

“ESTUDIO DE *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515,
Bacillus subtilis ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1
EN RELACIÓN A ESTRÉS: XENOBIÓTICOS Y GLIFOSATO”

Presenta:
María Angie Beltrán Duque

Orientador Externo
Silvio Alejandro López Pazos Ph.D.
Universidad Antonio Nariño

Orientadora interna
Sandra Mónica Estupiñán Torres M.Sc
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Bogotá D.C, Mayo 2020



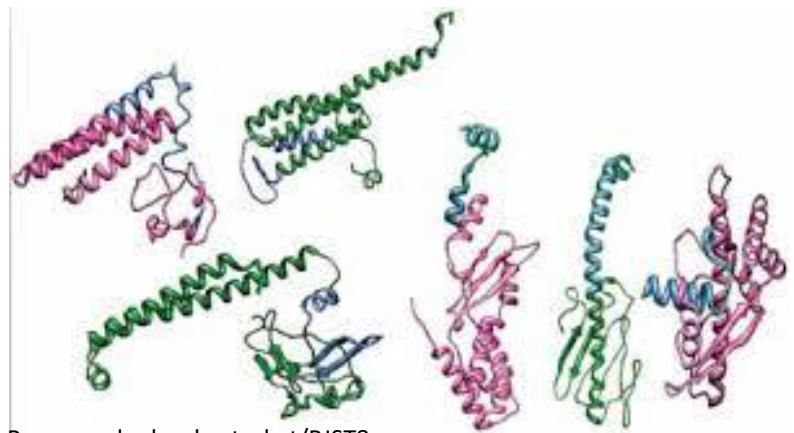
Colombia

Glifosato

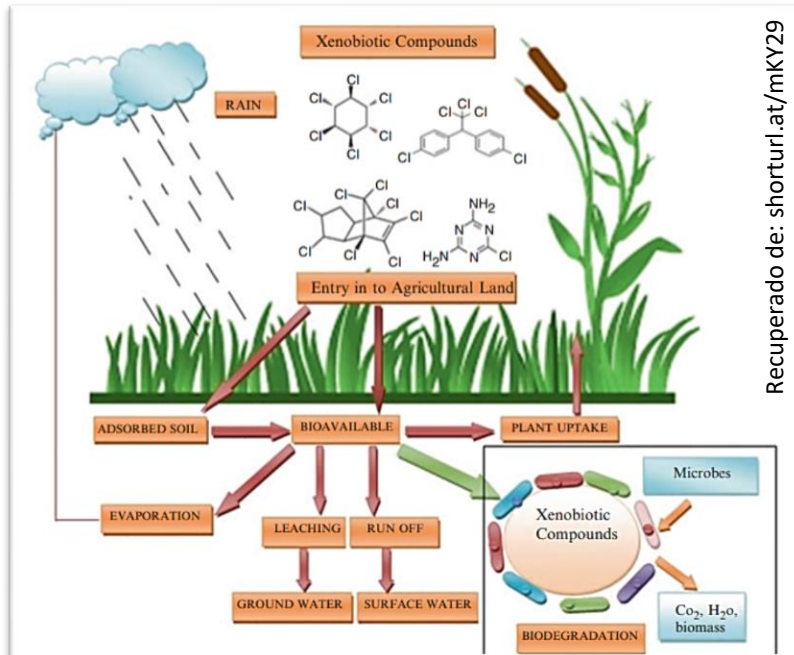
Xenobióticos

Proteínas relacionadas con estrés

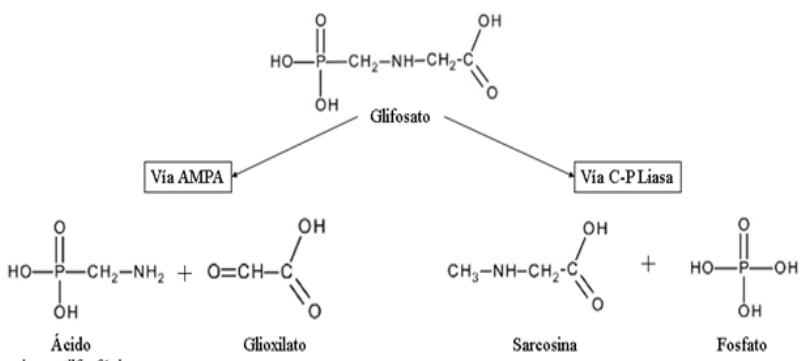
Pseudomonas sp.
Bacillus sp.



Recuperado de: shorturl.at/BJST8



Recuperado de: shorturl.at/mKY29



Recuperado de: shorturl.at/cgk05

¿Cuáles son las posibles funciones de proteínas de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 relacionadas con estrés?

General

Reconocer la posible presencia de las proteínas de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 relacionadas con estrés.

Específicos

- Identificar proteínas hipotéticas de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 para la degradación de xenobióticos.
- Establecer la capacidad de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 para la degradación de glifosato.
- Determinar la posible presencia de proteínas de choque térmico relacionadas con estrés de *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1.

Pseudomonas sp.

2016

Javaid et al. Potential of Biological Agents in Decontamination of Agricultural Soil.

2017

López G et al. Draft genome sequence of *Pseudomonas extremaustralis* strain USBA-GBX 515 isolated from perparamo soil samples in Colombian Andes.

2018

Tribelli et al. Reporting Key Features in Cold-Adapted Bacteria.

Bacillus sp.

2012

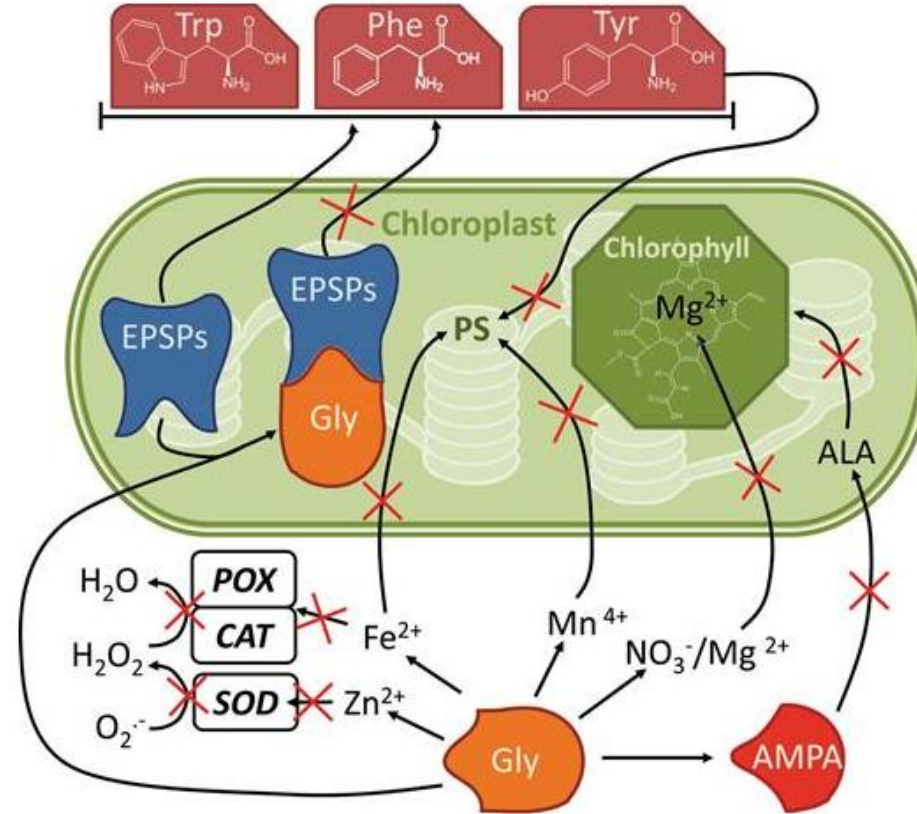
Seydlová et al. DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress.

2015

Chen et al. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19.

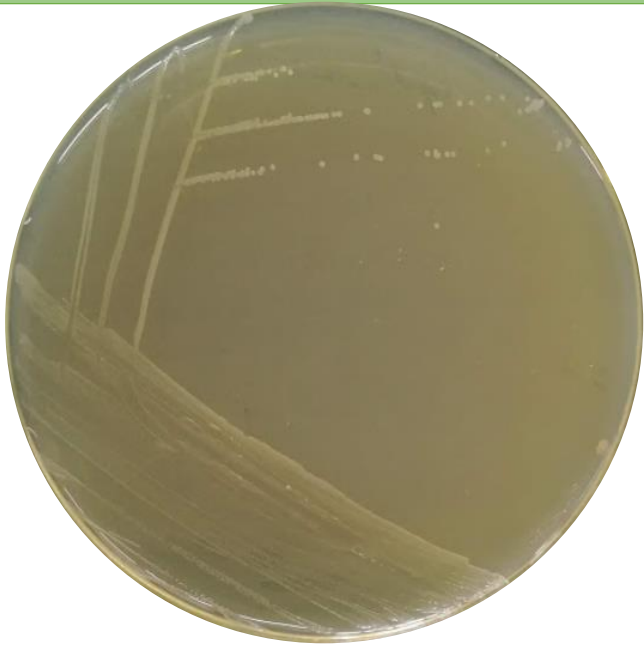
2019

Abdelhaleem et al. Identification and characterization of novel bacterial polyaromatic hydrocarbon-degrading enzymes as potential tools for cleaning up hydrocarbon pollutants from different environmental sources.



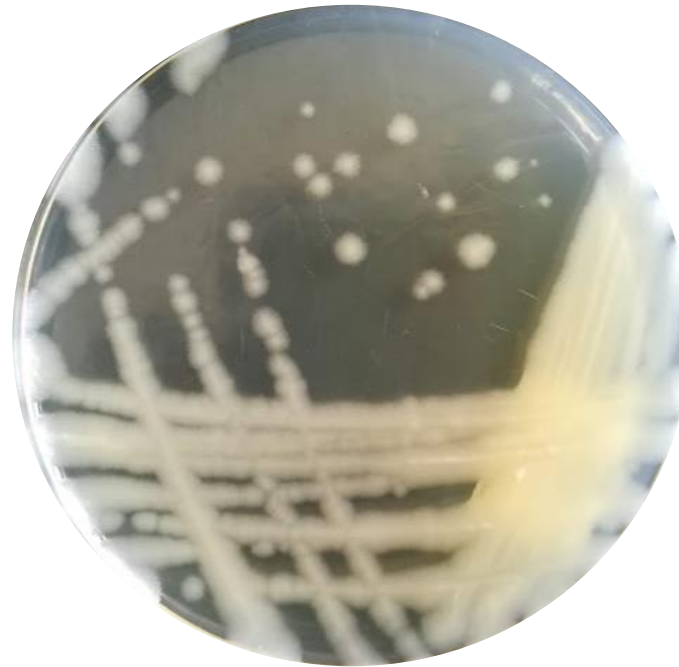
Recuperado de: shorturl.at/uCDY9

El efecto principal del glifosato se debe a la inhibición de la producción de aminoácidos aromáticos (Trp, triptófano; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina) al inhibir EPSPS. El glifosato puede afectar la fotosíntesis al privar el contenido de Tyr y quelar los iones metálicos importantes para la estructura del fotosistema (PS) y la biosíntesis de clorofila.



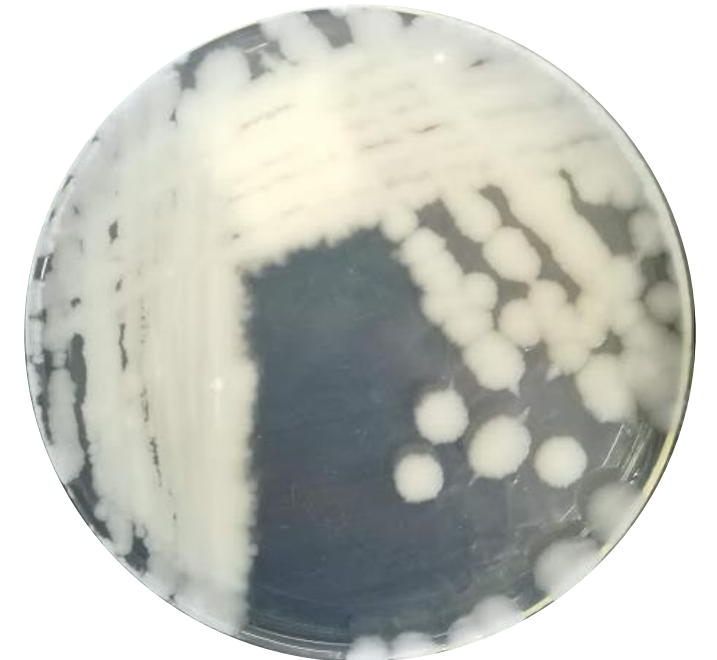
P. extremaustralis

Resistencia al frío



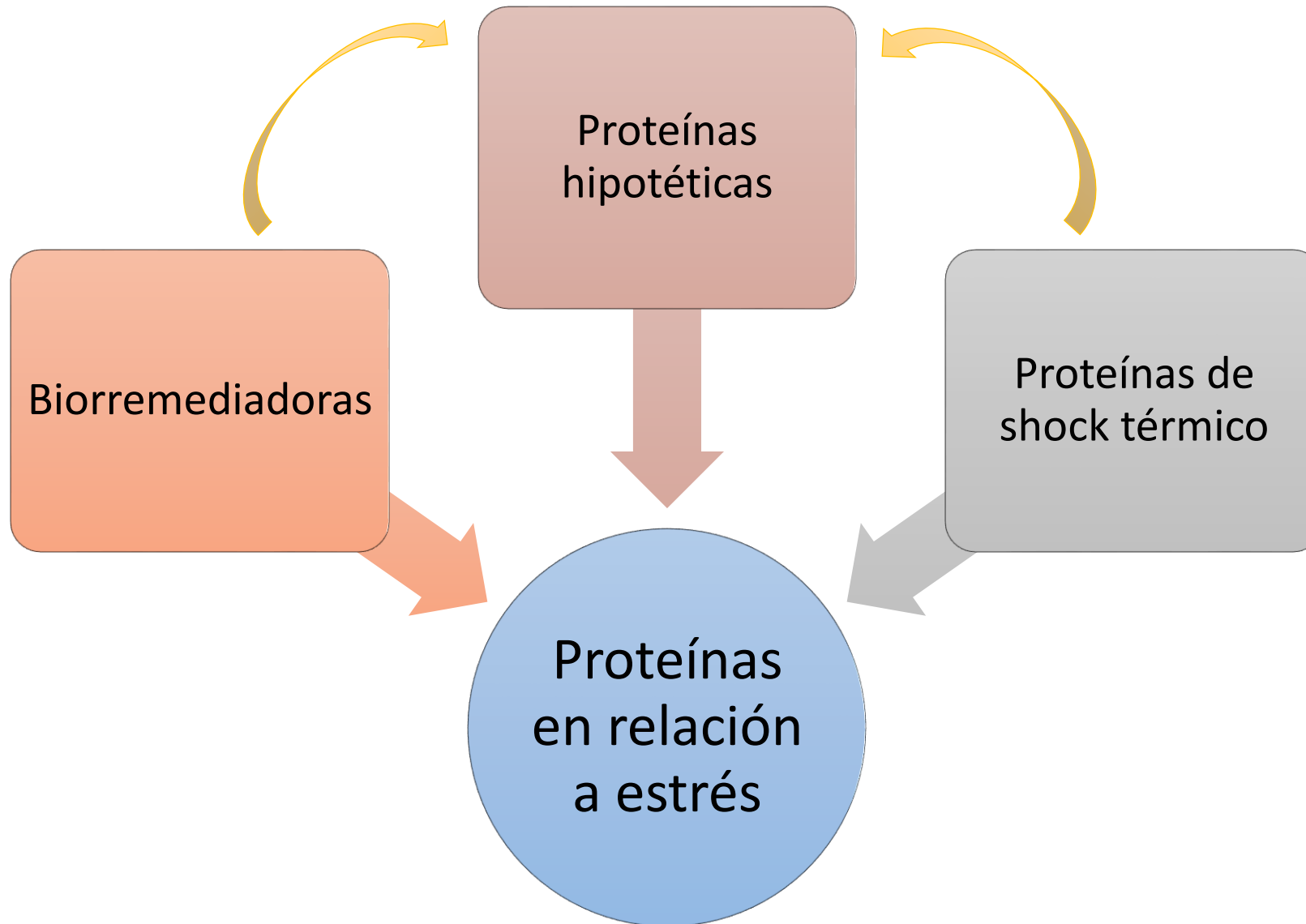
B. subtilis

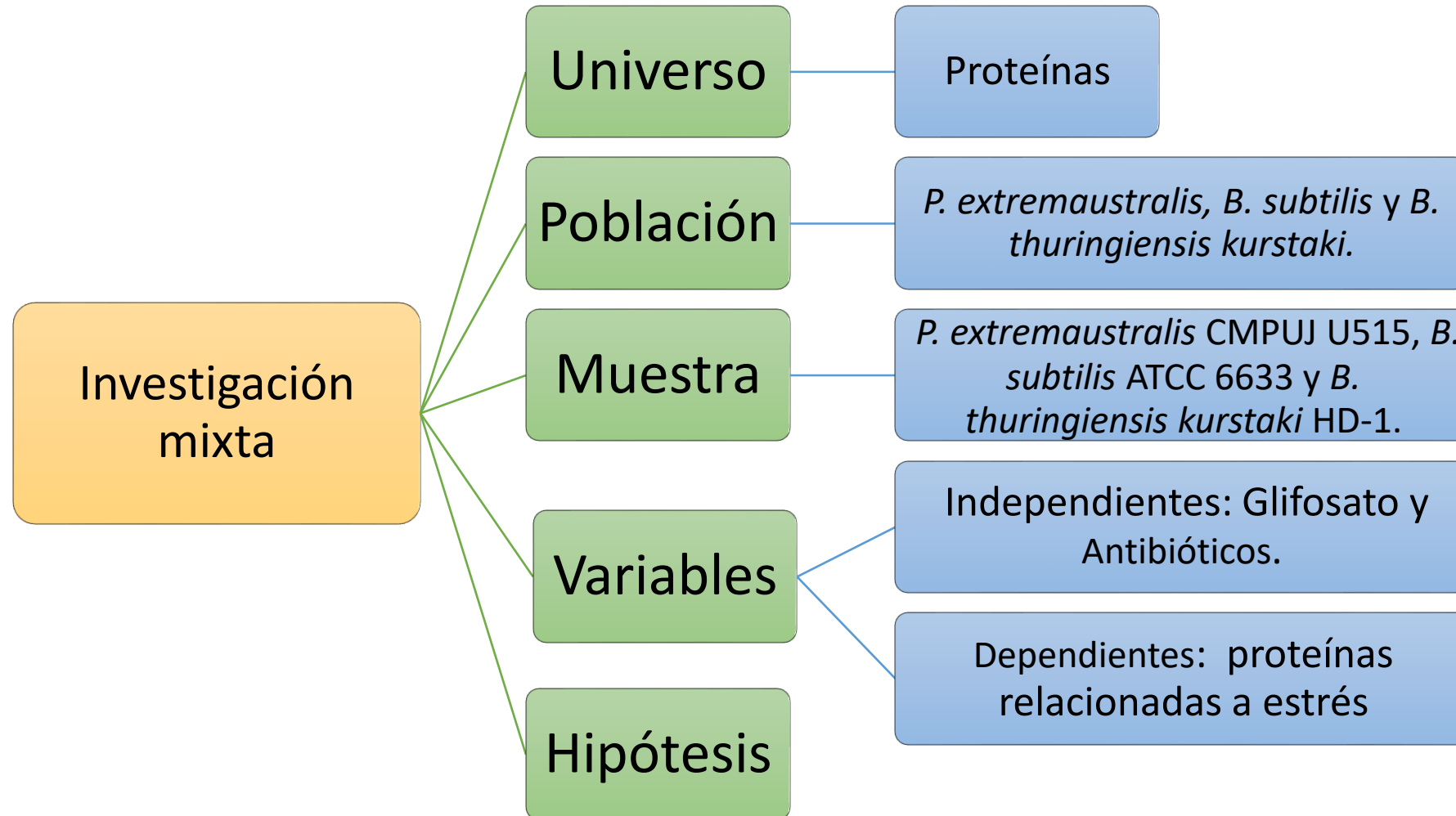
Biofertilizante orgánico



B. thuringiensis

Insecticidas





Cepas

- *P. extremaustralis* CMPUJ U515
- *B. subtilis* ATCC 6633
- *B. thuringiensis kurstaki* HD-1

Identificación funcional de proteínas hipotéticas en relación a una posible degradación de xenobióticos

- GenBank
- tBLASTn
- Valor de corte E < $8e-17$, identidad >40% y cobertura >83%

Utilización de glifosato como única fuente de C

- MMS
- Roundup® 747 SG
- Evaluando a los siete días de incubación

Pruebas de sensibilidad a antibióticos

- Ampicilina y tetraciclina 0.4 µg/mL hasta 100 µg/mL
- Método de difusión disco-placa
- Método de macrodilución en caldo

Extracción proteínas totales

- Biomasa
- Buffer 1 (Tris-HCl 50 mM- pH 8.0, 25% de sacarosa, 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil o) y 60 µg de lisozima/mL
- Buffer 2 (Tris- HCl 50 mM- pH 8.0, 0.4% de triton X-100)
- Cuantificación: Bradford

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

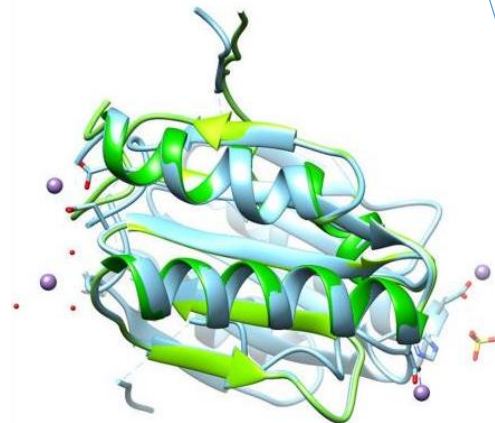
Concentrador y separador al 10%

Proteína	<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. thuringiensis</i> kurstaki HD-1	
Oxigenasas	WP 085040859.1, PRD17982.1, OHC32105.1, WP 127672052.1, OHC34248.1.			gen <i>AlkB</i>
Peroxidasas	PIF48157.1, WP 105818841.1			
Oxidoreductasa	SQF99578.1, OHC35759.1, WP 027981428.1, RUQ46164.1, SQF99578.1, AXQ48582.1, WP 061291478.1, OHC30459.1, TDF12121.1, WP 133075426.1.		WP_001146295.1	Lignina peroxidasa
Oxidoreductasa dependiente de FAD-Degradación glifosato	OHC34248.1, WP 027981428.1, RUQ46164.1, WP 133101968.1, WP 133075426.1, WP 133101968.1, OHC35759.1, WP 027981428.1, RUQ46164.1, WP 133099032.1, RUQ47007.1, WP 133074398.1, WP 133101968.1, WP 133075426.1, WP 027981428.1, WP 133099032.1, OHC32576.1			
Lipasas	OHC34561.1			gen <i>lip515A</i>
Esterasas	SQF99559.1, KSW26486.1, P 038713356.1, OHC34865.1, OHC34558.1, OHC 30601.1			
Carboxilesterasas	AQX48504.1		WP_000798320.1, WP_013658800.1	Proteínas hipotéticas de las cepas <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>B. thuringiensis</i> kurstaki HD-1 relacionadas con posible degradación de xenobióticos.
Hidrolasas	OHC35694.1, WP 027981444.1, OHC9589.1, OHC32430.1, PIF52651.1, WP 053937255.1, SAJ33699.1, OHC33724.1, WP 041702820.1, OHC32219.1, OHC33855.1, OHC36281.1, MAD27263.1, WP 035550064.1, TDF25511.1, WP 133076562.1, WP 133100025.1, OHC35557.1, VAV70700.1		WP_074628820.1, WP_000577705.1, WP_034328134.1, WP_002101148.1	
Deshidrogenasa	PIF48713.1, AXQ50573.1	WP_080030716.1		



Dominios y Familias

CDART, SMART, Pfam,
SUPERFAMILY y SVMProt



Recuperado de: shorturl.at/cDY69

Localización

PSORTdb y CELLO

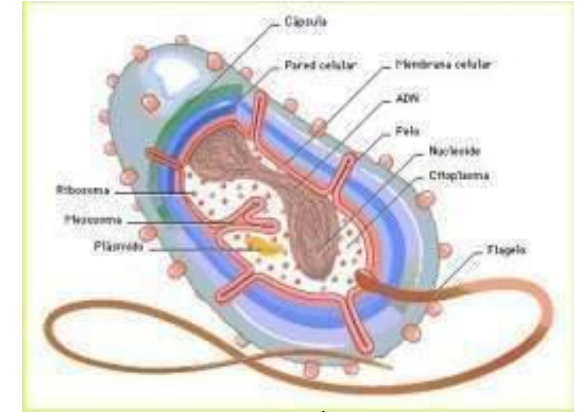
Parámetros físicoquímicos

ProtParam

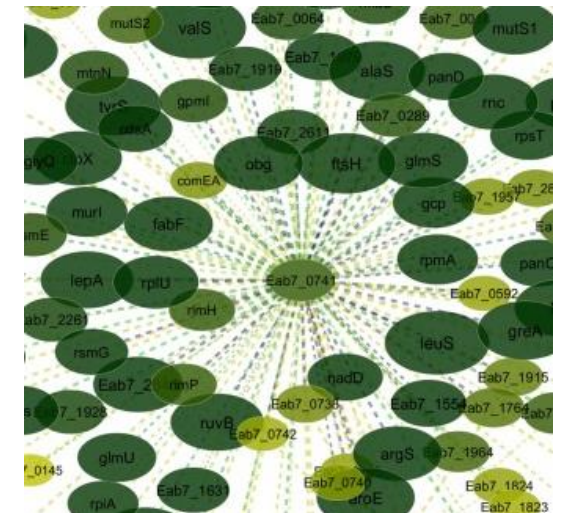
Red de interacción Proteína- proteína

STRING

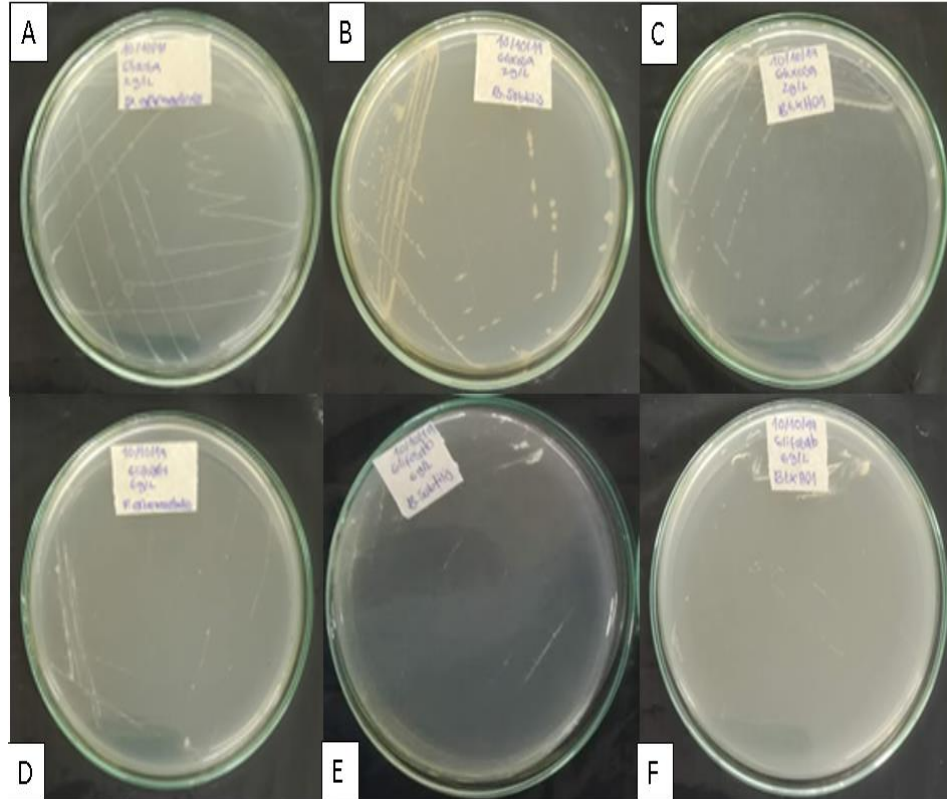
ROC



Recuperado de: shorturl.at/qAJMP



Recuperado de: shorturl.at/aFRSV



Crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 en medio mínimo mineral.

Glifosato oxidorreductasa (GU214711.1)

	Cobertura	Valor E	Identidad
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	96%	2 e-82	37.47%
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	93%	4 e-04	22.30%
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	93%	6 e-09	22.41%

Glicina oxidasa (EC 1.4.3.19)

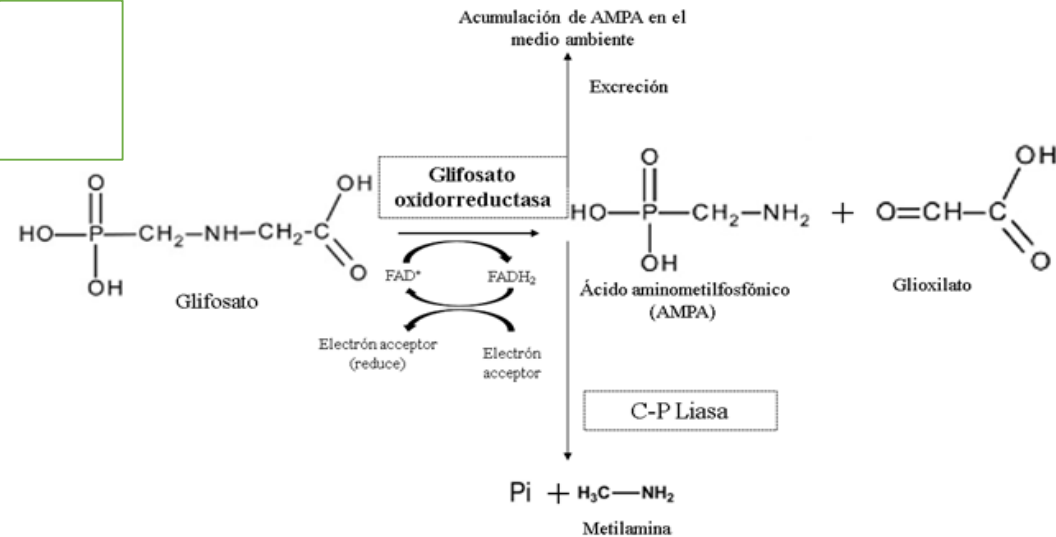
	Cobertura	Valor E	Identidad
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	85%	2 e-13	26.40%
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	83%	1 e-18	29.43%
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	95%	2 e-07	22.76%

C-P Liasa (NP_ 418522.1)

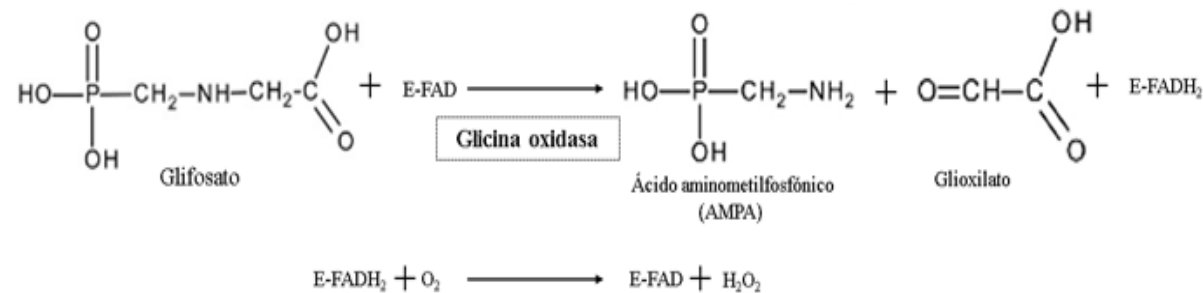
	Cobertura	Valor E	Identidad
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	18%	1	33.33%
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	11%	11	32.26%
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	9%	5	40.74%

Identificación de enzimas involucradas en las vías de degradación del glifosato presentes en el genoma de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1.

Vía AMPA

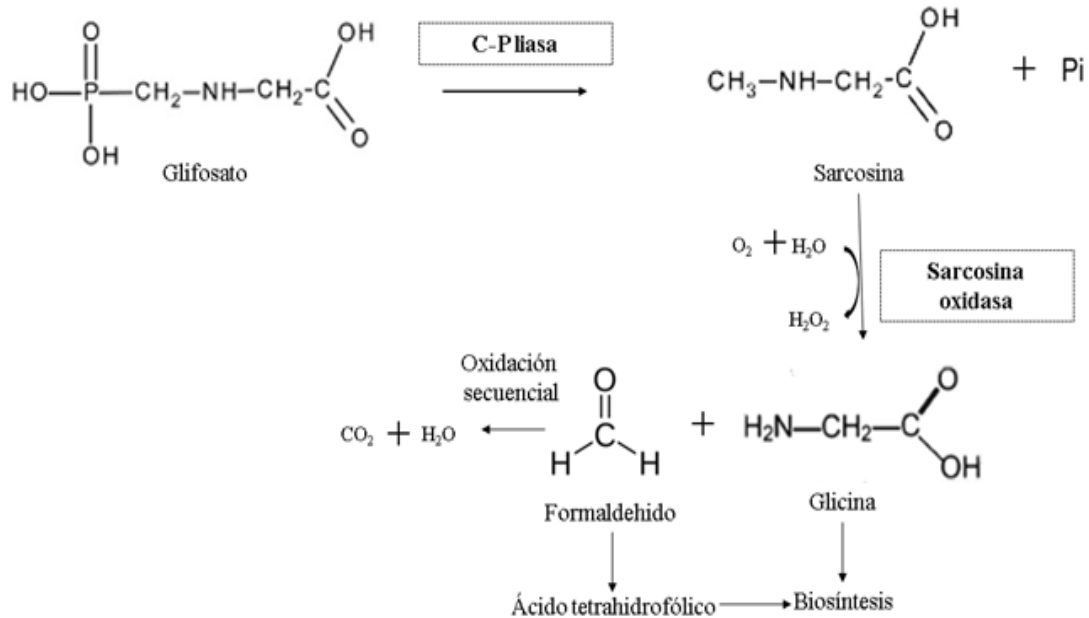


Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía AMPA catalizada por la enzima GOX.

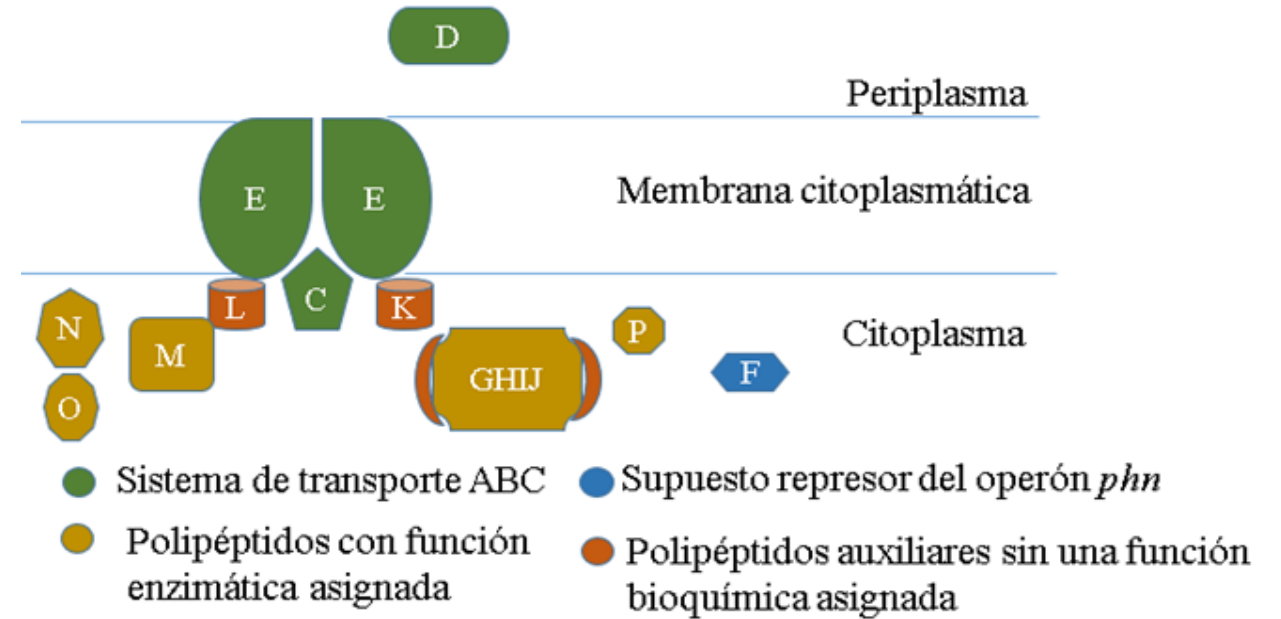


Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía AMPA catalizada por la enzima GO.

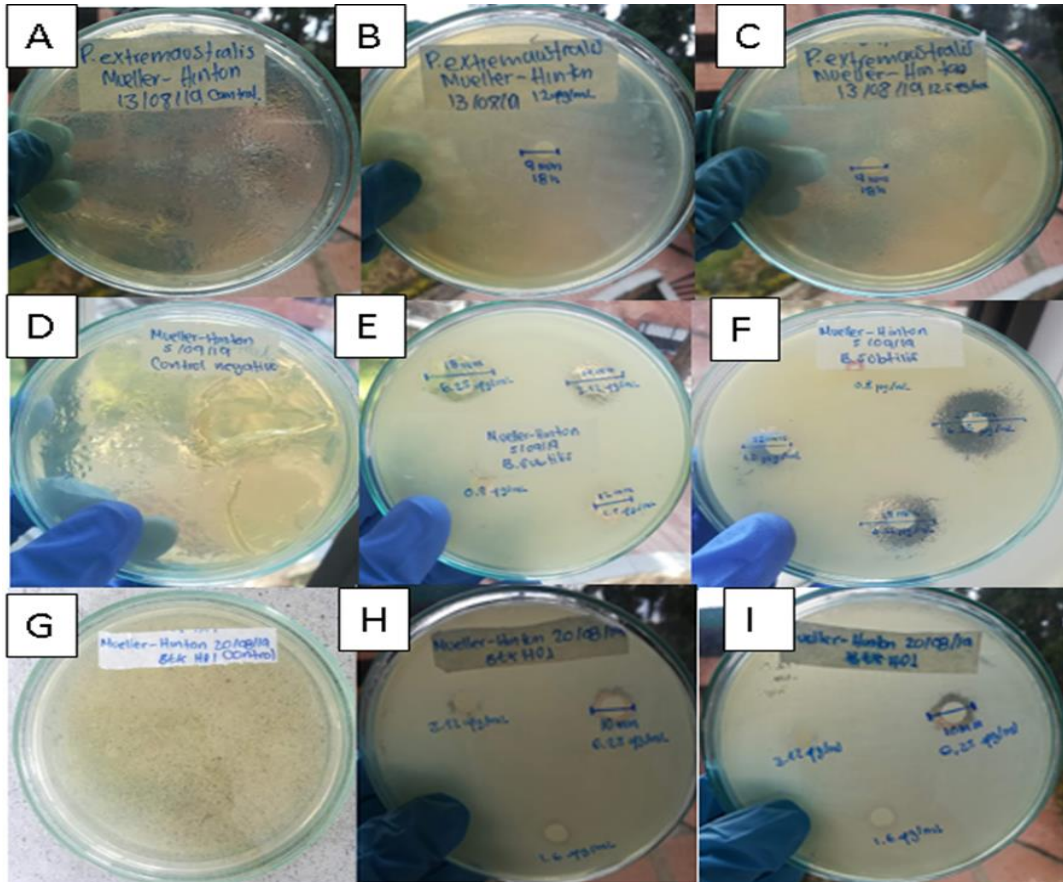
Vía C-P Liasa



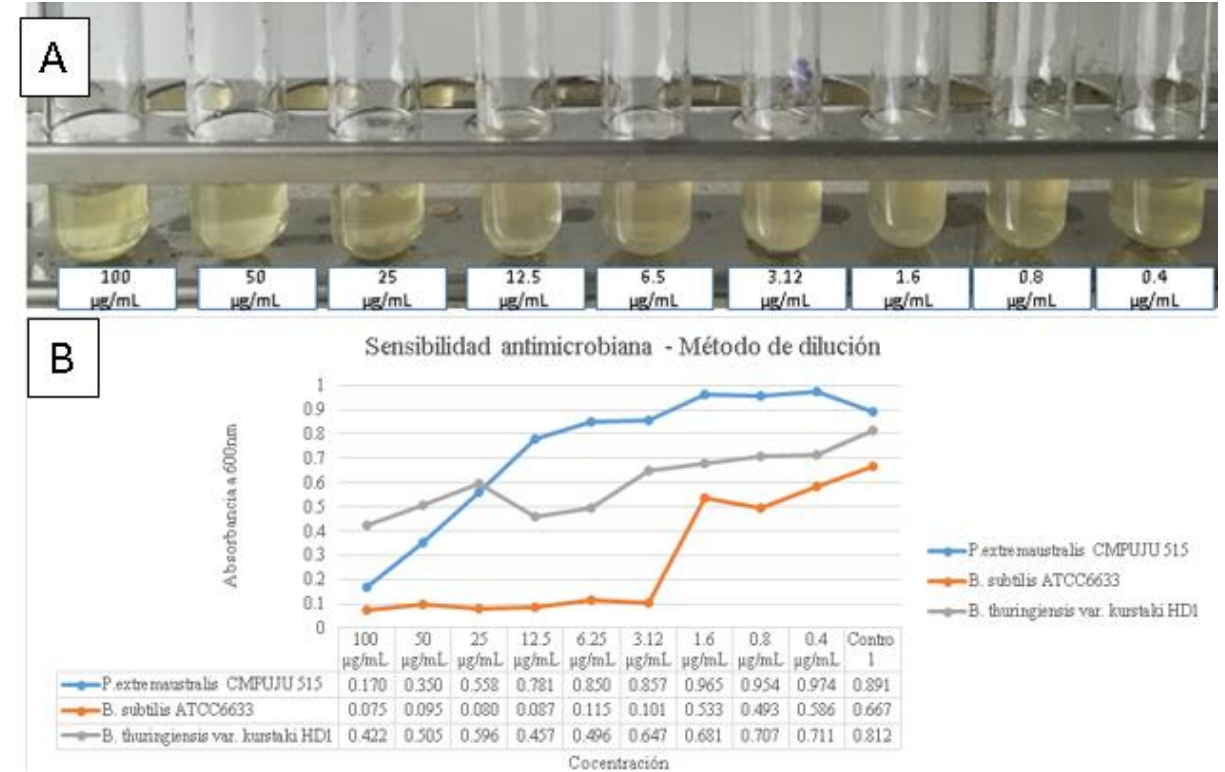
Metabolismo bacteriano del glifosato a través de la vía C-P liasa catalizada por la enzima C-P liasa.



Ubicación y organización propuesta de los polipéptidos codificados en el operón *phn*.



Método de difusión disco-placa realizado a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1



Método de sensibilidad antimicrobiana - Método de macrodilución en caldo realizado a las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1.

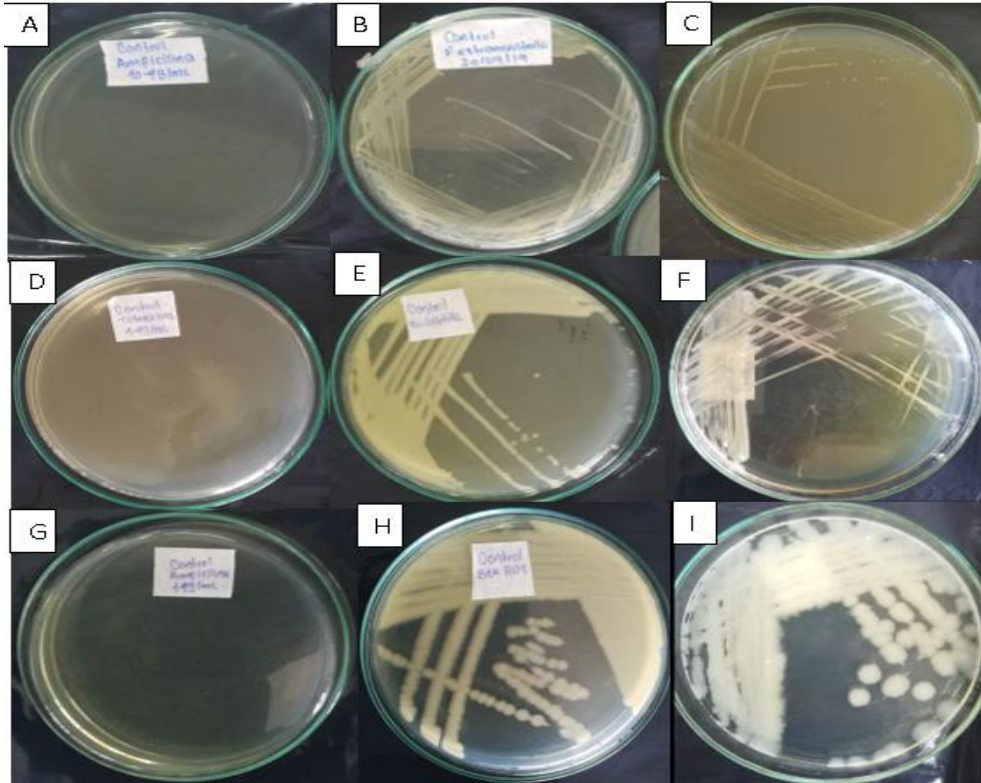
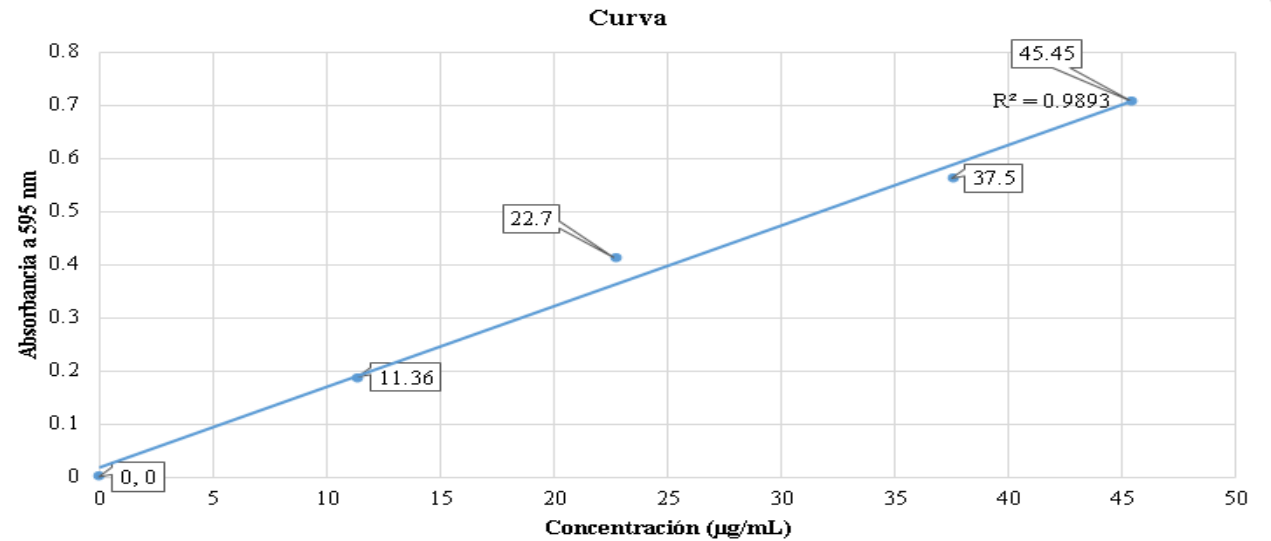
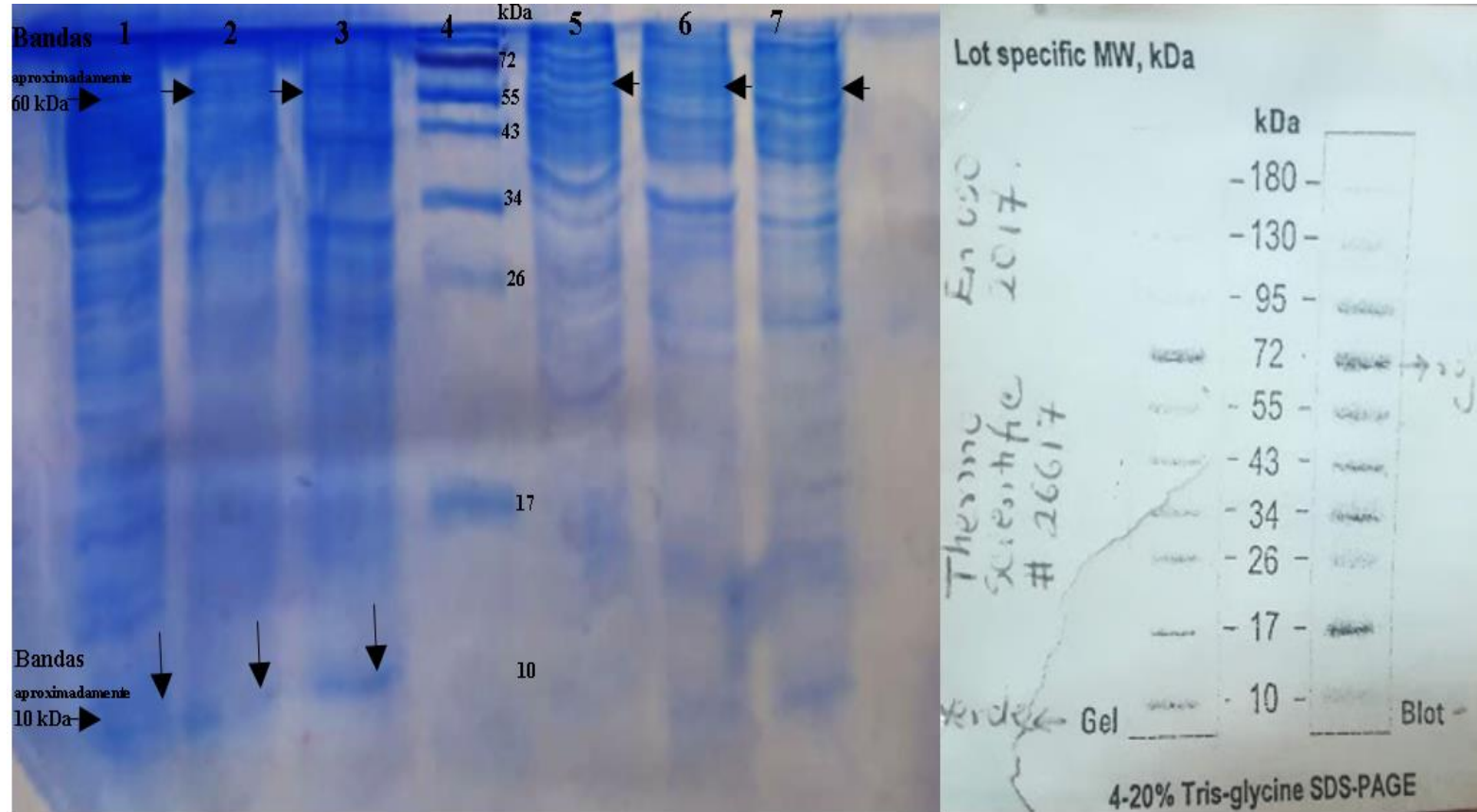


Figura 5. Crecimiento de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 en agar Tripticasa Soya más el antibiótico.



Muestra	Antes del estrés	Después del estrés
<i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515	46.07 µg/ml	60.29 µg/ml (Ampicilina)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	53.18 µg/ml	51.46 µg/ml (Tetraciclina)
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> HD-1	26.35 µg/ml	51.30µg/ml (Ampicilina)

Tabla 7. Concentraciones de proteínas totales de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis* HD-1.



Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Carril 1. *P. extremaustralis* CMPUJ U515 estresada con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Carril 2. *B. subtilis* ATCC 6633 estresada con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina. Carril 3. *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 estresada con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Carril 4. Marcador de peso molecular Thermo Fisher Scientific 26617. Carril 5-7. *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 sin estrés.

1. Se ha identificado que algunas de las proteínas hipotéticas de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 podrían tener una posible función de degradación de xenobióticos.
2. Las cepas *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 no utilizaron glifosato Roundup® 747 SG como única fuente de carbono. *P. extremaustralis* CMPUJ U515 posee la enzima GOX y GO y *B. subtilis* ATCC 6633 la enzima GO, donde estas enzimas tienen la capacidad de degradar el glifosato vía AMPA. *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 no poseen la enzima C-P liasa.
3. Las cepas de estudio *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *B. subtilis* ATCC 6633 y *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 posiblemente sintetizan las proteínas GroEL/GroES (60 y 10 kDa respectivamente) bajo el estrés inducido por el antibiótico.

Se sugiere para futuras investigaciones la caracterización de la biodegradación de glifosato con diferentes variables como pH, inóculo, concentración del glifosato, o tiempo de incubación.

En un próximo estudio, se puede analizar cuantitativamente la expresión de los genes groEL/groES.

**GRACIAS
POR SU
ATENCIÓN**



Recuperado de: shorturl.at/acegG

“La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo”- Nelson Mandela

- Javaid MK, Ashiq M, Tahir M. Potential of Biological Agents in Decontamination of Agricultural Soil. *Scientifica* (Cairo). 2016.
- López G, Diaz C, Shapiro N, Woyke T, Kyrpides NC, Alzate JD, González LN, Restrepo S, and Baena S. Draft genome sequence of *Pseudomonas extremaustralis* strain USBA-GBX 515 isolated from Superparamo soil samples in Colombian Andes. *Stand Genomic Sci.* 2017; 12 (1): 73-82.
- Tribelli PM, Solar EC, Ricardi MM, Gómez M, Raiger LJ, Molin S, and López NI. Novel Essential Role of Ethanol Oxidation Genes at Low Temperature Revealed by Transcriptome Analysis in the Antarctic Bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One.* 2015; 10 (12): 45-53.
- Chen S, Deng Y, Chang C. et al. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. *Scientific Reports.* 2015; 5(1): 8784.
- Abdelhaleem HAR, Zein HS, Azeiz A, Sharaf AN, Abdelhadi AA. Identification and characterization of novel bacterial polyaromatic hydrocarbon-degrading enzymes as potential tools for cleaning up hydrocarbon pollutants from different environmental sources. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019; 67(1): 108-116.
- Zucoloto B, Rodrigues VD, de Oliveira VM, Mariscal LM and Marsaiolia AJ. Enzymatic Potential of heterotrophic bacteria from a neutral copper mine drainage. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2016; 47(1):846-852.
- Pedotti M, Rosini E, Molla G, Moschetti T, Savino C, Vallone B, and Pollegioni L. Glyphosate Resistance by Engineering the Flavoenzyme Glycine Oxidase. *Jurnal Biological Chemistry.* 2009; 284(52):36415-23.
- Fan J, Yang G, Zhao H, Shi G, Geng Y, Hou T, Tao K. Isolation, identification and Characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *The jurnal of general and applied microbiology.* 2012; 58(4): 263-71.
- Seydlová G, Halada P, Fišer R, Toman O, Ulrych A, and Svobodová J. DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *Journal of Applied Microbiology.* 2012; 112 (4): 765-74.