofactor. En línea con ello, se ha reportado que la activación de IrpA por NO dio como resultado una mayor absorción y un menor almacenamiento de hierro, manteniendo así los suministros de hierro necesarios para la biosíntesis de *clusters* Fe-S (Crack and Brun, 2017).

Por último, resulta interesante analizar el rol del metabolismo del inositol en la respuesta a la exposición a GSNO. El catabolismo del inositol ha sido relacionado con la supervivencia en la interacción entre plantas y bacterias en rizobacterias, pero también para la supervivencia del patógeno animal *Brucella* dentro de su huésped, en la virulencia de *Salmonella typhimurium* en ratones, cerdos, pollos y terneros y como vía metabólica novedosa asociada a cepas epidémicas de *Aeromonas hydrophila* (Kohler, Choong and Rossbach, 2011; Pang *et al.*, 2015; Severino *et al.*, 2019). Sin embargo, es escasa la información sobre el rol de este metabolito en bacterias del género *Pseudomonas*. Los resultados obtenidos mostraron que varios de los genes involucrados en el catabolismo del inositol se encontraron sobre-expresados luego de la exposición a GSNO en *P. extremaustralis*. Entre ellos podemos encontrar *iolB*, *iolD*, *iolE* e *iolG*, así como elementos componentes de un transportador de inositol y un regulador transcripcional de esta vía. *iolJ* que codifica para 6-fosfo-5-deshidro-2-desoxi-D-gluconato aldolasa y conduce a la formación de dihidroxiacetona fosfato y malonato y relaciona esta vía con el metabolismo central del carbono y la obtención de energía y poder reductor no se encuentra presente en *P. extremaustralis*. Notablemente, en varias bacterias que utilizan el mioinositol como fuente de carbono, tales como *Gaiella occulta*, *Solirubrobacter soli*, *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila*, *Enterobacter aerogenes* y *Aeromonas hydrophila*, *iolJ* tampoco ha sido identificado, sin embargo, ha sido propuesto que puede ser reemplazado por otro gen que codifique una aldolasa aún no anotado (Pang *et al.*, 2015; Severino *et al.*, 2019)(Severino *et al.*, 2019, Pang *et al.*, 2015). En el genoma de *P. extremaustralis* se verifica la presencia de varios genes que codifican aldolasas por lo que podría hipotetizarse que esta función podría ser llevada a cabo.

El rol de *P. extremaustralis* como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) ha sido previamente estudiado en el laboratorio, encontrándose que esta bacteria es capaz de solubilizar fosfatos, necesarios para el desarrollo de las plantas y de producir la hormona vegetal ácido indol acético (AIA) (Ibarra, 2017). Dado que el NO es también una molécula de señalización liberada por las

plantas (Sasaki et al., 2016), cabe la posibilidad de que los cambios producidos por la liberación de NO por parte del GSNO, sean censados por la bacteria como un indicio de proximidad de organismos vegetales y esto derive en la expresión diferencial de la vía metabólica del inositol. Si bien en las condiciones de cultivo utilizadas la probabilidad que el inositol se encuentre presente son bajas, en ambientes naturales se encuentra presente lo que explicaría la presencia de los genes en esta bacteria. La relación entre el metabolismo del inositol y organismos vegetales ha sido reportada en *Bacillus subtilis*, donde se observó que la interacción con plántulas de arroz provocó la caída en la expresión de los genes relacionados con este metabolismo (Xie et al., 2015).

Los mecanismos relacionados con la detoxificación de ROS y RNS son complejos e involucran en algunos casos el solapamiento en las respuestas. Los resultados obtenidos muestran que algunas respuestas ante ambos tipos de estrés son compartidas mientras que otras son específicas y llamativamente algunas, como el metabolismo del Fe, resultaron opuestas. Los cambios fisiológicos más relevantes observados en *P. extremaustralis* en condiciones de microaerobiosis y estrés nitrosativo y oxidativo se muestran en la figura 1D.

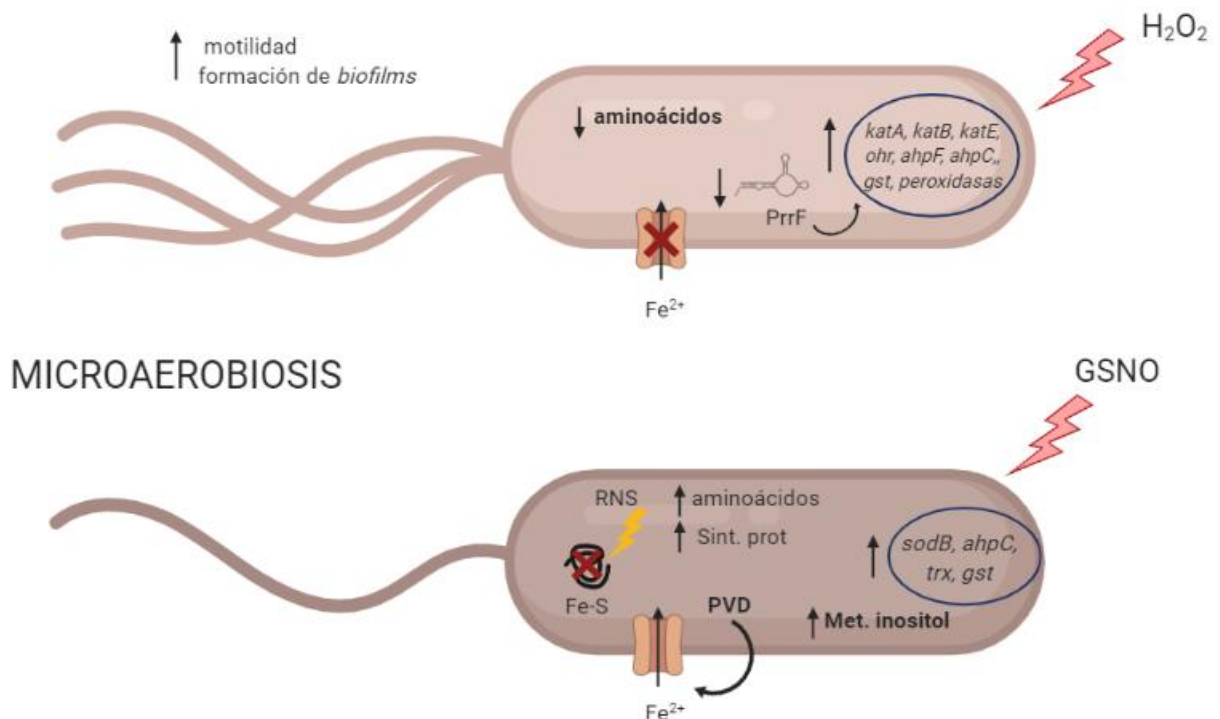


Figura 1D: Resumen de las respuestas detectadas frente a la exposición a H₂O₂ y GSNO en microaerobiosis en *P.extremaustralis*.

CONCLUSIONES GENERALES

- En condiciones aeróbicas se observó que *P. extremaustralis* despliega todo su potencial de defensas antioxidantes relacionadas con la detoxificación de ROS y RNS, así como con el mantenimiento de la integridad de macromoléculas. Como consecuencia de esto, la exposición al H₂O₂ solo implicó la activación de la expresión de una glutatión sintetasa y algunas peroxidasas, sugiriendo que las defensas desplegadas fueron suficientes para hacer frente al estrés.
- En condiciones de microaerobiosis la expresión de las defensas antioxidativas fue menor en comparación con aerobiosis, sin embargo, la exposición a H₂O₂ provocó la sobreexpresión de diversos tipos de enzimas involucradas en esta respuesta.
- El análisis proteómico mostró la expresión de numerosas enzimas detoxificantes presentes en el genoma de *P. extremaustralis*. que comprende en muchos casos múltiples enzimas para una misma función y que incluye catalasas, AHPs, GST, glutatión sintetasa y glutatión reductasa. Esto sugiere que existe una respuesta diferencial frente a las distintas condiciones analizadas e indicaría un ajuste fino de la respuesta en cada una.
- La respuesta a estrés oxidativo en microaerobiosis implicó la activación de varios genes y sus fenotipos asociados incluyendo el sistema flagelar, la quimiotaxis, la formación de biofilms y la síntesis de EPS como mecanismos de escape o defensa frente al estrés.
- El metabolismo del Fe resultó relevante en microaerobiosis tanto en presencia de estrés oxidativo como nitrosativo, mostrando expresión diferencial en sentido opuesto. Mientras que los mecanismos de captación de Fe se activaron frente a RNS, probablemente como respuesta a la necesidad de reponer proteínas dañadas conteniendo Fe, en presencia de ROS la expresión del metabolismo del Fe disminuyó probablemente para evitar el incremento del estrés derivado de la reacción de Fenton.
- El análisis transcriptómico permitió identificar un gran número de sRNA con probable función regulatoria, entre ellos el PrrF resultó relevante por su participación en el metabolismo del hierro y en la regulación genes involucrados en las defensas antioxidativas como *katA* y *sodB*, y de los que codifican diversas bacterioferritinas.
- Los análisis de un transcripto de función desconocida, denominado sRNA40, mostraron similitud y sintenia entre diversas especies de *Pseudomonas* lo cual podría sugerir una función conservada dentro del género. Su sobreexpresión en microaerobiosis permitió identificar genes relacionados con sistemas de transporte y de secreción como probables blancos de acción.
- La exposición a GSNO resultó en la activación del catabolismo del inositol, una vía poco estudiada que puede estar relacionada con la supervivencia en interacciones de bacterias con plantas y animales, por lo que su hallazgo resulta novedoso.

ANEXO

Tablas

ANEXO TABLAS

1. **Tabla 1A:** Proteínas expresadas diferencialmente en aerobiosis y microaerobiosis.

Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Desde la escritura de esta tesis cambiaron los códigos de identificación UniProt. Para la búsqueda de los códigos unificados utilizar la base de datos UniParc (www.uniprot.org/uniparc)

Accession num.	Nombre	Condiciones	log ₂ (FC)	ON/OFF
A0A023CEQ0	Dihydrodipicolinate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-4,17	-
A0A023CDW7	Coproporphyrinogen-III oxidase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-3,37	-
A0A023CAX4	Ornithine cyclodeaminase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-3,18	-
A0A023CEC1	Acetate kinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-3,18	-
A0A023C460	D-amino acid dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-3,12	-
A0A023C2X9	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-3,08	-
A0A023C6R6	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,80	-
A0A023C5I9	50S ribosomal protein L20	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,71	-
A0A023C5I6	DNA-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,69	-
A0A023C589	50S ribosomal protein L6	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,67	-
A0A023C5A9	30S ribosomal protein S12	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,60	-
A0A023CAL9	Lipoprotein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,56	-
A0A023CCF3	ABC transporter ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,45	-
A0A023C595	30S ribosomal protein S8	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,42	-
A0A023C8F6	Membrane protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,42	-
A0A023C5A0	30S ribosomal protein S19	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,41	-
A0A023CAM8	Amino acid transporter	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,41	-

A0A023C5C0	50S ribosomal protein L11	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,39	-
A0A023C524	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,35	-
A0A023C598	30S ribosomal protein S11	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,33	-
A0A023CAH9	ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,22	-
A0A023C5B6	50S ribosomal protein L23	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,20	-
A0A023C470	Alanine racemase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,17	-
A0A023C5T9	30S ribosomal protein S13	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,17	-
A0A023C4T1	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,15	-
A0A023C5X4	50S ribosomal protein L10	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,13	-
A0A023CAR3	Succinate dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,12	-
A0A023C7D2	Tol-Pal system protein TolQ	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,08	-
A0A023C7H1	Cold-shock protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,07	-
A0A023CE85	Phasin	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,07	-
A0A023CF23	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,02	-
A0A023C592	50S ribosomal protein L14	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,02	-
A0A023C2L8	50S ribosomal protein L13	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-2,00	-
A0A023C4K6	Sugar ABC transporter ATPase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,97	-
A0A023C5A6	30S ribosomal protein S10	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,94	-
A0A023CDX2	(Fe-S)-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,88	-
A0A023C8Z4	Renalase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,87	-
A0A023C587	30S ribosomal protein S4	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,85	-
A0A023C5C2	Keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,80	-
A0A023C5A3	30S ribosomal protein S5	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,78	-
A0A023C9W8	2-isopropylmalate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,77	-

A0A023C863	ATP synthase subunit b	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,75	-
A0A023C2R4	Lipopolysaccharide export system protein LptA	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,73	-
A0A023C5U5	50S ribosomal protein L18	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,73	-
A0A023C4C8	Glycosyl transferase family 1	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,70	-
A0A023C3G9	TenA family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,69	-
A0A023CHE0	LPS-assembly lipoprotein LptE	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,65	-
A0A023CD57	Dihydroorotase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,61	-
A0A023CHV7	GTPase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,57	-
A0A023C5W6	30S ribosomal protein S7	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,56	-
A0A023C5B4	50S ribosomal protein L16	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,54	-
A0A023C556	GTP cyclohydrolase-2	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,53	-
A0A023C5A5	50S ribosomal protein L3	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,52	-
A0A023CHV5	Fis family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,52	-
A0A023C6V0	Indole-3-glycerol phosphate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,50	-
A0A023CDT6	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,48	-
A0A023C5B5	50S ribosomal protein L1	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,48	-
A0A023C9T0	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,45	-
A0A023CFS4	50S ribosomal protein L9	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,44	-
A0A023C746	GTP cyclohydrolase 1	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,43	-
A0A023C2E6	Channel protein TolC	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,41	-
A0A023CFI7	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,37	-
A0A023C705	GTPase Obg	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,37	-
A0A023CCX4	Pyridoxine 5'-phosphate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,32	-
A0A023C553	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,30	-

A0A023C699	Histidinol-phosphate aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,28	-
A0A023CIJ8	30S ribosomal protein S15	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,24	-
A0A023C9V7	50S ribosomal protein L19	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,21	-
A0A023CA68	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,21	-
A0A023C4P8	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,20	-
A0A023C4L3	ATPase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,20	-
A0A023CC97	Porin	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,19	-
A0A023CEF9	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit Alpha	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,15	-
A0A023CFG7	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,14	-
A0A023C5A7	50S ribosomal protein L2	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,09	-
A0A023CEB4	30S ribosomal protein S2	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,08	-
A0A023C4F8	Membrane protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,07	-
A0A023C9Q5	Outer membrane protein assembly factor BamB	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-1,02	-
A0A023C7X8	Oxygen-dependent choline dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	OFF
A0A023C5X8	Nitrous-oxide reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	OFF
A0A023C762	Dihydropteridine reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	OFF
A0A023CG10	Acyl-homoserine lactone acylase subunit beta	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	OFF
A0A023CEU6	Aldolase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	OFF
A0A023C947	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	OFF
A0A023C4Y6	Energy transducer TonB	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	OFF
A0A023CB25	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,01	-
A0A023C698	Phosphoserine aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,02	-
A0A023C7I3	Arginine deiminase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,03	-
A0A023C889	Fatty acid methyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,03	-

A0A023CCH7	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,07	-
A0A023C6Q4	Arginine N-succinyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,07	-
A0A023CDF8	Alkyl hydroperoxide reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,08	-
A0A023C8V6	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,09	-
A0A023CAM2	Citrate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,10	-
A0A023CG46	Alkyl hydroperoxide reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,11	-
A0A023CBD3	Pyruvate dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,11	-
A0A023C8S9	Probable malate:quinone oxidoreductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,12	-
A0A023C7F0	Pyruvate kinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,14	-
A0A023CAP5	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,15	-
A0A023C9H7	4-aminobutyrate aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,16	-
A0A023CCN2	S-transferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,156	-
A0A023CG68	Acyl-CoA dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,17	-
A0A023C655	ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,22	-
A0A023CGB4	Carbamoyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,24	-
A0A023C4N6	Peptidoglycan-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,24	-
A0A023CDV4	Phosphoenolpyruvate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,26	-
A0A023C7A4	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,27	-
A0A023C549	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,27	-
A0A023C216	Serine--tRNA ligase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,30	-
A0A023C816	Tryptophan synthase beta chain	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,31	-
A0A023CD39	Probable cytosol aminopeptidase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,32	-
A0A023CC43	ATPase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,37	-
A0A023CEB7	Acetyl-CoA acetyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,40	-

A0A023CE93	ATPase AAA	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,40	-
A0A023C6K2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,42	-
A0A023CDT8	2-methylisocitrate lyase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,45	-
A0A023CDI1	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,47	-
A0A023CAH4	ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,47	-
A0A023C7N8	Acetyl-CoA acetyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,52	-
A0A023C4S3	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,53	-
A0A023CHU6	Glucose-6-phosphate isomerase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,57	-
A0A023CCY4	Glucose dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,578	-
A0A023CED3	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,58	-
A0A023CDX8	Aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,59	-
A0A023C647	N-succinylarginine dihydrolase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,64	-
A0A023C5D2	Superoxide dismutase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,66	-
A0A023C519	Isocitrate lyase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,67	-
A0A023C4B6	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,68	-
A0A023CB15	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,71	-
A0A023C1V0	Aldo/keto reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,72	-
A0A023CCH5	Adenylate cyclase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,73	-
A0A023C7G0	H-NS histone	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,77	-
A0A023C4S4	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,78	-
A0A023C7K5	Succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,83	-
A0A023CDR5	Citrate synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,84	-
A0A023CGD8	Molecular chaperone Hsp20	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,84	-
A0A023CI66	AMP nucleosidase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,91	-

A0A023CF20	Amino acid ABC transporter	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,95	-
A0A023CAZ2	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	1,97	-
A0A023CFL9	Poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein PhaF	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,03	-
A0A023CAZ4	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,11	-
A0A023C476	Transcriptional regulator (Fragment)	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,12	-
A0A023CG92	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,15	-
A0A023C8U0	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,15	-
A0A023CAS1	Aldehyde dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,16	-
A0A023CCV3	Fumarylacetoacetase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,16	-
A0A023CDI0	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,18	-
A0A023CID9	Endopeptidase La	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,20	-
A0A023CAT7	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,33	-
A0A023CB64	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,34	-
A0A023C3T0	Ethanol-active dehydrogenase/acetalddehyde-active reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,35	-
A0A023CAR8	Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,38	-
A0A023C6P3	Malate synthase G	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,38	-
A0A023CEU1	ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,44	-
A0A023C5S4	Acyl-CoA dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,45	-
A0A023C734	Serine/threonine protein kinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,46	-
A0A023C6R3	Acetyl-coenzyme A synthetase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,48	-
A0A023CBT6	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,51	-
A0A023CGI6	Alcohol dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,58	-
A0A023C6Z0	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,74	-
A0A023CEQ3	Leucine ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,81	-

A0A023CD56	Homogentisate 1,2-dioxygenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,81	-
A0A023C644	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	2,83	-
A0A023C6W1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,03	-
A0A023C7Y4	Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,09	-
A0A023C384	Sugar ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,14	-
A0A023CGI8	Aldehyde dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,16	-
A0A023CBK6	Chemotaxis protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,31	-
A0A023C825	Serine hydroxymethyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,31	-
A0A023C8W9	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,33	-
A0A023CH52	Aldehyde dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,42	-
A0A023CAQ9	Dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,49	-
A0A023CFT8	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,60	-
A0A023CFL0	Urocanate hydratase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	3,72	-
A0A023C860	Aldehyde dismutase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	5,90	-
A0A023CGE8	60 kDa chaperonin	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGI7	Alpha-glucan phosphorylase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGD1	Universal stress protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CFB2	Histidine ammonia-lyase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGK7	mRNA 3'-end processing factor	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4P2	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGE4	Phosphoribosyl transferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C5T0	CoA-transferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGH8	Universal stress protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CHE2	GNAT family acetyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON

A0A023C2U3	Omega amino acid--pyruvate aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C369	Acyl-CoA dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C841	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4D5	33 kDa chaperonin	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CDC1	Chemotaxis protein CheY	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7X9	Peptidase M19	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C855	Sarcosine oxidase subunit beta	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAV8	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CA81	Chemotaxis protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CG88	Alkyl hydroperoxide reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C9G8	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C9A6	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGF7	ABC transporter ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C5L4	Aldehyde dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CF21	Universal stress protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CC05	GMC family oxidoreductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7T7	ABC transporter ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CEU0	Leucine/isoleucine/valine transporter ATP-binding subunit	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7Y8	Rieske (2Fe-2S) protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGF6	Sulfurtransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CBQ7	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C831	N-methylproline demethylase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CDB3	Bacterioferritin	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAQ7	LuxR family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON

A0A023C6J9	Probable allantoicase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CC98	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4B8	Peptidoglycan-binding protein LysM	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CIC6	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C9T5	Aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7Z1	MFS transporter	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CFC2	DeoR family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C5P0	Chemotaxis protein CheY	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C8H1	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAP8	Membrane protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4D3	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CBM4	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4N1	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CBF3	ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CFK3	Proline iminopeptidase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C581	UvrABC system protein A	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7V4	Peptidase C69	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CH60	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase SV=1	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CIM5	Ribosome association toxin RatA	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C8X2	PTS fructose transporter subunit IIA	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CCG5	NAD(P)H-quinone oxidoreductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7D8	Formyltetrahydrofolate deformylase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7Z7	Ferredoxin	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C974	Chemotaxis protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON

A0A023C5B7	Long-chain fatty acid--CoA ligase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C6C1	NADP transhydrogenase subunit alpha	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7P8	Selenide, water dikinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C5K6	(P)ppGpp synthetase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CD27	Ribosomal subunit interface protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CCD0	Amino-acid acetyltransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CFE4	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C2R0	PTS fructose transporter subunit IIA	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAP3	Histidine kinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CEC6	DNA-directed DNA polymerase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C8G4	Fis family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CIC3	Chemotaxis protein CheX	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CB34	Sulfur oxidation protein SoxZ	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C9U6	Methionine ABC transporter substrate-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C390	Xylulose kinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGC8	DNA mismatch repair protein MutL	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CEL9	dCTP deaminase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4J9	Diguanylate cyclase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4I8	AraC family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C666	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C457	Nitrogen regulatory protein P-II 1	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C807	Sarcosine oxidase subunit gamma	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAH1	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C464	Acetyl-CoA hydrolase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON

A0A023CGB1	Chemotaxis protein CheY	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CE08	Chromosome segregation protein SMC	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C317	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C1P6	Enoyl-CoA hydratase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CEL8	Diguanylate cyclase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAY4	GfdT protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CFH2	Uroporphyrinogen decarboxylase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C6U3	Lipoprotein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CDU5	Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CED5	LuxR family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAY8	Exonuclease III	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CHB7	Alcohol dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CHQ4	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7T4	Zn-dependent protease	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C862	Peptide deformylase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7A5	ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CHE3	Magnesium transporter	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CCG9	Hydroxyacid dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAY9	ABC transporter ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C913	Metal-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CEI5	ATP-dependent DNA helicase RecG	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C8V8	Peptide chain release factor 3	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C886	Chromosomal replication initiator protein DnaA	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAY5	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON

A0A023CCJ4	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C3E5	Asparagine synthase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C4X0	Oxidoreductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CAV6	2,4-dienoyl-CoA reductase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C6B9	Cytidylate kinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CE46	Dehydrogenase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGG5	Universal stress protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CCK4	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CHX1	TetR family transcriptional regulator	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CEQ6	Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CA51	Cytosine deaminase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C784	4-aminobutyrate aminotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CD21	Amino acid ABC transporter permease	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGF1	DNA topoisomerase 4 subunit A	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGJ2	ABC transporter	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CGE1	Channel protein TolC	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CB39	Histidine kinase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C3B8	ABC transporter ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C6T1	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein PotA	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C526	Chemotaxis protein CheY	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CBE2	3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione hydrolase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CCA3	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase D	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C1L8	Zinc-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C2V6	Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON

A0A023CEG6	Leucine/isoleucine/valine transporter permease subunit	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C9S0	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C6Y9	Metal-chelation protein CHAD	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C800	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C813	(Fe-S)-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C5G1	D-alanine--D-alanine ligase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C6D7	Acyl-CoA thioesterase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CI34	Ribosomal silencing factor RsfS	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C2X1	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CH40	Phosphate:nucleotide phosphotransferase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C5Z8	Metal-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C5P8	TonB-dependent receptor	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C8Z8	Peptide ABC transporter ATP-binding protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C7N6	Major facilitator transporter	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C9D9	3-carboxymuconate cyclase	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023CEF7	Uncharacterized protein	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON
A0A023C740	Cell division protein DedD	Aerobiosis vs. Microaerobiosis	-	ON

2. **Tabla 2A:** Proteínas expresadas diferencialmente después de la exposición al H₂O₂ en aerobiosis.

Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Desde la escritura de esta tesis cambiaron los códigos de identificación UniProt. Para la búsqueda de los códigos unificados utilizar la base de datos UniParc (www.uniprot.org/uniparc)

Accession Number	Nombre	Condiciones	Log2 (FC)	ON/OFF
A0A023CE99	Multidrug transporter AcrB	a-OS vs Aerobiosis	-3.38	-
A0A023C8X2	PTS fructose transporter subunit IIA	a-OS vs Aerobiosis	-2.93	-
A0A023C834	Shikimate dehydrogenase (NADP(+))	a-OS vs Aerobiosis	-2.56	-
A0A023C7M8	Shikimate dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-2.34	-
A0A023CDB3	Bacterioferritin	a-OS vs Aerobiosis	-1.98	-
A0A023C4R7	Integration host factor subunit alpha	a-OS vs Aerobiosis	-1.78	-
A0A023CAU0	Elongation factor P	a-OS vs Aerobiosis	-1.50	-
A0A023CFJ9	Protein-export protein SecB	a-OS vs Aerobiosis	-1.43	-
A0A023CBK5	Peptidase	a-OS vs Aerobiosis	-1.27	-
A0A023C6Z8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CDX1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CAW9	AsnC family transcriptional regulator	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CEW1	Transcriptional regulator	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C5P8	TonB-dependent receptor	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CIL3	RNA polymerase-binding transcription factor DksA	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C4I8	AraC family transcriptional regulator	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C317	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CDU1	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CHJ5	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C9F0	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C4H6	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CCK4	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CEF7	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C7R8	UPF0502 protein PE143B_0119580	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C841	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C2R3	Nucleotide-binding protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CGJ2	ABC transporter	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF

A0A023C771	Chemotaxis protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C536	Peroxidase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C565	Thioredoxin	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C355	Glutathione S-transferase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CDE4	Membrane protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CEC2	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CHC9	Lytic transglycosylase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CGW2	Cell envelope protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CI34	Ribosomal silencing factor RsfS	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CHW8	Ferric uptake regulation protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C5U4	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CHF7	Acyl-CoA dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CEU3	Enoyl-CoA hydratase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C1P0	Acyl-CoA dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C8L3	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CB26	Lactate dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C7J8	Glycine cleavage system H protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CHB7	Alcohol dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C9D9	3-carboxymuconate cyclase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CHW9	Inorganic pyrophosphatase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CCC7	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy- lyase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CFH2	Uroporphyrinogen decarboxylase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C9T0	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CF47	L-aspartate oxidase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CC80	Glycine cleavage system H protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C5G1	D-alanine--D-alanine ligase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C568	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CGC3	Histidine kinase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CCB5	Histidine kinase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C5Q0	Transcription antitermination protein NusB	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C5R1	Cytochrome C	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CFQ8	DNA topoisomerase 4 subunit B	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CGY6	Restriction endonuclease	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CGU1	Integrase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF

A0A023CDA9	Cys-tRNA(Pro)/Cys-tRNA(Cys) deacylase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C4Z8	Cupin	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CAG9	HAD family hydrolase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C740	Cell division protein DedD	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C6U7	SpoVR family protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C798	HopJ type III effector protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CB34	Sulfur oxidation protein SoxZ	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023CF87	Sulfurtransferase	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C5Z8	Metal-binding protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C1L8	Zinc-binding protein	a-OS vs Aerobiosis	-	OFF
A0A023C5I9	50S ribosomal protein L20	a-OS vs Aerobiosis	1.20	-
A0A023CC90	Malonate decarboxylase subunit alpha	a-OS vs Aerobiosis	1.59	-
A0A023CAG1	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	1.63	-
A0A023CFK7	3-dehydroquinate synthase	a-OS vs Aerobiosis	2.05	-
A0A023C887	Quinone oxidoreductase	a-OS vs Aerobiosis	2.38	-
A0A023CC57	Peptidase M16	a-OS vs Aerobiosis	-	ON
A0A023C817	Uncharacterized protein	a-OS vs Aerobiosis	-	ON
A0A023C4X9	Biopolymer transporter ExbB	a-OS vs Aerobiosis	-	ON
A0A023CER7	Acyl-homoserine lactone acylase subunit beta	a-OS vs Aerobiosis	-	ON
A0A023C8W8	Chemotaxis protein	a-OS vs Aerobiosis	-	ON
A0A023C7X8	Oxygen-dependent choline dehydrogenase	a-OS vs Aerobiosis	-	ON
A0A023CCX3	Peptide synthase	a-OS vs Aerobiosis	-	ON
A0A023CFT1	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	a-OS vs Aerobiosis	-	ON

3. **Tabla 3A:** Proteínas expresadas diferencialmente después de la exposición al H₂O₂ en microaerobiosis.

Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Desde la escritura de esta tesis cambiaron los códigos de identificación UniProt. Para la búsqueda de los códigos unificados utilizar la base de datos UniParc (www.uniprot.org/uniparc)

Accession Num.	Nombre	Condiciones	Log ₂ (FC)	ON/OFF
A0A023CF23	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	m-OS vs Microaerobiosis	-2.67	-
A0A023C867	ATP synthase epsilon chain	m-OS vs Microaerobiosis	-1.49	-
A0A023C7B2	Ferritin	m-OS vs Microaerobiosis	-1.48	-
A0A023C4K6	Sugar ABC transporter ATPase	m-OS vs Microaerobiosis	-1.29	-
A0A023CHV5	Fis family transcriptional regulator	m-OS vs Microaerobiosis	-1.12	-
A0A023CIJ8	30S ribosomal protein S15	m-OS vs Microaerobiosis	-1.10	-
A0A023CCX4	Pyridoxine 5'-phosphate synthase	m-OS vs Microaerobiosis	-1.08	-
A0A023CCB4	ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs Microaerobiosis	-1.02	-
A0A023C234	Hemolysin secretion protein D	m-OS vs Microaerobiosis	-1.00	-
A0A023C6R2	Pyrroloquinoline-quinone synthase	m-OS vs Microaerobiosis	-	OFF
A0A023CHT1	Dihydropteroate synthase	m-OS vs Microaerobiosis	-	OFF

A0A023C5N3	Thiol:disulfide interchange protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C7H1	Cold-shock protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CF27	TetR family transcriptional regulator	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CDV2	MarR family transcriptional regulator	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C9N6	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C6E2	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C817	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CAK9	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C558	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C8W9	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CFE8	ABC transporter permease	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C5M8	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CAH9	ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CAT2	Amino acid ABC transporter permease	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C786	Glutathione peroxidase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CAH8	Membrane protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF

A0A023CEK1	Lipoprotein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C5A4	50S ribosomal protein L29	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CH52	Aldehyde dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C3F7	Polyphosphate kinase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C4C7	Glutamate--cysteine ligase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C6Z9	Pyrimidine/purine nucleoside phosphorylase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CEM7	Chromosome partitioning protein ParA	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C5I6	DNA-binding protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C2U6	Short-chain dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C4Q3	Sporulation protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023CC43	ATPase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C869	ATP synthase subunit delta	m-OS vs Microaerobiosi s	-	OFF
A0A023C743	Thioredoxin reductase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.01	-
A0A023C8S9	Probable malate:quinone oxidoreductase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.01	-
A0A023C9R4	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.10	-
A0A023C2S1	Uracil phosphoribosyltransferase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.13	-

A0A023CDV4	Phosphoenolpyruvate synthase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.17	-
A0A023C7F0	Pyruvate kinase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.22	-
A0A023C6Q4	Arginine N-succinyltransferase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.26	-
A0A023CAI1	Aminotransferase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.29	-
A0A023C7S4	S-adenosylmethionine synthase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.43	-
A0A023CDI1	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	m-OS vs Microaerobiosi s	1.49	-
A0A023C8U0	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs Microaerobiosi s	1.50	-
A0A023CBD3	Pyruvate dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.55	-
A0A023C476	Transcriptional regulator (Fragment)	m-OS vs Microaerobiosi s	1.61	-
A0A023CDE9	Aconitate hydratase	m-OS vs Microaerobiosi s	1.61	-
A0A023CE93	ATPase AAA	m-OS vs Microaerobiosi s	1.96	-
A0A023C7F8	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	m-OS vs Microaerobiosi s	1.98	-
A0A023CHS4	NADP-dependent oxidoreductase	m-OS vs Microaerobiosi s	2.22	-
A0A023CD32	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	m-OS vs Microaerobiosi s	2.58	-
A0A023C1K2	Cell division protein ZapE	m-OS vs Microaerobiosi s	2.87	-
A0A023C860	Aldehyde dismutase	m-OS vs Microaerobiosi s	3.26	-

A0A023C7X9	Peptidase M19	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CDX1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CFC2	DeoR family transcriptional regulator	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CAQ7	LuxR family transcriptional regulator	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C697	Probable malate:quinone oxidoreductase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C317	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C7W9	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C8H1	Uncharacterized protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CEG6	Leucine/isoleucine/valine transporter permease subunit	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C9U6	Methionine ABC transporter substrate-binding protein O	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CCJ4	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CGE1	Channel protein TolC	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CD21	Amino acid ABC transporter permease	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C6A0	Methionine import ATP-binding protein MetN	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CHE3	Magnesium transporter	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C8D3	Hemolysin secretion protein D	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON

A0A023C5P0	Chemotaxis protein CheY	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CGH8	Universal stress protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CG88	Alkyl hydroperoxide reductase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CF21	Universal stress protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CGD1	Universal stress protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C4P2	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C5G1	D-alanine--D-alanine ligase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C7D8	Formyltetrahydrofolate deformylase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CA03	Glucokinase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CDH4	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C369	Acyl-CoA dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CEF0	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CGV2	Aldehyde dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C3G8	L-lactate dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C568	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C3E5	Asparagine synthase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON

A0A023C7E8	Serine dehydratase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C8A9	Ornithine monooxygenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C6C1	NADP transhydrogenase subunit alpha	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C4X6	Histidine kinase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C8V8	Peptide chain release factor 3	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CGF1	DNA topoisomerase 4 subunit A	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CGE4	Phosphoribosyl transferase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C581	UvrABC system protein A	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C6A7	Probable GTP-binding protein EngB	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C886	Chromosomal replication initiator protein DnaA	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CFE4	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C4N8	Cell division protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CEY8	2-hydroxyacid dehydrogenase	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023CIM5	Ribosome association toxin RatA	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C8Y7	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON
A0A023C913	Metal-binding protein	m-OS vs Microaerobiosi s	-	ON

4. **Tabla 4A:** Proteínas expresadas diferencialmente después de la exposición al H₂O₂ en microaerobiosis y aerobiosis.

Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Desde la escritura de esta tesis cambiaron los códigos de identificación UniProt. Para la búsqueda de los códigos unificados utilizar la base de datos UniParc (www.uniprot.org/uniparc)

Accession Number	Nombre	Condiciones	Log ₂ (FC)	ON/OFF
A0A023CFE4	Poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	m-OS vs a-OS	-3.77	-
A0A023C466	Glutathione S-transferase	m-OS vs a-OS	-3.72	-
A0A023CC59	Glutamine synthetase	m-OS vs a-OS	-3.62	-
A0A023CGD1	Universal stress protein	m-OS vs a-OS	-3.26	-
A0A023CD56	Homogentisate 1,2-dioxygenase	m-OS vs a-OS	-3.22	-
A0A023C7Y4	Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-3.15	-
A0A023C7X9	Peptidase M19	m-OS vs a-OS	-3.13	-
A0A023CFL0	Urocanate hydratase	m-OS vs a-OS	-3.07	-
A0A023C5S4	Acyl-CoA dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-2.82	-
A0A023C860	Aldehyde dismutase	m-OS vs a-OS	-2.82	-
A0A023C6W1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-2.78	-
A0A023CHX4	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	m-OS vs a-OS	-2.71	-
A0A023CFT8	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-2.70	-
A0A023CBK6	Chemotaxis protein	m-OS vs a-OS	-2.62	-
A0A023C8E2	Pyruvate carboxylase subunit B	m-OS vs a-OS	-2.59	-
A0A023CGI8	Aldehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-2.57	-
A0A023CCL9	Thioredoxin	m-OS vs a-OS	-2.50	-
A0A023CAR8	Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-2.45	-

A0A023CI80	Carbon starvation protein A	m-OS vs a-OS	-2.34	-
A0A023C8Z7	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-2.20	-
A0A023CAQ7	LuxR family transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-2.20	-
A0A023C825	Serine hydroxymethyltransferase	m-OS vs a-OS	-2.19	-
A0A023C8Q9	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	m-OS vs a-OS	-2.18	-
A0A023C5P1	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-2.13	-
A0A023CAZ4	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-2.03	-
A0A023C6R3	Acetyl-coenzyme A synthetase	m-OS vs a-OS	-2.02	-
A0A023CAB4	Peroxiredoxin	m-OS vs a-OS	-2.02	-
A0A023C4P2	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase	m-OS vs a-OS	-2.01	-
A0A023C7B2	Ferritin	m-OS vs a-OS	-2.00	-
A0A023CE88	Type I restriction enzyme R Protein	m-OS vs a-OS	-1.93	-
A0A023CE75	Gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.92	-
A0A023CFL9	Poly(3-hydroxyalkanoate) granule-associated protein PhaF	m-OS vs a-OS	-1.90	-
A0A023CAQ9	Dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.89	-
A0A023C734	Serine/threonine protein kinase	m-OS vs a-OS	-1.89	-
A0A023C6D0	AMP-dependent synthetase	m-OS vs a-OS	-1.86	-
A0A023CGE8	60 kDa chaperonin	m-OS vs a-OS	-1.86	-
A0A023CAI0	Membrane protein	m-OS vs a-OS	-1.84	-
A0A023CCV3	Fumarylacetoacetase	m-OS vs a-OS	-1.83	-
A0A023CGI6	Alcohol dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.78	-
A0A023CD01	ATPase	m-OS vs a-OS	-1.78	-
A0A023CGE4	Phosphoribosyl transferase	m-OS vs a-OS	-1.74	-
A0A023C644	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.69	-

A0A023CAS1	Aldehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.57	-
A0A023CDY1	Cell division protein ZipA	m-OS vs a-OS	-1.56	-
A0A023C6Z0	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.52	-
A0A023CAX6	Gamma-carboxygeranoyl-CoA hydratase	m-OS vs a-OS	-1.52	-
A0A023C8G1	Pyruvate carboxylase subunit A	m-OS vs a-OS	-1.51	-
A0A023C2S4	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.47	-
A0A023CB64	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase	m-OS vs a-OS	-1.44	-
A0A023C2M5	Cytochrome C	m-OS vs a-OS	-1.43	-
A0A023C7G0	H-NS histone	m-OS vs a-OS	-1.38	-
A0A023CB15	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	m-OS vs a-OS	-1.37	-
A0A023CAD7	Acetate permease	m-OS vs a-OS	-1.29	-
A0A023C8Z2	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-1.29	-
A0A023CG92	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	m-OS vs a-OS	-1.28	-
A0A023C519	Isocitrate lyase	m-OS vs a-OS	-1.27	-
A0A023C8R1	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-1.23	-
A0A023CGC4	Crotonase	m-OS vs a-OS	-1.23	-
A0A023CA00	Homoserine dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-1.14	-
A0A023CCB4	ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-1.13	-
A0A023C1B7	Transposase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6R2	Pyrrroloquinoline-quinone synthase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C730	Coenzyme PQQ synthesis protein B	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C4D5	33 kDa chaperonin	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C7H1	Cold-shock protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C9S0	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	m-OS vs a-OS	-	OFF

A0A023CFS5	RNA-binding protein Hfq	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CAJ2	Protease HtpX	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CEX5	Peptidase S9	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C7T4	Zn-dependent protease	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CBK5	Peptidase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C5K6	(P)ppGpp synthetase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C457	Nitrogen regulatory protein P-II 1	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CB30	LysR family transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CA58	XRE family transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CED5	LuxR family transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CHX1	TetR family transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CEQ6	Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C630	Transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6V9	Transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CHC8	Fis family transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6Y7	LysR family transcriptional regulator	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C8W9	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CI16	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C4D3	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CBM4	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C9N6	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CAY5	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C800	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6E2	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF

A0A023CAG5	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C2X1	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C2Q8	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CB82	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CA41	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CIC6	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CGF7	ABC transporter ATP-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C7T7	ABC transporter ATP-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CEU0	Leucine/isoleucine/valine transporter ATP-binding subunit	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CBF3	ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C8X2	PTS fructose transporter subunit IIA	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C3B8	ABC transporter ATP-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CC51	ABC transporter	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C8Z8	Peptide ABC transporter ATP-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CE73	Amino acid APC transporter	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CFE8	ABC transporter permease	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6V5	Polyamine ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CCV8	Glutamine ABC transporter ATP-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6T1	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein PotA	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CFY8	Branched-chain amino acid ABC transporter permease	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C7N6	Major facilitator transporter	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CFX4	Chemotaxis protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CDC1	Chemotaxis protein CheY	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CA81	Chemotaxis protein	m-OS vs a-OS	-	OFF

A0A023CIC3	Chemotaxis protein CheX	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C8W8	Chemotaxis protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C526	Chemotaxis protein CheY	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CER7	Acyl-homoserine lactone acylase subunit beta	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C9F4	Universal stress protein UspA	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CC74	Glutathione synthetase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C5N3	Thiol:disulfide interchange protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CGG5	Universal stress protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C7X1	Glutathione S-transferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C2H7	Damage-inducible protein CinA	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CDK1	2-alkenal reductase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CEE1	Oxidoreductase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CDC6	DSBA oxidoreductase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CEK1	Lipoprotein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C4B8	Peptidoglycan-binding protein LysM	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C8X6	Membrane protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CAH8	Membrane protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6U3	Lipoprotein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CBE6	Membrane protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CCA3	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase D	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C5A4	50S ribosomal protein L29	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CDB3	Bacterioferritin	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CH52	Aldehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CGI7	Alpha-glucan phosphorylase	m-OS vs a-OS	-	OFF

A0A023CC33	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C5T0	CoA-transferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C1Q2	Pyruvate dehydrogenase E1 component	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C5L4	Aldehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6T8	Carbon-nitrogen hydrolase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C2Y3	3-ketoacyl-ACP reductase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C5B7	Long-chain fatty acid--CoA ligase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C390	Xylulose kinase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CGX8	Lactoylglutathione lyase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C464	Acetyl-CoA hydrolase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C1P6	Enoyl-CoA hydratase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CDU5	Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CC90	Malonate decarboxylase subunit alpha	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CAV6	2,4-dienoyl-CoA reductase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CC60	Malonate decarboxylase subunit gamma	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CH23	Alcohol dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C3F7	Polyphosphate kinase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CBV3	Malonate decarboxylase subunit beta	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C2M3	Probable 5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C4I3	Aldehyde dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C272	2-hydroxyacid dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C386	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CGR9	Glycogen debranching protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CG15	Isochorismatase	m-OS vs a-OS	-	OFF

A0A023CCY6	Methionine gamma-lyase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CFB2	Histidine ammonia-lyase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CBQ7	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CFK3	Proline iminopeptidase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CCD0	Amino-acid acetyltransferase O	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C7H7	Histidine triad (HIT) protein O	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C807	Sarcosine oxidase subunit gamma	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CFA5	N-formimino-L-glutamate deiminase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6W8	Anthranilate phosphoribosyltransferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C1W2	Cystathionine beta-lyase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C831	N-methylproline demethylase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C7J3	Glutamine synthetase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C1W9	Cytochrome b	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C4R7	Integration host factor subunit alpha	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CEL9	dCTP deaminase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CAH1	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CE08	Chromosome segregation protein SMC	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CAY8	Exonuclease III	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C5I6	DNA-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CGL0	DNA-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CHG8	GTP-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CHE2	GNAT family acetyltransferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C869	ATP synthase subunit delta	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CCC9	ATPase P	m-OS vs a-OS	-	OFF

A0A023C2U6	Short-chain dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C937	Glutamyl-tRNA reductase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CC43	ATPase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C674	tRNA-dihydrouridine(20/20a) synthase O	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CHA8	GNAT family acetyltransferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6V2	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CAX8	Phenylhydantoinase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CHS3	Laminin	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023CGF6	Sulfurtransferase	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C6Y9	Metal-chelation protein CHAD	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C813	(Fe-S)-binding protein	m-OS vs a-OS	-	OFF
A0A023C4Q2	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	m-OS vs a-OS	1.05	-
A0A023C592	50S ribosomal protein L14	m-OS vs a-OS	1.06	-
A0A023C659	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	m-OS vs a-OS	1.08	-
A0A023CCG3	Transcription termination factor Rho	m-OS vs a-OS	1.09	-
A0A023CAU0	Elongation factor P	m-OS vs a-OS	1.10	-
A0A023C595	30S ribosomal protein S8	m-OS vs a-OS	1.11	-
A0A023C890	ATP synthase subunit alpha	m-OS vs a-OS	1.15	-
A0A023C4F8	Membrane protein	m-OS vs a-OS	1.17	-
A0A023C1J9	30S ribosomal protein S9	m-OS vs a-OS	1.19	-
A0A023C5B4	50S ribosomal protein L16	m-OS vs a-OS	1.19	-
A0A023CDA4	ABC transporter	m-OS vs a-OS	1.20	-
A0A023CHI3	ABC transporter ATP-binding protein	m-OS vs a-OS	1.20	-
A0A023C1C4	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta (Fragment)	m-OS vs a-OS	1.21	-

A0A023C5C2	Keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	m-OS vs a-OS	1.23	-
A0A023C9V7	50S ribosomal protein L19	m-OS vs a-OS	1.24	-
A0A023C3C9	Protein RecA	m-OS vs a-OS	1.26	-
A0A023CAQ8	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	m-OS vs a-OS	1.30	-
A0A023CDT6	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II	m-OS vs a-OS	1.30	-
A0A023C5B5	50S ribosomal protein L1	m-OS vs a-OS	1.30	-
A0A023CE87	Flagellin	m-OS vs a-OS	1.34	-
A0A023CE84	Lysine--tRNA ligase	m-OS vs a-OS	1.35	-
A0A023CCV4	ATP-dependent RNA helicase RhlB	m-OS vs a-OS	1.40	-
A0A023C5C0	50S ribosomal protein L11	m-OS vs a-OS	1.41	-
A0A023C5B6	50S ribosomal protein L23	m-OS vs a-OS	1.43	-
A0A023CCS5	Ligand-gated channel	m-OS vs a-OS	1.45	-
A0A023CFS4	50S ribosomal protein L9	m-OS vs a-OS	1.46	-
A0A023C5W6	30S ribosomal protein S7	m-OS vs a-OS	1.49	-
A0A023CH69	Gamma-glutamyl phosphate reductase	m-OS vs a-OS	1.51	-
A0A023C5X4	50S ribosomal protein L10	m-OS vs a-OS	1.52	-
A0A023CD25	Glycerol kinase	m-OS vs a-OS	1.54	-
A0A023CE49	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase	m-OS vs a-OS	1.58	-
A0A023CFS3	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	m-OS vs a-OS	1.58	-
A0A023CAV9	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	m-OS vs a-OS	1.59	-
A0A023C5S8	Catalase	m-OS vs a-OS	1.59	-
A0A023C7Y0	ATP-dependent RNA helicase RhlE	m-OS vs a-OS	1.61	-
A0A023C578	50S ribosomal protein L17	m-OS vs a-OS	1.65	-
A0A023CHC2	Oxaloacetate decarboxylase	m-OS vs a-OS	1.68	-

A0A023C7D2	Tol-Pal system protein TolQ	m-OS vs a-OS	1.70	-
A0A023C5M9	Oligopeptidase A	m-OS vs a-OS	1.82	-
A0A023CA68	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	m-OS vs a-OS	1.87	-
A0A023C2V3	Histidinol-phosphate aminotransferase	m-OS vs a-OS	1.87	-
A0A023C2L8	50S ribosomal protein L13	m-OS vs a-OS	1.88	-
A0A023C4X9	Biopolymer transporter ExbB	m-OS vs a-OS	1.95	-
A0A023C2Q0	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	m-OS vs a-OS	2.01	-
A0A023CD32	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	m-OS vs a-OS	2.03	-
A0A023C482	Transcription accessory protein	m-OS vs a-OS	2.10	-
A0A023C4Q7	O-succinylhomoserine sulfhydrylase	m-OS vs a-OS	2.18	-
A0A023CG72	Bifunctional protein PutA	m-OS vs a-OS	2.18	-
A0A023CHV7	GTPase	m-OS vs a-OS	2.37	-
A0A023C4J2	Nitrate reductase	m-OS vs a-OS	2.49	-
A0A023C589	50S ribosomal protein L6	m-OS vs a-OS	2.68	-
A0A023C9W8	2-isopropylmalate synthase	m-OS vs a-OS	2.91	-
A0A023CDW7	Coproporphyrinogen-III oxidase	m-OS vs a-OS	3.06	-
A0A023C651	Succinylglutamate desuccinylase	m-OS vs a-OS	3.19	-
A0A023CHR6	Chaperone protein DnaJ	m-OS vs a-OS	3.29	-
A0A023CAX4	Ornithine cyclodeaminase	m-OS vs a-OS	3.51	-
A0A023CF47	L-aspartate oxidase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CBJ6	Molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaA	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C568	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CBU6	Molybdenum cofactor biosynthesis protein B	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C4Q4	Short-chain dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	ON

A0A023C762	Dihydropteridine reductase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C6Z8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C9W5	Signal recognition particle protein	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C4Y6	Energy transducer TonB	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CHJ5	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C317	Uncharacterized protein	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C697	Probable malate:quinone oxidoreductase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CB10	ABC transporter substrate-binding protein	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C8D3	Hemolysin secretion protein D	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C6A0	Methionine import ATP-binding protein MetN	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CG10	Acyl-homoserine lactone acylase subunit beta	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C536	Peroxidase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CHG9	Catalase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C9T0	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CEC2	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C4E8	Thioesterase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CEU6	Aldolase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CDH4	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CDX1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C5G1	D-alanine--D-alanine ligase O	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C7E8	Serine dehydratase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C958	Aspartyl beta-hydroxylase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C8A9	Ornithine monooxygenase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C6H5	Peptide synthase	m-OS vs a-OS	-	ON

A0A023C5X8	Nitrous-oxide reductase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CFQ8	DNA topoisomerase 4 subunit B	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C3S1	Ribonucleoside-triphosphate reductase	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CBA1	AMP-binding protein	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C7R8	UPF0502 protein PE143B_0119580	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C881	Alpha-2-macroglobulin	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023CBX2	ATPase AAA	m-OS vs a-OS	-	ON
A0A023C5E7	Isomerase	m-OS vs a-OS	-	ON

5. **Tabla 5A:** Genes expresados diferencialmente después de la exposición al H₂O₂ en microaerobiosis.

Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Nombre	Función	Categorías funcionales	Locus Tag	FC
<i>hscB</i>	Chaperone protein HscB	Chaperonas		2.71
<i>cspA</i>	Cold shock protein CspA	Chaperonas	PE143B_0108770	5.84
	Cold-shock protein. DNA-binding	Chaperonas	PE143B_0120120	-5.40
<i>cspG</i>	Cold shock protein CspG	Chaperonas	PE143B_0124875	-4.18
	heat shock protein. HSP20 family	Chaperonas	PE143B_0129760	-3.86
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ppiB (EC 5.2.1.8)	Chaperonas	PE143B_0113795	-3.58
<i>cspA</i>	Cold shock protein CspA	Chaperonas	PE143B_0106405	-2.67
<i>nfuA</i>	NfuA Fe-S protein maturation	Chaperonas	PE143B_0112720	-2.28
	heat shock protein Hsp20	Chaperonas	PE143B_0127215	-2.24
	Prophage baseplate assembly protein V	Fagos / Transposones	PE143B_0112120	2.73
	Phage protein U	Fagos / Transposones	PE143B_0128845	3.47
	Integrase regulator R	Fagos / Transposones	PE143B_0114785	6.67
	Phage terminase. small subunit	Fagos / Transposones	PE143B_0122075	3.88
	Transposase and inactivated derivatives	Fagos / Transposones	PE143B_0110975	26.00
	Phage prohead protease. HK97 family	Fagos / Transposones	PE143B_0109790	-12.00
<i>fxsA</i>	FxsA protein	Fagos / Transposones	PE143B_0115640	-3.64
	integrase. putative	Fagos / Transposones	PE143B_0121465	-3.41
<i>cidA</i>	Holin-like protein CidA	Fagos / Transposones	PE143B_0120565	-3.07
	Xaa-Pro aminopeptidase (EC 3.4.11.9)	Proteasas	PE143B_0111330	2.94
	Proline iminopeptidase (EC 3.4.11.5)	Proteasas	PE143B_0104355	-5.57
	Aminopeptidase N	Proteasas	PE143B_0128475	-2.78
<i>fliN</i>	Flagellar motor switch protein FliN	Movilidad / Adherencia		3.60
<i>pgaD</i>	Biofilm PGA synthesis auxiliary protein PgaD	Movilidad / Adherencia	PE143B_0115930	7.75

<i>flhC</i>	Flagellar transcriptional activator FlhC	Movilidad / Adherencia	PE143B_0126745	9.33
<i>fliJ</i>	Flagellar protein FliJ	Movilidad / Adherencia	PE143B_0108700	9.76
	Beta-fimbriae chaperone protein	Movilidad / Adherencia	PE143B_0111455	8.50
<i>fliQ</i>	Flagellar biosynthesis protein FliQ	Movilidad / Adherencia	PE143B_0108750	29.67
	Cell filamentation protein fic	Movilidad / Adherencia	PE143B_0125425	-3.63
	heme uptake regulator	Hierro	PE143B_0129890	4.61
	Ferrichrome-iron receptor	Hierro	PE143B_0126225	3.83
<i>hbO</i>	Hemoglobin-like protein HbO	Hierro	PE143B_0110705	-8.00
	Bacterioferritin	Hierro	PE143B_0109505	-3.03
<i>fur</i>	Ferric uptake regulation protein FUR	Hierro	PE143B_0116260	-2.49
<i>recX</i>	Regulatory protein RecX	Sensores / Reguladores		2.79
<i>cheR</i>	Chemotaxis protein methyltransferase CheR (EC 2.1.1.80)	Sensores / Reguladores	PE143B_0126050	3.89
	Transcriptional regulator. IclR family	Sensores / Reguladores	PE143B_0118170	3.93
	Phytochrome. two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	Sensores / Reguladores	PE143B_0120685	5.50
	transcriptional regulator. sugar- binding family	Sensores / Reguladores	PE143B_0122290	6.25
	Integrase regulator R	Sensores / Reguladores	PE143B_0114785	6.67
	transcriptional regulator. LysR family	Sensores / Reguladores	PE143B_0109075	6.80
	Carbon storage regulator	Sensores / Reguladores	PE143B_0122400	-6.13
	diguanylate cyclase/phosphodiesterase (GGDEF & EAL domains) with PAS/PAC sensor(s)	Sensores / Reguladores	PE143B_0124325	-4.71
	Transcriptional regulator. TetR family	Sensores / Reguladores	PE143B_0114100	-4.69
<i>cbrA</i>	Two-component sensor CbrA: intracellular carbon:nitrogen balance	Sensores / Reguladores	PE143B_0118125	-4.27
	response regulator	Sensores / Reguladores		-3.97

	methyl-accepting chemotaxis transducer	Sensores / Reguladores	PE143B_0115710	-3.92
<i>rpoN</i>	RNA polymerase sigma-54 factor RpoN	Sensores / Reguladores	PE143B_0128370	-3.46
	Transcriptional regulator. ArsR family	Sensores / Reguladores	PE143B_0100235	-3.17
<i>yhbH</i>	Ribosome hibernation protein YhbH	Sensores / Reguladores	PE143B_0128360	-3.22
<i>glnK</i>	Nitrogen regulatory protein P-II. glnK	Sensores / Reguladores	PE143B_0125755	-3.08
<i>ompR</i>	Two-component system response regulator OmpR	Sensores / Reguladores	PE143B_0125365	-3.07
<i>ptsN</i>	PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN	Sensores / Reguladores	PE143B_0128355	-3.05
	Predicted signal transduction protein	Sensores / Reguladores	PE143B_0110960	-3.05
	GGDEF domain/EAL domain protein	Sensores / Reguladores	PE143B_0125295	-2.59
	GAF domain/GGDEF domain/EAL domain protein	Sensores / Reguladores	PE143B_0103010	-2.56
<i>prkA</i>	Serine protein kinase (prkA protein). P-loop containing	Sensores / Reguladores	PE143B_0121055	-4.08
<i>pqqC</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein C	Viraminas / Cofactores	PE143B_0120940	4.71
	Phosphopantothenoilcysteine synthetase/decarboxylase	Viraminas / Cofactores		3.67
	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (EC 1.4.3.5)	Viraminas / Cofactores		-2.73
	Octaprenyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.90) / Dimethylallyltransferase (EC 2.5.1.1) / (2E.6E)-farnesyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.10) / Geranylgeranyl diphosphate synthase (EC 2.5.1.29)	Viraminas / Cofactores	PE143B_0123535	-3.35
<i>katA</i>	Catalase (EC 1.11.1.6)	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0123705	16.28

	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C-like protein	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0111245	3.17
<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase protein C (EC 1.6.4.-)	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0102490	4.37
<i>norR</i>	Functional role page for Anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator NorR	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0116220	5.40
<i>grx</i>	Glutaredoxin	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0121455	8.83
<i>ahpF</i>	Alkyl hydroperoxide reductase protein F (EC 1.6.4.-)	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0124110	10.32
	SelT/selW/selH selenoprotein domain	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0108555	14.00
<i>ohr</i>	Organic hydroperoxide resistance protein	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0114395	49.50
	uncharacterized peroxidase-related enzyme	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0125925	not present
	Nitric-oxide reductase subunit C (EC 1.7.99.7)	Estrés oxidativo - nitrosativo	PE143B_0111850	-4.04
	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain I (EC 1.6.5.3)	Reductasas / Oxigenasas	PE143B_0124025	3.46
	Alkanesulfonate monooxygenase (EC 1.14.14.5)	Reductasas / Oxigenasas	PE143B_0130065	22.00
	Rrf2-linked NADH-flavin reductase	Reductasas / Oxigenasas	PE143B_0107265	8.00
	Nitrilotriacetate monooxygenase component A (EC 1.14.13.-)	Reductasas / Oxigenasas	PE143B_0111590	12.67
	NADH ubiquinone oxidoreductase chain A (EC 1.6.5.3)	Reductasas / Oxigenasas	PE143B_0123990	-2.54
	Serine acetyltransferase (EC 2.3.1.30)	Aminoacidos	PE143B_0116310	20.00
	glutamine synthetase family protein	Aminoacidos	PE143B_0119435	4.00
<i>ssuF</i>	Organosulfonate utilization protein SsuF	Aminoacidos	PE143B_0116470	4.36
	glutamine amidotransferase. class I	Aminoacidos	PE143B_0106950	6.73
	phosphoribosyltransferase	Aminoacidos	PE143B_0127710	-7.91

<i>phnA</i>	Alkylphosphonate utilization operon protein PhnA	Aminoacidos	PE143B_0120445	-3.63
<i>glyA</i>	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	Aminoacidos		-2.55
	Aminomethyltransferase (glycine cleavage system T protein) (EC 2.1.2.10)	Aminoacidos	PE143B_0111300	-2.32
<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.17)	Aminoacidos		-3.76
	putative cytochrome P450 hydroxylase	Citocromos	PE143B_0106965	4.30
	Cytochrome c2	Citocromos	PE143B_0120700	-28.00
	Cytochrome oxidase biogenesis protein Sco1/SenC/PrrC. putative copper metallochaperone	Citocromos	PE143B_0122940	-12.00
	Cytochrome c-551 (Cytochrome c551) (Cytochrome C8)	Citocromos	PE143B_0111830	-3.23
	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)	Citocromos	PE143B_0118095	-3.06
	Cyanide insensitive terminal oxidase. putative subunit III	Citocromos	PE143B_0110060	-8.33
	Copper resistance protein C precursor	Resistencias		-10.00
	Ethidium bromide-methyl viologen resistance protein EmrE	Resistencias	PE143B_0105005	-8.00
	Trans-aconitate 2-methyltransferase (EC 2.1.1.144)	Resistencias	PE143B_0123680	-7.33
	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	Resistencias	PE143B_0100180	-3.40
	ABC-type transport system involved in resistance to organic solvents. permease component USSDB6A	Resistencias	PE143B_0123090	-3.31
	Branched-chain amino acid transport ATP-binding protein LivG (TC 3.A.1.4.1)	Transportadores y Canales	PE143B_0124160	8.50
	Small-conductance mechanosensitive channel	Transportadores y Canales	PE143B_0108260	6.50

	TRAP dicarboxylate transporter. DctM subunit. unknown substrate 7	Transportadores y Canales	PE143B_0126960	5.20
	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily	Transportadores y Canales	PE143B_0109375	-8.67
	Sodium-dependent transporter	Transportadores y Canales	PE143B_0127515	-7.00
	Acyl carrier protein	Transportadores y Canales	PE143B_0122170	-3.86
<i>potI</i>	Putrescine transport system permease protein PotI (TC 3.A.1.11.2)	Transportadores y Canales	PE143B_0111160	-2.90
	Phosphocarrier protein. nitrogen regulation associated	Transportadores y Canales	PE143B_0128345	-4.17
	Nitrate/nitrite transporter	Transportadores y Canales	PE143B_0126695	-12.00
	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Lipidos / Membrana	PE143B_0117195	3.15
	putative membrane protein	Lipidos / Membrana	PE143B_0105125	6.10
	PROBABLE MEMBRANE PROTEIN	Lipidos / Membrana	PE143B_0125010	6.50
	Lipase	Lipidos / Membrana	PE143B_0114400	7.58
	SCP-2 sterol transfer family protein	Lipidos / Membrana	PE143B_0111975	-5.45
	CDP-diacylglycerol--glycerol-3- phosphate 3- phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.5)	Lipidos / Membrana	PE143B_0119330	-3.20
	Stress induced hydrophobic peptide	Lipidos / Membrana		-11.50
	Lipoprotein LppL-related protein	Lipidos / Membrana		-6.68
<i>oprI</i>	outer membrane lipoprotein OprI	Lipidos / Membrana	PE143B_0103055	-6.56
	Lipoprotein. putative	Lipidos / Membrana	PE143B_0113995	-5.00
	Lipoprotein	Lipidos / Membrana	PE143B_0121735	-4.48
	outer membrane lipoprotein. putative	Lipidos / Membrana		-2.41
	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (EC 1.1.1.133)	Lipidos / Membrana	PE143B_0123650	-4.79
	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of	Metabolismo del Carbono	PE143B_0104840	3.66

pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12)			
2-hydroxy-3-oxopropionate reductase (EC 1.1.1.60)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0114120	3.00
4-hydroxycinnamoyl CoA hydratase/lyase (Enoyl-CoA hydratase/lyase) (EC 4.2.1.17)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0127740	4.27
Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0100250	5.20
Butyryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.2)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0112405	7.00
Isochorismate pyruvate-lyase (EC 4.-.-.-)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0101215	-12.00
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. putative	Metabolismo del Carbono	PE143B_0124095	-5.60
Enoyl-CoA hydratase [valine degradation] (EC 4.2.1.17)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0130000	-5.00
Acetyl-CoA synthetase (ADP- forming) alpha and beta chains. putative	Metabolismo del Carbono	PE143B_0103285	-4.28
Acetyl-CoA acetyltransferase (EC 2.3.1.9)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0105725	-3.09
Fructokinase (EC 2.7.1.4)	Metabolismo del Carbono	PE143B_0127415	-6.50
Phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18)	Modificaciones al DNA	PE143B_0121155	3.01
Exodeoxyribonuclease V alpha chain (EC 3.1.11.5)	Modificaciones al DNA	PE143B_0120295	3.20
Cytosine deaminase (EC 3.5.4.1)	Modificaciones al DNA	PE143B_0114900	3.11
Endo/excinuclease domain protein	Modificaciones al DNA	PE143B_0108995	11.00
DNA-3-methyladenine glycosylase (EC 3.2.2.20)	Modificaciones al DNA	PE143B_0118470	-5.43
Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	Modificaciones al DNA	PE143B_0115290	-2.93
DNA-binding protein HU. form N	Modificaciones al DNA	PE143B_0109105	-2.32
3'-to-5' oligoribonuclease (orn)	Modificaciones al DNA	PE143B_0105120	-8.00
anaerobic ribonucleoside- triphosphate reductase	Modificaciones al DNA	PE143B_0126650	-5.03

	DNA-binding protein inhibitor Id-2-related protein	Modificaciones al DNA	PE143B_0125825	-3.92
	N-acylglucosamine 2-epimerase (EC 5.1.3.8)	Otros	PE143B_0125260	-19.50
	Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein MobA	Otros	PE143B_0114230	-5.47
	Choline dehydrogenase (EC 1.1.99.1)	Otros	PE143B_0119450	-3.56
	FIG048548: ATP synthase protein I2	Otros		0.07
	Intracellular septation protein IspA	Otros	PE143B_0120215	0.13
	Chromosome segregation ATPases	Otros	PE143B_0121725	0.29
	Agmatinase (EC 3.5.3.11)	Otros	PE143B_0108335	0.20
	GCN5-related N-acetyltransferase	Otros	PE143B_0129000	0.29
<i>mreC</i>	Rod shape-determining protein MreC	Otros	PE143B_0128295	0.33
	tRNA-Phe-GAA	Transcripción / Traducción	-	-0.32
	tRNA-Arg-CCG	Transcripción / Traducción	-	-0.30
	Ribosome modulation factor	Transcripción / Traducción	-	-0.99
	tRNA-Thr-GGT	Transcripción / Traducción	-	-0.91
	tRNA-Thr-TGT	Transcripción / Traducción	-	-0.91
	Ribosomal protein L11 methyltransferase (EC 2.1.1.-)	Transcripción / Traducción	-	-0.73
	tRNA (cytosine34-2'-O)-methyltransferase (EC 2.1.1.-)	Transcripción / Traducción	-	-6.75
	Arginine-tRNA-protein transferase (EC 2.3.2.8)	Transcripción / Traducción	-	-0.48
	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridine synthase TusD	Transcripción / Traducción	-	-0.44
	LSU ribosomal protein L31p	Transcripción / Traducción	-	-0.30
	LSU ribosomal protein L28p	Transcripción / Traducción	-	-0.33
	Valyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.9)	Transcripción / Traducción	-	3.20
	Transcription elongation factor hypothetical protein	Transcripción / Traducción	-	4.05
	hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0105360	2.94
	hypothetical protein	Hipotéticas		2.99

hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0114585	3.00
FIG00954921: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0116080	5.47
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0107835	3.92
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0130545	4.30
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0101550	4.42
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0120725	4.94
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0111970	5.10
FIG00954921: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0116080	5.47
hypothetical protein	Hipotéticas		5.88
Uncharacterized protein ImpC	Hipotéticas	PE143B_0118305	6.00
putative membrane protein	Hipotéticas	PE143B_0105125	6.10
FIG00953394: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0116215	5.82
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0116215	6.25
PROBABLE MEMBRANE PROTEIN	Hipotéticas	PE143B_0125010	6.50
FIG00954612: hypothetical protein	Hipotéticas		6.43
hypothetical protein	Hipotéticas		6.55
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0101555	8.17
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0112165	8.50
FIG00958400: hypothetical protein	Hipotéticas		16.50
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0112285	4.78
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0104285	4.64
FIG00956396: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0117790	4.50
hypothetical protein	Hipotéticas		19.00
lipoprotein. putative	Hipotéticas	PE143B_0114160	0.00
hypothetical protein	Hipotéticas		-35.00
Hypothetical membrane protein. possible involvement in cytochrome functioning/assembly	Hipotéticas	PE143B_0130125	-15.75
hypothetical protein	Hipotéticas		-7.91
FIG00955717: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0112970	-7.40

hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0118085	-7.18
FIG00953722: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0124335	-7.15
hypothetical protein	Hipotéticas		-7.00
FIG00967676: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0126440	-7.00
FIG00957944: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0102265	-6.88
FIG00958504: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0117235	-6.71
FIG00956804: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0118330	-6.50
FIG00953551: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0108285	-6.16
FIG00953368: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0108040	-6.00
hypothetical protein	Hipotéticas		-6.00
FIG00954461: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0128945	-5.64
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0106215	-5.54
FIG00953497: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0101860	-5.50
FIG00955916: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0117810	-5.42
FIG00964490: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0125140	-5.06
FIG00958654: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0130275	-4.82
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0102465	-4.55
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0115990	-4.52
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0118100	-4.38
hypothetical protein	Hipotéticas		-4.37
FIG00953403: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0125630	-4.36
FIG00954216: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0101955	-4.25
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0123225	-4.25
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0104055	-3.98

	FIG00965651: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0119535	-3.92
	FIG00953549: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0122995	-3.89
	lipoprotein. putative	Hipotéticas	PE143B_0114235	-25.00
	hypothetical protein	Hipotéticas		-19.00
	FIG00959364: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0106625	-13.79
	hypothetical protein	Hipotéticas		-11.54
	hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0125170	-10.00
	lipoprotein. putative	Hipotéticas	PE143B_0115440	-9.67
	hypothetical protein	Hipotéticas		-9.05
	hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0109555	-9.00
	putative aminotransferase	Hipotéticas	PE143B_0116465	-7.67
	FIG00954215: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0125830	-7.63
	Conserved hypothetical protein (perhaps related to histidine degradation)	Hipotéticas	PE143B_0104315	-6.55
	FIG00956405: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0128130	-16.17
	NLP/P60 family protein	Hipotéticas	PE143B_0110800	-6.81
	FIG006220: Hypothetical MbtH-like protein	Hipotéticas	PE143B_0121325	-5.82
	hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0124765	-5.30
	hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0111960	-5.24
	putative cytoplasmic protein	Hipotéticas	PE143B_0107345	-5.41
<i>heR1</i>	probable protein methyltransferase	Hipotéticas	PE143B_0105995	-4.12
	hypothetical protein	Hipotéticas		-3.66
	Uncharacterized glutathione S-transferase-like protein	Hipotéticas	PE143B_0127560	-3.86
	FIG00953563: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0119065	-3.75
	hypothetical protein	Hipotéticas		-3.63
	FIG00954896: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0101105	-3.49

Hypothetical nudix hydrolase YeaB	Hipotéticas	PE143B_0115450	-3.53
FIG00953718: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0118335	-3.46
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0110610	-3.45
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0126610	-3.25
FIG00954962: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0125465	-3.24
FIG00953390: hypothetical protein	Hipotéticas		-3.23
FIG00954373: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0128575	-3.15
FIG00954170: hypothetical protein	Hipotéticas		-2.66
FIG00960995: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0119475	-2.55
FIG00954771: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0120885	-2.51
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0110710	-2.51
FIG00954150: hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0123140	-2.44
hypothetical protein	Hipotéticas	PE143B_0106505	-2.14
putative MutT/Nudix family protein	Hipotéticas		-8.50
Putative virulence factor	Hipotéticas		-3.43
integrase. putative	Hipotéticas	PE143B_0121465	-3.41

6. **Tabla 6A:** sRNAs *antisense* con expresión diferencial en Microaerobiosis vs. Aerobiosis
Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

sRNAs Antisense				
Microaerobiosis vs. Aerobiosis				
Nombre	Antisense a	Largo (nt)	Dirección	Veces de cambio
sRNA1136	LysR family transcriptional regulator	317	+	58.45
sRNA1236	Cold shock protein CspA	125	+	-2.59
sRNA1731	hypothetical protein	137	+	12.44

sRNA3324	hypothetical protein	94	-	2.57
sRNA4283	hypothetical protein	98	-	4.19
sRNA5597	RecA protein	102	+	3.06
sRNA5918	hypothetical protein	3067	+	-3.68

7. **Tabla 7A:** sRNAs *antisense* con expresión diferencial en m-OS vs. Microaerobiosis
Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

sRNAs Antisense m-OS vs. Microaerobiosis				
Nombre	Antisense a	Largo	Dirección	Veces de cambio
sRNA1136	LysR family transcriptional regulator	317	+	-2.33
sRNA1236	Cold shock protein CspA	125	+	-8.50
sRNA1731	hypothetical protein	137	+	-3.16
sRNA239	hypothetical protein	113	+	-2.55
sRNA3324	hypothetical protein	94	-	-2.85
sRNA3473	hypothetical protein	127	+	-2.35
sRNA4173	hypothetical protein	162	-	-2.55
sRNA4283	hypothetical protein	98	-	-9.42
sRNA5525	hypothetical protein	75	-	-7.66
sRNA5597	RecA protein	102	+	-11.06
sRNA5921	hypothetical protein	1683	+	-2.86

8. **Tabla 8A:** sRNAs en *trans* con expresión diferencial en Microaerobiosis vs. Aerobiosis
Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Trans encoded sRNAs Microaerobiosis vs. Aerobiosis				
Nombre	Función	Largo	Dirección	Veces de cambio
sRNA2		113	-	3.37
sRNA3		166	-	2.82
sRNA4		151	-	6.53
sRNA6		99	+	6.79
sRNA11		176	-	6.32

sRNA14		145	-	2.05
sRNA17		101	+	7.48
sRNA21		163	+	-7.29
sRNA30		144	-	11.11
sRNA40		276	+	103.40
sRNA43		103	+	11.62
sRNA44		82	+	14.14
sRNA54		92	-	10.60
sRNA55		157	+	-2.56
sRNA58		88	+	2.73
sRNA60		131	+	2.50
sRNA61		143	-	4.62
sRNA69		108	+	318.75
sRNA80		84	-	27.69
sRNA85		81	-	-2.34
sRNA88	SucC	156	-	-3.46
sRNA91		123	-	-2.04
sRNA92		135	-	-3.62
sRNA95		131	-	2.18
sRNA98		143	+	9.25
sRNA102		112	+	-5.63
sRNA105		97	+	2.38
sRNA106		94	-	11.38
sRNA109		135	+	2.92
sRNA110		128	+	2.48
sRNA111		93	-	-2.18
sRNA113		74	-	-4.96
sRNA125		72	-	-3.58
sRNA127		130	+	-8.85
sRNA129		147	+	4.70
sRNA130		100	+	3.00
sRNA132		136	-	8.40
sRNA134		138	+	6.22
sRNA136		272	-	4.53
sRNA143		94	+	32.43
sRNA147		85	-	-3.13
sRNA150		138	-	2.37
sRNA154		172	+	2.20

sRNA161		190	-	-3.55
sRNA167		73	-	-2.21
sRNA169		132	+	2.28
sRNA177	Alpha_RBS	129	-	-8.65
sRNA187		279	-	-4.29
sRNA195		118	-	-5.72
sRNA196		217	-	-2.11
sRNA199		78	-	-28.86
sRNA200		198	-	-4.14
sRNA201		117	-	-4.21
sRNA207	RtT	107	+	3.26
	salmonella tyr operon			
sRNA203		164	-	-7.13
sRNA206		116	-	-3.41
sRNA208		381	+	6.37
sRNA211		173	+	11.82
sRNA212		264	+	7.21
sRNA215		162	+	-4.12
sRNA217		97	+	-14.95
sRNA219		91	-	40.20
sRNA220		104	-	24.00
sRNA221		116	+	226.50
sRNA225		208	-	40.50
sRNA230		123	-	2.75
sRNA231		200	-	4.46
sRNA232		109	-	2.23
sRNA235		70	-	2.03
sRNA241		103	-	2.13
sRNA242		215	+	14.87
sRNA248		211	+	2.40
sRNA247		211	-	3.20

9. **Tabla 9A:** sRNAs en *trans* con expresión diferencial en m-OS vs. Microaerobiosis
 Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Trans encoded sRNAs m-OS vs. Microaerobiosis				
Nombre	Función	Largo	Dirección	Veces de cambio
sRNA6		99	+	-3.07
sRNA7		378	-	-13.42
sRNA9		133	-	-11.27
sRNA10		106	-	-16.25
sRNA11		176	-	-2.66
sRNA13		244	-	-3.92
sRNA14		145	-	-4.80
sRNA16		371	+	-5.44
sRNA19		118	+	-3.26
sRNA21		163	+	-3.10
sRNA22	RNA P29	368	-	-15.10
sRNA23		131	+	-10.10
sRNA25		222	+	2.92
sRNA26		86	-	-9.75
sRNA31		390	-	-2.85
sRNA43		103	+	2.70
sRNA58		88	+	-3.23
sRNA66		219	-	-2.12
sRNA78		116	+	4.64
sRNA83		88	+	-4.83
sRNA84		168	-	-16.22
sRNA85		81	-	-2.94
sRNA87		91	+	-2.94
sRNA105		97	+	-8.25
sRNA106		94	-	-4.63
sRNA111		93	-	-3.81
sRNA113		74	-	-5.38
sRNA121		345	+	-3.91
sRNA122		150	+	3.53
sRNA123		92	-	-5.68
sRNA127		130	+	-5.20
sRNA129		147	+	-2.41

sRNA138		153	-	-4.77
sRNA142		195	+	-4.70
sRNA144		114	-	-22.17
sRNA147		85	-	-2.65
sRNA161		190	-	-4.06
sRNA166		73	-	-3.12
sRNA167		73	-	-11.37
sRNA169		132	+	2.05
sRNA182		175	-	2.14
sRNA207	RtT salmonella tyr operon	107	+	-3.42
sRNA203		164	-	-7.73
sRNA212		264	+	-4.35
sRNA215		162	+	-3.70
sRNA217		97	+	-2.52
sRNA219		91	-	-7.73
sRNA221		116	+	-3.87
sRNA225		208	-	-6.02
sRNA227		294	-	2.53
sRNA234		85	+	-3.34
sRNA235		70	-	2.50
sRNA240		246	-	-2.98
sRNA248		211	+	-3.02
sRNA247		211	-	-3.44
sRNA250		232	+	2.90
sRNA251		166	-	-3.82
sRNA255		80	-	-2.20
sRNA257		74	-	4.55
sRNA261		107	-	-2.63
sRNA262		128	-	-8.65
sRNA263		216	-	-3.29

10. **Tabla 10A:** Genes expresados diferencialmente después de la exposición al GSNO en microaerobiosis.

Los números negativos y positivos indican represión y sobre-expresión, respectivamente.

Nombre	Logus tag	Función	Veces de cambio
		5S RNA	-4,83
		hypothetical protein	-3,00
	PE143B_0106760	Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins	-3,00
		hypothetical protein	-3,00
	PE143B_0110430	Tol biopolymer transport system, TolR protein	-3,00
	PE143B_0121535	hypothetical protein	-2,50
	PE143B_0110705	Hemoglobin-like protein HbO	-2,16
		hypothetical protein	-2,12
	PE143B_0105520	hypothetical protein	-2,11
	PE143B_0100180	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	-2,10
	PE143B_0126955	TRAP dicarboxylate transporter, DctQ subunit, unknown substrate 7	-2,07
	PE143B_0120985	hypothetical protein	-2,06
	PE143B_0103420	hypothetical protein	-2,05
	PE143B_0100305	Sialic acid transporter (permease) NanT	-2,00
	PE143B_0129925	hcp protein	-2,00
	PE143B_0110150	probable transcriptional regulator	-2,00
	PE143B_0120090	Outer membrane porin, OprD family	-2,00
	PE143B_0102055	Adenylate cyclase (EC 4.6.1.1)	-2,00
	PE143B_0126295	Phenol hydroxylase, FAD- and [2Fe-2S]-containing reductase component DmpP	-2,00
	PE143B_0126775	Flagellar M-ring protein FlIF	-2,00
	PE143B_0102915	hypothetical protein	-2,00
		hypothetical protein	-1,98
		hypothetical protein	-1,96
		hypothetical protein	-1,91
	PE143B_0102795	Glycosyl transferase, group 2 family protein	-1,90
	PE143B_0119255	hypothetical protein	-1,89
	PE143B_0122075	Phage terminase, small subunit	-1,88
	PE143B_0127420	hypothetical protein	-1,88
	PE143B_0100675	FIG00955339: hypothetical protein	-1,86
	PE143B_0128215	hypothetical protein	-1,86
		hypothetical protein	-1,85

PE143B_0128235	hypothetical protein	-1,85
PE143B_0114825	FIG041388: hypothetical protein in PFGI-1-like cluster	-1,82
	Mobile element protein	-1,82
PE143B_0100890	hypothetical protein	-1,82
PE143B_0121785	hypothetical protein	-1,81
PE143B_0121545	hypothetical protein	-1,80
PE143B_0102875	VgrG protein	-1,80
PE143B_0119345	regulatory protein, putative	-1,80
	hypothetical protein	-1,79
PE143B_0128225	hypothetical protein	-1,79
	hypothetical protein	-1,78
PE143B_0119725	Glycine N-methyltransferase (EC 2.1.1.20) @ Sarcosine N-methyltransferase	-1,78
PE143B_0120260	hypothetical protein	-1,77
	hypothetical protein	-1,77
	hypothetical protein	-1,77
	hypothetical protein	-1,77
PE143B_0104915	hypothetical protein	-1,76
	hypothetical protein	-1,76
	hypothetical protein	-1,76
	membrane protein, putative	-1,75
	hypothetical protein	-1,75
	hypothetical protein	-1,75
PE143B_0123385	sigma factor	-1,75
PE143B_0129865	Transcriptional regulator, GntR family	-1,75
PE143B_0112160	hypothetical protein	-1,75
PE143B_0102910	Uncharacterized protein ImpB	-1,75
PE143B_0114580	FIG00958400: hypothetical protein	-1,75
	hypothetical protein	-1,73
PE143B_0127600	Biopolymer transport protein ExbD/TolR	-1,73
PE143B_0128040	FIG00965780: hypothetical protein	-1,73
PE143B_0126755	hypothetical protein	-1,72
PE143B_0122905	Cytochrome oxidase biogenesis protein Cox11-CtaG, copper delivery to Cox1	-1,72
	Translation initiation inhibitor	-1,72
	hypothetical protein	-1,69
	hypothetical protein	-1,68

	PE143B_0111605	Alkanesulfonates ABC transporter ATP-binding protein / Sulfonate ABC transporter, ATP-binding subunit SsuB	-1,67
	PE143B_0103760	Chemotaxis regulator - transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components CheY	-1,67
	PE143B_0127605	Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB	-1,67
	PE143B_0114950	permease protein of sugar ABC transporter	-1,67
	PE143B_0114800	FIG004780: hypothetical protein in PFGI-1-like cluster	-1,66
	PE143B_0102400	FIG00962078: hypothetical protein	-1,64
		hypothetical protein	-1,63
	PE143B_0129180	hypothetical protein	-1,63
	PE143B_0114510	gliding motility protein GldF	-1,63
	PE143B_0128560	putative lipoprotein	-1,62
	PE143B_0121635	hypothetical protein	-1,60
	PE143B_0116205	hypothetical protein	-1,60
	PE143B_0123480	Type III secretion bridge between inner and outer membrane lipoprotein (YscJ,HrcJ,EscJ, PscJ)	-1,59
	PE143B_0100015	transcriptional regulator, MerR family	-1,59
	PE143B_0125530	hypothetical protein	-1,58
	PE143B_0123460	type III secretion protein HrpG	-1,57
	PE143B_0103480	4-oxalocrotonate tautomerase (EC 5.3.2.-)	-1,56
	PE143B_0102860	hypothetical protein	-1,56
<i>fliM</i>		Flagellar motor switch protein FliM	-1,50
		hypothetical protein	-1,44
	PE143B_RS22811	type III secretion apparatus protein, YscD/HrpQ family	1,50
	PE143B_0129280	hypothetical protein	1,50
	PE143B_0115155	ABC transporter in pyoverdin gene cluster, permease component	1,53
	PE143B_0121325	FIG006220: Hypothetical MbtH-like protein	1,56
<i>hisM</i>	PE143B_0103955	Histidine ABC transporter, permease protein HisM (TC 3.A.1.3.1)	1,57
	PE143B_0120945	Coenzyme PQQ synthesis protein B	1,57
<i>pelE</i>		Extracellular Matrix protein PeIE	1,60
	PE143B_0105305	Transcriptional regulator, LysR family	1,60
	PE143B_0110485	Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase Wzb (EC 3.1.3.48)	1,60
	PE143B_0110365	Putative dipeptidase, pyoverdin biosynthesis PvdM	1,63
	PE143B_0105525	Copper metallochaperone, bacterial analog of Cox17 protein	1,63
<i>irpA</i>	PE143B_0115695	Iron-regulated protein A precursor	1,64
		FIG00955090: hypothetical protein	1,65

	PE143B_0117850	L-ornithine 5-monooxygenase (EC 1.13.12.-), PvdA of pyoverdin biosynthesis	1,65
<i>ureB</i>		Urease beta subunit (EC 3.5.1.5)	1,67
<i>dppA</i>	PE143B_0116850	Dipeptide-binding ABC transporter, periplasmic substrate-binding component (TC 3.A.1.5.2)	1,68
	PE143B_0106080	Adenylate kinase (EC 2.7.4.3)	1,71
<i>aotM</i>	PE143B_0122480	Arginine/ornithine ABC transporter, permease protein AotM	1,71
	PE143B_0101175	FIG00454528: hypothetical protein	1,71
	PE143B_0109905	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	1,71
	PE143B_0119230	Threonine dehydrogenase and related Zn-dependent dehydrogenases	1,71
	PE143B_0105630	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	1,72
	PE143B_0120280	FIG027190: Putative transmembrane protein	1,72
	PE143B_0115170	FIG049111: Hypothetical protein in pyoverdin gene cluster	1,73
	PE143B_0111795	Copper metallochaperone, bacterial analog of Cox17 protein	1,74
	PE143B_0113315	amino acid ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein	1,75
	PE143B_0115165	FIG014801: Cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein	1,75
	PE143B_0110535	GDP-mannose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.47)	1,75
	PE143B_0126160	Chromate transport protein ChrA	1,75
	PE143B_0103865	MII4293 protein	1,75
	PE143B_0106530	lipoprotein, putative	1,75
	PE143B_0113270	ABC transporter, ATP-binding protein	1,76
	PE143B_0122855	carbonic anhydrase, family 3	1,77
	PE143B_0110350	Pyoverdine synthetase PvdF, N5-hydroxyornithine formyltransferase	1,79
<i>guaA</i>		GMP synthase [glutamine-hydrolyzing], amidotransferase subunit (EC 6.3.5.2) / GMP synthase [glutamine-hydrolyzing], ATP pyrophosphatase subunit (EC 6.3.5.2)	1,79
	PE143B_0110530	putative Glycosyl transferase, group 2 family protein(EC:2.-)	1,80
	PE143B_0116630	Dienelactone hydrolase family	1,80
	PE143B_0106610	RNA polymerase associated protein RapA (EC 3.6.1.-)	1,80
<i>gatB</i>		Aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase subunit B (EC 6.3.5.6) @ Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B (EC 6.3.5.7) hypothetical protein	1,80
	PE143B_0116845	Outer membrane porin, OprD family	1,82
	PE143B_0114225	Molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaB	1,82
<i>iatA</i>	PE143B_0112995	Inositol transport system ATP-binding protein	1,82

<i>aotQ</i>	PE143B_0122490	Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/ornithine binding protein	1,82
		hypothetical protein	1,83
	PE143B_0120960	5-aminopentanamidase (EC 3.5.1.30)	1,83
<i>hisA</i>	PE143B_0104170	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase (EC 5.3.1.16)	1,83
	PE143B_0115140	ABC-type Fe ³⁺ transport system, periplasmic component	1,83
<i>iolD</i>	PE143B_0113015	Epi-inositol hydrolase (EC 3.7.1.-)	1,83
		hypothetical protein	1,83
	PE143B_0112470	RND efflux system, membrane fusion protein CmeA	1,83
	PE143B_0113275	outer membrane protein, putative	1,85
	PE143B_0123570	Transcription termination protein NusB	1,86
	PE143B_0115180	Putative thiamine pyrophosphate-requiring enzyme, PA2404 homolog	1,88
	PE143B_0130495	hypothetical protein	1,88
	PE143B_0121340	Aspartyl aminopeptidase	1,88
	PE143B_0117520	FIG00959158: hypothetical protein	1,88
	PE143B_0109370	Arginase (EC 3.5.3.1)	1,89
<i>gltI</i>	PE143B_0108910	Glutamate Aspartate periplasmic binding protein precursor GltI (TC 3.A.1.3.4)	1,89
	PE143B_0121130	ABC transporter, periplasmic spermidine putrescine-binding protein PotD (TC 3.A.1.11.1)	1,89
	PE143B_0101155	CmaB	1,90
	PE143B_0115485	FIG001154: CcsA-related protein	1,90
	PE143B_0122140	Putative deoxyribonuclease YcfH	1,90
<i>dppB</i>	PE143B_0116855	Dipeptide transport system permease protein DppB (TC 3.A.1.5.2)	1,91
		NADPH-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.13)	1,91
	PE143B_0123815	SSU ribosomal protein S19p (S15e)	1,92
	PE143B_0110340	Outer membrane ferripyoverdine receptor FpvA, TonB-dependent	1,92
	PE143B_0123205	FIG00961017: hypothetical protein	1,92
	PE143B_0120510	type III effector HopPmaJ(Pto)	1,93
	PE143B_0111115	hypothetical protein	1,93
	PE143B_0118820	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	1,95
	PE143B_0112705	Predicted cobalt transporter CbtA	1,96
	PE143B_0103975	transport permease protein of gamma-aminobutyrate	1,96
	PE143B_0128970	FIG002473: Protein YcaR in KDO2-Lipid A biosynthesis cluster	1,96
	PE143B_0123745	LSU ribosomal protein L30p (L7e)	1,96

	PE143B_0113265	ABC efflux transporter, permease protein	1,96
	PE143B_0105225	SSU ribosomal protein S6p	1,97
	PE143B_0125285	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	2,00
	PE143B_0123600	lipoprotein, putative	2,00
	PE143B_0119220	Sarcosine oxidase gamma subunit (EC 1.5.3.1)	2,00
	PE143B_0130485	DNA replication protein DnaC	2,00
	PE143B_0112090	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ppiC (EC 5.2.1.8)	2,00
	PE143B_0124420	Chorismate--pyruvate lyase (EC 4.1.3.40)	2,00
	PE143B_0105530	FIG00955840: hypothetical protein	2,00
	PE143B_0110860	Thiazole biosynthesis protein ThiG	2,00
<i>hisH</i>		Imidazole glycerol phosphate synthase amidotransferase subunit (EC 2.4.2.-)	2,00
	PE143B_0104720	FIGfam138462: Acyl-CoA synthetase, AMP-(fatty) acid ligase / (3R)-hydroxymyristoyl-[ACP] dehydratase (EC 4.2.1.-)	2,00
		hypothetical protein	2,00
	PE143B_0113880	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase (EC 4.1.1.23)	2,00
	PE143B_0119890	INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN (Rhomboid family)	2,00
<i>livM</i>		Branched-chain amino acid transport system permease protein LivM (TC 3.A.1.4.1)	2,00
<i>iolE</i>	PE143B_0113025	Inosose dehydratase (EC 4.2.1.44)	2,00
	PE143B_0117815	Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)	2,00
<i>iolG</i>	PE143B_0113005	Myo-inositol 2-dehydrogenase (EC 1.1.1.18)	2,00
	PE143B_0109010	Transcriptional regulator, IclR family	2,00
	PE143B_0116360	COGs COG3558	2,00
		hypothetical protein	2,00
	PE143B_0119550	Lysine exporter protein (LYSE/YGGA)	2,00
	PE143B_0109385	fatty acid desaturase, putative	2,00
		hypothetical protein	2,00
	PE143B_0129290	NinB-like phage protein	2,00
		hypothetical protein	2,00
	PE143B_0118970	TldD family protein, Beta/Gamma-proteobacterial subgroup	2,00
<i>iolB</i>	PE143B_0113020	5-deoxy-glucuronate isomerase (EC 5.3.1.-)	2,00
	PE143B_0119155	Predicted secretion system X protein GspG-like 2	2,00
	PE143B_0117880	LysR family transcriptional regulator HdfR	2,00
	PE143B_0129285	Protein NinG	2,00
<i>ansA</i>	PE143B_0124820	L-asparaginase (EC 3.5.1.1)	2,02
<i>glnA</i>		Glutamine synthetase type I (EC 6.3.1.2)	2,02
	PE143B_0108390	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase (EC 6.3.3.1)	2,04

	PE143B_0123770	SSU ribosomal protein S14p (S29e) ## Zinc-independent	2,05
<i>ctaB</i>	PE143B_0120650	Heme O synthase, protoheme IX farnesyltransferase (EC 2.5.1.-) COX10-CtaB	2,06
	PE143B_0103965	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	2,06
<i>hisQ</i>	PE143B_0113175	Histidine ABC transporter, permease protein HisQ (TC 3.A.1.3.1)	2,08
<i>afuA</i>	PE143B_0111310	Ferric iron ABC transporter, iron-binding protein	2,10
	PE143B_0105625	Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase (EC 6.3.4.14)	2,11
	PE143B_0107010	DNA or RNA helicases of superfamily II	2,11
	PE143B_0122180	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (EC 2.3.1.39)	2,15
<i>ybaN</i>	PE143B_0108530	FIG039061: hypothetical protein related to heme utilization	2,15
	PE143B_0128195	FIG00953349: hypothetical protein	2,15
	PE143B_0120640	Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit III (EC 1.10.3.-)	2,16
<i>rpsR</i>		SSU ribosomal protein S18p	2,16
	PE143B_0127236	FIG00954845: hypothetical protein	2,17
<i>ureA</i>		Urease gamma subunit (EC 3.5.1.5)	2,17
	PE143B_0106820	Dihydrodipicolinate synthase (EC 4.2.1.52)	2,17
	PE143B_0119840	Fumarate hydratase class I, aerobic (EC 4.2.1.2)	2,17
	PE143B_0125280	Lysine efflux permease	2,18
<i>hisP</i>	PE143B_0113165	Histidine ABC transporter, ATP-binding protein HisP (TC 3.A.1.3.1)	2,18
	PE143B_0123810	LSU ribosomal protein L22p (L17e)	2,19
	PE143B_0112695	CobW GTPase involved in cobalt insertion for B12 biosynthesis	2,20
	PE143B_0120645	Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit IV (EC 1.10.3.-)	2,21
	PE143B_0113960	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASI (EC 2.3.1.41)	2,22
	PE143B_0125535	Outer membrane porin, OprD family	2,24
	PE143B_0117890	hypothetical protein	2,24
	PE143B_0127575	FIG00955064: hypothetical protein	2,25
<i>gltJ</i>	PE143B_0109450	Glutamate Aspartate transport system permease protein GltJ (TC 3.A.1.3.4)	2,25
	PE143B_0105465	GCN5-related N-acetyltransferase	2,25
<i>rpIW</i>		LSU ribosomal protein L23p (L23Ae)	2,32
	PE143B_0106826	Ribulose-5-phosphate 4-epimerase and related epimerases and aldolases	2,33
		hypothetical protein	2,33
<i>glyA</i>		Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	2,33
	PE143B_0119395	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	2,33
		hypothetical protein	2,33
	PE143B_0123750	SSU ribosomal protein S5p (S2e)	2,34

	PE143B_0104220	Protein export cytoplasm chaperone protein (SecB, maintains protein to be exported in unfolded state)	2,36
	PE143B_0125205	FIG00957748: hypothetical protein	2,38
	PE143B_0111145	Thiol-disulfide isomerase and thioredoxins	2,40
	PE143B_0109280	D-serine/D-alanine/glycine transporter	2,41
	PE143B_0123820	LSU ribosomal protein L2p (L8e)	2,45
	PE143B_0116625	hypothetical protein	2,50
	PE143B_0124200	Na(+) H(+) antiporter subunit C	2,50
	PE143B_0126380	FIG00954882: hypothetical protein	2,50
<i>rplI</i>		LSU ribosomal protein L9p	2,51
	PE143B_0113035	Predicted transcriptional regulator of the myo-inositol catabolic operon	2,67
	PE143B_0123725	SSU ribosomal protein S11p (S14e)	2,72
	PE143B_0116555	Nitrite reductase [NAD(P)H] small subunit (EC 1.7.1.4)	3,00
		hypothetical protein	3,00
<i>motB</i>		Flagellar motor rotation protein MotB	3,00
	PE143B_0103755	hypothetical protein	3,00
	PE143B_0104565	NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40)	3,05
	PE143B_0101055	putative Cytochrome bd2, subunit I	3,13
	PE143B_0111245	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C-like protein	3,27
	PE143B_0113095	Acetoin dehydrogenase E1 component alpha-subunit (EC 1.2.4.-)	3,50

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abduljalil, J. M. (2018) 'Bacterial riboswitches and RNA thermometers: Nature and contributions to pathogenesis', *Non-coding RNA Research*, 3(2), pp. 54–63. doi: 10.1016/j.ncrna.2018.04.003.
- Alegria, T. G. P. *et al.* (2017) 'Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxyxynitrite.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(2), pp. E132–E141. doi: 10.1073/pnas.1619659114.
- Anderson, G. G. and O'Toole, G. A. (2008) 'Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms.', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, pp. 85–105. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3_5.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodríguez-Quñones, F. (2003) 'Bacterial iron homeostasis', *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), pp. 215–237. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004) 'REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction', *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), pp. 373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- Arai, H. (2011) 'Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*', *Frontiers in microbiology*, 2(2), p. 103. doi: 10.3389/fmicb.2011.00103.
- Ayub, N. D. *et al.* (2004) 'A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas sp.* isolated from antarctic environments with high stress resistance', *Current Microbiology*, 49(3), pp. 170–174. doi: 10.1007/s00284-004-4254-2.
- Ayub, N. D., Tribelli, P. M. and 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: life under extreme conditions*, 13(1), pp. 59–66. doi: 10.1007/s00792-008-0197-z.
- Baptista, J. M. *et al.* (2012) 'Oxidative stress modulates the nitric oxide defense promoted by *Escherichia coli* flavorubredoxin.', *Journal of bacteriology*, 194(14), pp. 3611–3617. doi: 10.1128/JB.00140-12.
- Barahona, E. *et al.* (2016) '*Pseudomonas fluorescens* F113 Can Produce a Second Flagellar Apparatus, Which Is Important for Plant Root Colonization', *Frontiers in Microbiology*, 7, p. 1471. doi: 10.3389/fmicb.2016.01471.
- Barmana, S. R. *et al.* (2017) 'Biodegradation of acenaphthene and naphthalene by *Pseudomonas mendocina*: Process optimization, and toxicity evaluation', *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(5), pp. 4803–4812. doi: 10.1016/j.jece.2017.09.012.
- Beisel, C. L. and Storz, G. (2010) 'Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks.', *FEMS microbiology reviews*, 34(5), pp. 866–82. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00241.x.
- Belas, R. (2014) 'Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 22(9), pp. 517–527. doi: 10.1016/j.tim.2014.05.002.
- Benkert, B. *et al.* (2008) 'Nitrate-responsive NarX-NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arcDABC operon', pp. 3053–3060. doi: 10.1099/mic.0.2008/018929-0.
- Bi, S. and Sourjik, V. (2018) 'Stimulus sensing and signal processing in bacterial chemotaxis', *Current*

Opinion in Microbiology, 45, pp. 22–29. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.002.

Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) 'Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

Bosak, T., Losick, R. M. and Pearson, A. (2008) 'A polycyclic terpenoid that alleviates oxidative stress', 2008.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brown, S. D. *et al.* (2012) 'Twenty-One Genome Sequences from *Pseudomonas* Species and 19 Genome Sequences from Diverse Bacteria Isolated from the Rhizosphere and Endosphere of <sp>', *Journal of Bacteriology*, 194(21), pp. 5991 LP – 5993. doi: 10.1128/JB.01243-12.

Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. (2000) 'Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species', *International Microbiology*. doi: 10.2436/im.v3i1.9235.

Caiazza, N. C. *et al.* (2007) 'Inverse Regulation of Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14', *Journal of Bacteriology*, 189(9), pp. 3603–3612. doi: 10.1128/JB.01685-06.

Caldara, M. *et al.* (2008) 'Arginine Biosynthesis in *Escherichia coli*', 283(10), pp. 6347–6358. doi: 10.1074/jbc.M705884200.

Caspi, R. *et al.* (2016) 'The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases.', *Nucleic acids research*, 44(D1), pp. D471-480. doi: 10.1093/nar/gkv1164.

Chayabutra, C. and Ju, L.-K. (2000) 'Degradation of n-Hexadecane and Its Metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under Microaerobic and Anaerobic Denitrifying Conditions', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), pp. 493 LP – 498. doi: 10.1128/AEM.66.2.493-498.2000.

Chen, C.-H. (2011) 'Phase II Enzymes', in *Activation and Detoxification Enzymes*, pp. 37–48. doi: 10.1007/978-1-4614-1049-2_5.

Chubukov, V. *et al.* (2014) 'Coordination of microbial metabolism', *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), pp. 327–340. doi: 10.1038/nrmicro3238.

Cole, J. A. (2018) 'Anaerobic Bacterial Response to Nitrosative Stress', *Advances in Microbial Physiology*. 1st edn. Elsevier Ltd., 72, pp. 193–237. doi: 10.1016/bs.ampbs.2018.01.001.

Conesa, A. *et al.* (2005) 'Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research', *Bioinformatics*, 21(18), pp. 3674–3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610.

Coppola, D. *et al.* (2013) 'Antarctic bacterial haemoglobin and its role in the protection against nitrogen reactive species.', *Biochimica et biophysica acta*, 1834(9), pp. 1923–31. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.02.018.

Crack, J. C. and Brun, N. E. Le (2017) 'Redox - sensing iron - sulfur cluster regulators', (April), pp. 1–56. doi: 10.1089/ars.2017.7361.

Crack, J. C., Thomson, A. J. and Brun, N. E. Le (2014) 'Iron – Sulfur Clusters as Biological Sensors : The Chemistry of Reactions with Molecular Oxygen and Nitric Oxide'.

Czaja, A. J. (2017) 'Immunopathogenesis of Autoimmune Liver Damage', in, pp. 19–48. doi:

10.1016/B978-0-444-63707-9.00002-7.

D'Abzac, P. *et al.* (2010) 'Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), pp. 1589–1599. doi: 10.1007/s00253-009-2288-x.

Ding, Y., Chan, C. Y. and Lawrence, C. E. (2004) 'Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids', *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server), pp. W135–W141. doi: 10.1093/nar/gkh449.

Dubbs, J. M. and Mongkolsuk, S. (2007) 'Chapter 7: Peroxiredoxins In Bacterial Antioxidant Defense', pp. 143–193.

Eschbach, M. *et al.* (2004) 'Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation.', *Journal of bacteriology*, 186(14), pp. 4596–604. doi: 10.1128/JB.186.14.4596-4604.2004.

Ezraty, B. *et al.* (2017) 'Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria.', *Nature reviews. Microbiology*, 15(7), pp. 385–396. doi: 10.1038/nrmicro.2017.26.

Frawley, E. R. and Fang, F. C. (2014) 'The ins and outs of bacterial iron metabolism', *Molecular Microbiology*, 93(4), pp. 609–616. doi: 10.1111/mmi.12709.

Fröhlich, K. S. *et al.* (2016) 'The target spectrum of sdsr small RNA in *Salmonella*', *Nucleic Acids Research*, 44(21), pp. 10406–10422. doi: 10.1093/nar/gkw632.

Fuhrer, T., Fischer, E. and Sauer, U. (2005) 'Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species', *Journal of Bacteriology*, 187(5), pp. 1581–1590. doi: 10.1128/JB.187.5.1581–1590.2005.

Galimand, M. *et al.* (1991) 'Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*.' , *Journal of bacteriology*, 173(5), pp. 1598–606. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1900277>.

Galle, M., Carpentier, I. and Beyaert, R. (2012) 'Structure and Function of the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*', *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), pp. 831–842. doi: 10.2174/138920312804871210.

García-Fontana, C. *et al.* (2013) 'High specificity in CheR methyltransferase function: CheR2 of *Pseudomonas putida* is essential for chemotaxis, whereas CheR1 is involved in biofilm formation', *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), pp. 18987–18999. doi: 10.1074/jbc.M113.472605.

Gómez-lozano, M. *et al.* (2014) 'Identification of Bacterial Small RNAs by RNA Sequencing', in, pp. 433–456. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0.

Gómez-Lozano, M. *et al.* (2014) 'Expression of antisense small RNAs in response to stress in *Pseudomonas aeruginosa*', *BMC Genomics*, 15(1), p. 783. doi: 10.1186/1471-2164-15-783.

Gorski, S. A., Vogel, J. and Doudna, J. A. (2017) 'RNA-based recognition and targeting: sowing the seeds of specificity', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 18(4), pp. 215–228. doi: 10.1038/nrm.2016.174.

Gottesman, S. and Storz, G. (2011) 'Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations.', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a003798.

Gruber, A. R., Bernhart, S. H. and Lorenz, R. (2015) 'The ViennaRNA Web Services', in *RNA*

Bioinformatics, pp. 307–326. doi: 10.1007/978-1-4939-2291-8.

Guo, M. *et al.* (2012) 'Pseudomonas syringae Catalases Are Collectively Required for Plant Pathogenesis', *Journal of Bacteriology*, 194(18), pp. 5054 LP – 5064. doi: 10.1128/JB.00999-12.

Guzman LM *et al.* (1995) 'Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.', *Journal of bacteriology*, 177(14), pp. 4121–4130.

Heo, Y.-J. *et al.* (2010) 'The Major Catalase Gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Is under both Positive and Negative Control of the Global Transactivator OxyR in Response to Hydrogen Peroxide', *Journal of Bacteriology*, 192(2), pp. 381–390. doi: 10.1128/JB.00980-09.

Hervás, A. B., Canosa, I. and Santero, E. (2010) 'Regulation of glutamate dehydrogenase expression in *Pseudomonas putida* results from its direct repression by NtrC under nitrogen-limiting conditions', *Molecular Microbiology*, 78(2), pp. 305–319. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07329.x.

Hess, W. R. and Marchfelder, A. (2012) Regulatory RNAs in prokaryotes, *Regulatory RNAs in Prokaryotes*. doi: 10.1007/978-3-7091-0218-3.

Højby, N., Ciofu, O. and Bjarnsholt, T. (2010) 'Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis', *Future Microbiology*. *Future Medicine*, 5(11), pp. 1663–1674. doi: 10.2217/fmb.10.125.

Højberg, O. *et al.* (1999) 'Oxygen-Sensing Reporter Strain of *Pseudomonas fluorescens* for Monitoring the Distribution of Low-Oxygen Habitats in Soil', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), pp. 4085 LP – 4093. Available at: <http://aem.asm.org/content/65/9/4085.abstract>.

Horn, G. *et al.* (2015) 'Structural details of the OxyR peroxide-sensing mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), pp. 6443–6448. doi: 10.1073/pnas.1424495112.

Hosie, A. H. F. and Poole, P. S. (2001) 'Bacterial ABC transporters of amino acids', *Res. Microbio*, 152, pp. 259–270.

Humphries, K. M. and Szweda, L. I. (1998) 'Selective Inactivation of α -Ketoglutarate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase: Reaction of Lipoic Acid with 4-Hydroxy-2-nonenal †', *Biochemistry*, 37(45), pp. 15835–15841. doi: 10.1021/bi981512h.

Ibarra, J. G. (2017) *Estudios microbiológicos relacionados con el mejoramiento de cultivos vegetales en zonas desfavorables*. Universidad de Buenos Aires. Available at: http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6144_ibarra.

Imlay, J. A. (2013) 'The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 11(7), pp. 443–454. doi: 10.1038/nrmicro3032.

Ingle, R. A. (2011) 'Histidine Biosynthesis', *The Arabidopsis Book*, 9, p. e0141. doi: 10.1199/tab.0141.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) 'High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *Gene*, 96(1), pp. 23–28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.

Jackson, A. A. *et al.* (2013) 'Anr and Its Activation by PlcH Activity in *Pseudomonas aeruginosa* Host Colonization and Virulence', *Journal of Bacteriology*, 195(13), pp. 3093–3104. doi: 10.1128/JB.02169-12.

Jervis, A. J. and Green, J. (2007) 'In vivo demonstration of FNR dimers in response to lower O(2) availability.', *Journal of bacteriology*, 189(7), pp. 2930–2. doi: 10.1128/JB.01921-06.

Jurtshuk, P. J. (1996) 'Bacterial Metabolism', in *Medical Microbiology*. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston.

- Kearns, D. B. (2010) 'A field guide to bacterial swarming motility', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 8(9), pp. 634–644. doi: 10.1038/nrmicro2405.
- Kim, J. and Park, W. (2014) 'Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), pp. 6933–6946. doi: 10.1007/s00253-014-5883-4.
- Kim, S.-K. and Lee, J.-H. (2016) 'Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*.', *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 54(2), pp. 71–85. doi: 10.1007/s12275-016-5528-7.
- Koháryová, M. and Kolárová, M. (2008) 'Oxidative stress and thioredoxin system.', *General physiology and biophysics*, 27(2), pp. 71–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645221>.
- Kohler, P. R. A. et al. (2010) 'Inositol Catabolism, a Key Pathway in *Sinorhizobium meliloti* for Competitive Host Nodulation', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), pp. 7972–7980. doi: 10.1128/AEM.01972-10.
- Kohler, P. R. A., Choong, E.-L. and Rossbach, S. (2011) 'The RpiR-Like Repressor IoIR Regulates Inositol Catabolism in *Sinorhizobium meliloti*', *Journal of Bacteriology*, 193(19), pp. 5155–5163. doi: 10.1128/JB.05371-11.
- Kunze, M. et al. (2009) 'Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas putida* GJ31: assembled route for chlorobenzene degradation encoded by clusters on plasmid pKW1 and the chromosome', *Microbiology*. Microbiology Society, 155(12), pp. 4069–4083. doi: 10.1099/mic.0.032110-0.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
- Lagares Jr, A. and Valverde, C. (2018) 'Guidelines for Inferring and Characterizing a Family of Bacterial trans-Acting Small Noncoding RNAs', in *Bacterial Regulatory RNA*. Springer, pp. 31–45. doi: 10.1007/978-1-4939-7634-8_2,.
- Lamont, I. L. et al. (2002) 'Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), pp. 7072–7077. doi: 10.1073/pnas.092016999.
- Larionov, A., Krause, A. and Miller, W. (2005) 'A standard curve based method for relative real time PCR data processing.', *BMC bioinformatics*, 6, p. 62. doi: 10.1186/1471-2105-6-62.
- Lazazzera, B. A., Bates, D. M. and Kiley, P. J. (1993) 'The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state.', *Genes and Development*, 7. doi: 10.1101/gad.7.10.1993.
- Levin, J. Z. et al. (2010) 'Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods', *Nature methods*, 7(9), pp. 709–715. doi: 10.1038/nmeth.1491.
- Levine, E. et al. (2007) 'Quantitative characteristics of gene regulation by small RNA', *PLoS Biology*, 5(9), pp. 1998–2010. doi: 10.1371/journal.pbio.0050229.
- Levine, E. and Hwa, T. (2008) 'Small RNAs establish gene expression thresholds', *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), pp. 574–579. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.016.
- Levine, R. L. et al. (2000) 'Determination of carbonyl groups in oxidized proteins.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 99, pp. 15–24. doi: 10.1385/1-59259-054-3:15.
- Liang, K.-H. (2013) 'Transcriptomics', in *Bioinformatics for Biomedical Science and Clinical*

Applications, pp. 49–82. doi: 10.1533/9781908818232.49.

Lindahl, S. G. E. (2008) 'Oxygen and Life on Earth', *Anesthesiology*, 109(1), pp. 7–13. doi: 10.1097/ALN.0b013e31817b5a7e.

Little, D. J. *et al.* (2014) 'Modification and periplasmic translocation of the biofilm exopolysaccharide poly- -1,6-N-acetyl-D-glucosamine', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), pp. 11013–11018. doi: 10.1073/pnas.1406388111.

López, N. I. *et al.* (2009) '*Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment.', *Current microbiology*, 59(5), pp. 514–519. doi: 10.1007/s00284-009-9469-9.

Lu, J. and Holmgren, A. (2014) 'The thioredoxin antioxidant system', *Free Radical Biology and Medicine*, 66, pp. 75–87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.

Lu, P. *et al.* (2016) 'RpoS-dependent sRNA RgsA regulates Fis and AcpP in *Pseudomonas aeruginosa*', *Molecular Microbiology*, 102(2), pp. 244–259. doi: 10.1111/mmi.13458.

Luo, S. and Wehr, N. B. (2009) 'Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay', *Redox Report*, 14(4), pp. 159–166. doi: 10.1179/135100009X392601.

Mann, M., Wright, P. R. and Backofen, R. (2017) 'IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA–RNA interactions', *Nucleic Acids Research*, 45(W1), pp. W435–W439. doi: 10.1093/nar/gkx279.

McClure, R. *et al.* (2013) 'Computational analysis of bacterial RNA-Seq data', *Nucleic Acids Research*, 41(14), pp. e140–e140. doi: 10.1093/nar/gkt444.

Melber, A. and Winge, D. R. (2018) 'Steps Toward Understanding Mitochondrial Fe/S Cluster Biogenesis', in, pp. 265–292. doi: 10.1016/bs.mie.2017.09.004.

Mi, H. *et al.* (2017) 'PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements.', *Nucleic acids research*, 45(D1), pp. D183–D189. doi: 10.1093/nar/gkw1138.

Michaux, C. *et al.* (2014) 'Physiological roles of small RNA molecules', *Microbiology*, 160(Pt_6), pp. 1007–1019. doi: 10.1099/mic.0.076208-0.

Mishra, S. and Imlay, J. (2012) 'Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), pp. 145–160. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.014.

Mitra, A. *et al.* (2019) 'Heme and hemoglobin utilization by *Mycobacterium tuberculosis*', *Nature Communications*, 10(1), p. 4260. doi: 10.1038/s41467-019-12109-5.

Morales-Soto, N. *et al.* (2015) 'Preparation, imaging, and quantification of bacterial surface motility assays.', *Journal of visualized experiments : JoVE*, (98). doi: 10.3791/52338.

Müller, V. (2008) 'Bacterial Fermentation', *Encyclopedia of Life Sciences*, (September). doi: 10.1002/9780470015902.a0001415.pub2.

Munch, R. (2003) 'PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation', *Nucleic Acids Research*, 31(1), pp. 266–269. doi: 10.1093/nar/gkg037.

Nikel, P. I. *et al.* (2006) 'Poly(3-Hydroxybutyrate) Synthesis by Recombinant *Escherichia coli* arcA Mutants in Microaerobiosis', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp. 2614–2620. doi: 10.1128/AEM.72.4.2614-2620.2006.

- Nilsson, J. F. *et al.* (2019) 'Proteomic Analysis of *Rhizobium favelukesii* LPU83 in Response to Acid Stress', *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 18(10), pp. 3615–3629. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00275.
- O'Toole, G. A. and Kolter, R. (1998) 'Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.', *Molecular Microbiology*, 30(2), pp. 295–304. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.
- Ogata, H. *et al.* (1999) 'KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes', *Nucleic Acids Research*, 27(1), pp. 29–34. doi: 10.1093/nar/27.1.29.
- Oglesby-Sherrouse, A. G. and Murphy, E. R. (2013) 'Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme', *Metallomics*, 5(4), p. 276. doi: 10.1039/c3mt20224k.
- Pang, M. *et al.* (2015) 'Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics.', *Scientific reports*, 5, p. 9833. doi: 10.1038/srep09833.
- Papenfort, K. and Vogel, J. (2010) 'Regulatory RNA in Bacterial Pathogens', *Cell Host & Microbe*, 8(1), pp. 116–127. doi: 10.1016/j.chom.2010.06.008.
- Pezzoni, M. *et al.* (2016) 'Exposure to low UVA doses increases KatA and KatB catalase activities, and confers cross-protection against subsequent oxidative injuries in *Pseudomonas aeruginosa*', *Microbiology (Reading, England)*, 162(5), pp. 855–64. doi: 10.1099/mic.0.000268.
- Pezzoni, M., Pizarro, R. A. and Costa, C. S. (2014) 'Protective role of extracellular catalase (KatA) against UVA radiation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.', *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 131, pp. 53–64. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.01.005.
- Podkaminski, D., Bouvier, M. and Vogel, J. (2014) 'Identification and characterization of small non-coding RNAs in bacteria', 2, pp. 719–786. doi: 10.1002/9783527647064.ch33.
- Pomposiello, P. J. and Demple, B. (2001) 'Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors', *Trends in Biotechnology*, 19(3), pp. 109–114. doi: 10.1016/S0167-7799(00)01542-0.
- Poole, R. K. (2005) 'Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria.', *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 1), pp. 176–80. doi: 10.1042/BST0330176.
- Potter, A. J., Trappetti, C. and Paton, J. C. (2012) '*Streptococcus pneumoniae* Uses Glutathione To Defend against Oxidative Stress and Metal Ion Toxicity', *Journal of Bacteriology*, 194(22), pp. 6248 LP – 6254. doi: 10.1128/JB.01393-12.
- Pratt, L. A. and Kolter, R. (1998) 'Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili', *Molecular Microbiology*, 30(2), pp. 285–293. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x.
- Raiger lustman, L. J. *et al.* (2015) 'Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance.', *Extremophiles: life under extreme conditions*, 19(1), pp. 207–220. doi: 10.1007/s00792-014-0700-7.
- Redondo-Nieto, M. *et al.* (2013) 'Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction', *BMC Genomics*, 14(1), p. 54. doi: 10.1186/1471-2164-14-54.
- Reniere, M. L. (2018) 'Reduce, Induce, Thrive: Bacterial Redox Sensing during Pathogenesis', *Journal of Bacteriology*, 200(17), pp. e00128-18. doi: 10.1128/JB.00128-18.

- Rinaldo, S. *et al.* (2018) 'Beyond nitrogen metabolism: nitric oxide, cyclic-di-GMP and bacterial biofilms', *FEMS Microbiology Letters*, 365(6). doi: 10.1093/femsle/fny029.
- Ringel, M. T. and Brüser, T. (2018) 'The biosynthesis of pyoverdines', *Microbial Cell*, 5(10), pp. 424–437. doi: 10.15698/mic2018.10.649.
- Ruiz, J. A., Bernar, E. M. and Jung, K. (2015) 'Production of Siderophores Increases Resistance to Fusaric Acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5', *PLOS ONE*. Edited by Iax Devireddy, 10(1), p. e0117040. doi: 10.1371/journal.pone.0117040.
- Sampedro, I. *et al.* (2015) '*Pseudomonas* chemotaxis', *FEMS Microbiology Reviews*, 39(1), pp. 17–46. doi: 10.1111/1574-6976.12081.
- Sasaki, Y. *et al.* (2016) 'Nitrogen oxide cycle regulates nitric oxide levels and bacterial cell signaling', *Scientific Reports*, 6(1), p. 22038. doi: 10.1038/srep22038.
- 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), pp. 1469–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1787797>.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.', *Nature methods*, 9(7), pp. 671–675. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>.
- Seo, S. *et al.* (2014) 'Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms5910.
- Severino, R. *et al.* (2019) 'High-quality draft genome sequence of *Gaiella occulta* isolated from a 150 meter deep mineral water borehole and comparison with the genome sequences of other deep-branching lineages of the phylum *Actinobacteria*', *MicrobiologyOpen*, 8(9). doi: 10.1002/mbo3.840.
- Shimizu, K. and Matsuoka, Y. (2019a) 'Redox rebalance against genetic perturbations and modulation of central carbon metabolism by the oxidative stress regulation', *Biotechnology Advances*, 37(8). doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107441.
- Shimizu, K. and Matsuoka, Y. (2019b) 'Regulation of glycolytic flux and overflow metabolism depending on the source of energy generation for energy demand', *Biotechnology Advances*, 37(2), pp. 284–305. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.12.007.
- Sofía, H. A. *et al.* (2016) 'Effect of Crc and Hfq proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA', *Rna*, 22(12), pp. 1902–1917. doi: 10.1261/rna.058313.116.
- Sonnleitner, E. *et al.* (2011) 'The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal.', *Molecular microbiology*, 80(4), pp. 868–85. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07620.x.
- Sonnleitner, E. and Haas, D. (2011) 'Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(1), pp. 63–79. doi: 10.1007/s00253-011-3332-1.
- Sosa, E. J. *et al.* (2018) 'Target-Pathogen: a structural bioinformatic approach to prioritize drug targets in pathogens', *Nucleic Acids Research*, 46(D1), pp. D413–D418. doi: 10.1093/nar/gkx1015.
- Storz, G., Vogel, J. and Wassarman, K. M. (2011) 'Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers', *Molecular Cell*, 43(6), pp. 880–891. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.022.

- Szklarczyk, D. *et al.* (2019) 'STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets', *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D607–D613. doi: 10.1093/nar/gky1131.
- Taylor, P. K. *et al.* (2017) 'A novel small RNA is important for biofilm formation and pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*', *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0182582.
- Tharmalingam, S. *et al.* (2017) 'Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications', *Biological Chemistry*, 398(11), pp. 1193–1208. doi: 10.1515/hsz-2017-0152.
- Touati, D. (2000) 'Iron and Oxidative Stress in Bacteria', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), pp. 1–6. doi: 10.1006/abbi.1999.1518.
- Tribelli, P. M. (2011) 'Influencia del regulador global Anr en la fisiología de *Pseudomonas extremaustralis*, una bacteria extremaustralis, una bacteria productora de polihidroxibutirato', *Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*, p. 173.
- Tribelli, P. M. *et al.* (2013) 'Anr, the anaerobic global regulator, modulates the redox state and oxidative stress resistance in *Pseudomonas extremaustralis*.', *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 2), pp. 259–268. doi: 10.1099/mic.0.061085-0.
- Tribelli, P. M. *et al.* (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), p. e0145353. doi: 10.1371/journal.pone.0145353.
- Tribelli, P. M. *et al.* (2018) 'Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(1), pp. 15–23. doi: 10.1007/s10295-017-1987-z.
- Tribelli, P. M. *et al.* (2019) 'Core regulon of the global anaerobic regulator Anr targets central metabolism functions in *Pseudomonas* species', *Scientific Reports*, 9(1), p. 9065. doi: 10.1038/s41598-019-45541-0.
- Tribelli, P. M., Hay, A. G. and López, N. I. (2013) 'The global anaerobic regulator Anr, is involved in cell attachment and aggregation influencing the first stages of biofilm development in *Pseudomonas extremaustralis*.', *PloS one*, 8(10), p. e76685. doi: 10.1371/journal.pone.0076685.
- Tribelli, P. M., Méndez, B. S. and López, N. I. (2010) 'Oxygen-sensitive global regulator, Anr, is involved in the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in *Pseudomonas extremaustralis*.', *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 19(4), pp. 180–188. doi: 10.1159/000320261.
- Trunk, K. *et al.* (2009) 'Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons', *Environmental Microbiology*, 12(6), pp. 1719–1733. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02252.x.
- Tunchai, M. *et al.* (2017) 'Negative chemotaxis of *Ralstonia pseudosolanacearum* to maleate and identification of the maleate chemosensory protein.', *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(6), pp. 647–652. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.07.002.
- Tyanova, S. *et al.* (2016) 'The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data.', *Nature methods*, 13(9), pp. 731–40. doi: 10.1038/nmeth.3901.
- Tyanova, S., Temu, T. and Cox, J. (2016) 'The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics.', *Nature protocols*, 11(12), pp. 2301–2319. doi: 10.1038/nprot.2016.136.
- Valverde, C. (2009) 'Artificial sRNAs activating the Gac/Rsm signal transduction pathway in

Pseudomonas fluorescens', *Archives of Microbiology*, 191(4), pp. 349–359. doi: 10.1007/s00203-009-0459-x.

Venturi, V. (2006) 'Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*', *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), pp. 274–291. doi: 10.1111/j.1574-6976.2005.00012.x.

Vogel, J. and Luisi, B. F. (2011) 'Hfq and its constellation of RNA', *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), pp. 578–589. doi: 10.1038/nrmicro2615.

Vuilleumier, S. (2002) 'The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases : new lessons from genomes', pp. 138–146. doi: 10.1007/s00253-001-0836-0.

Wagner, E. G. H. and Romby, P. (2015) 'Small RNAs in Bacteria and Archaea : Who They Are , What They Do , and How They Do It.', *Advances in Genetics*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/bs.adgen.2015.05.001.

Wang, X., Preston, J. F. and Romeo, T. (2004) 'The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation.', *Journal of bacteriology*, 186(9), pp. 2724–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090514>.

Wang, Y. F. and Fu, J. (2019) 'ExRNA Secretory and circulating bacterial small RNAs : a mini-review of the literature'. *ExRNA*, pp. 1–5.

Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) 'RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics', *Nature Reviews Genetics*, 10(1), pp. 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.

Vander Wauven, C. *et al.* (1984) '*Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway.', *Journal of Bacteriology*, 160(3), pp. 928 LP – 934. Available at: <http://jb.asm.org/content/160/3/928.abstract>.

Wei, Q. *et al.* (2012) 'Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen', *Nucleic Acids Research*, 40(10), pp. 4320–4333. doi: 10.1093/nar/gks017.

Weston, A. D. and Hood, L. (2004) 'Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine.', *Journal of proteome research*, 3(2), pp. 179–96. doi: 10.1021/pr0499693.

Wilkins, M. (2009) 'Proteomics data mining', *Expert Review of Proteomics*, 6(6), pp. 599–603. doi: 10.1586/epr.09.81.

Williams, D. E. and Boon, E. M. (2019) 'Towards Understanding the Molecular Basis of Nitric Oxide-Regulated Group Behaviors in Pathogenic Bacteria', *Journal of Innate Immunity*, 11(3), pp. 205–215. doi: 10.1159/000494740.

Xie, S. *et al.* (2015) 'Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings', *BMC Microbiology*, 15(1), p. 21. doi: 10.1186/s12866-015-0353-4.

Xu, Q. *et al.* (2011) 'Structural and Sequence Analysis of Imelysin-Like Proteins Implicated in Bacterial Iron Uptake', *PLOS ONE*, 6(7), p. e21875.

Young, I. S. and McEneny, J. (2001) 'Lipoprotein oxidation and atherosclerosis.', *Biochemical Society transactions*, 29(Pt 2), pp. 358–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356183>.

Zhang, Y. *et al.* (2018) 'Structure-guided disruption of the pseudopilus tip complex inhibits the Type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa*', *PLOS Pathogens*. Edited by M. R. Parsek, 14(10), p. e1007343. doi: 10.1371/journal.ppat.1007343.