

EH-FC
E-Microbiología
pb

**INTERACCION DE BACTERIAS QUE DEGRADAN
POLICLOROBIFENILOS (PCBs) CON SUSTRATOS
HIDROFÓBICOS: PAPEL DE LA QUIMIOTAXIS Y LA
PRESENCIA DE PROTEINAS EN EL MEDIO
EXTRACELULAR**

Tesis

**Entregada a La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Felipe Gabriel Gordillo Fuenzalida

Julio, 2009

Director de Tesis Dr. Carlos A. Jerez



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

FELIPE GABRIEL GORDILLO FUENZALIDA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de Abril del año 2009.

Director de Tesis:

Dr. . . CARLOS JEREZ

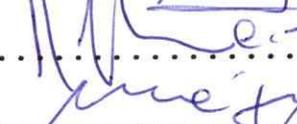
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. . . . ROSALBA LAGOS

Dr. ROMILIO ESPEJO

Dr. CLAUDIO VASQUEZ


.....


.....

.....

.....



Como dos aves doradas posadas en el mismo árbol, el ego y el yo, íntimos amigos, viven en el mismo cuerpo. El primero come los frutos dulces y amargos del árbol de la vida, mientras que el segundo observa con indiferencia.

Upanishad Mundaka

A mi Familia y Amigos.

AUTOBIOGRAFIA



Nací en Santiago en Noviembre de 1976. El menor de tres hermanos. Crecí en una especie de burbuja mental a pesar de tener amigos con los que me entretenía mientras hacíamos travesuras. Desde mi infancia me he sentido atraído por temas filosóficos y científicos, en especial queriendo conocer la compleja red de funcionamiento de los organismos vivos. Recuerdo esos momentos desarmando relojes o abriendo los cuerpos de los animales para saber qué era lo que les otorgaba "vida". En mi mundo de introversión y en mis ratos a solas, me abstraía observando las estrellas o las nubes, en especial esas que se parecen a los dulces de algodón, tal vez buscando en ellas las respuestas a todas mis inquietudes. A la edad de cinco años y por motivos de trabajo migramos a la ciudad de Oruro, Bolivia en donde estudié por un periodo de dos años en el colegio Ignacio León. Después del terremoto del año 1985 y forzados por la situación de la época regresamos a Santiago para establecernos hasta el día de hoy. Ese mismo año ingresé al colegio Regina Pacis, en donde cursé hasta sexto año de enseñanza básica. A los 12 años, me matriculé en el Instituto Nacional José Miguel Carrera lugar en el que cursé hasta cuarto año de enseñanza media. Inclinado siempre por el área científica, ingresé a la Carrera de Bioquímica en la Pontificia Universidad Católica de Chile, lugar donde obtuve la Licenciatura y el Título Profesional de Bioquímico. Fue entonces cuando centré mis intereses en los temas medio ambientales al realizar mi Tesis en el estudio de enzimas xilanolíticas con aplicación biotecnológica en el laboratorio del Dr. Jaime Eyzaguirre. Hice una pequeña estadía en esa misma Casa de Estudios en el laboratorio de la Dra Paulina Bull donde aprendí diversas técnicas de biología molecular.

Ingresé al Doctorado de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para profundizar mis conocimientos en esta área. Es así como abordé el tema de la biorremediación en bacterias degradadoras de policlorobifenilos con el Dr. Carlos Jerez. En esta casa de estudios expandí mis conocimientos y conocí a nuevas personas que me brindaron su amistad y ayuda profesional invaluable. Tuve la oportunidad de viajar a Dinamarca y Alemania para trabajar en los laboratorios de los Drs. Dave Ussery y Otto Holst, respectivamente. En esas instancias, conocí a un sinnúmero de excelentes personas, nuevas formas de pensamiento y nuevas culturas.

Hoy, al finalizar este largo periodo de aprendizaje, quisiera que este manuscrito de Tesis no sólo fuera recordado como parte del proceso de obtención del máximo grado académico que entrega esta Casa de Estudios, sino que también quede en él registrado el autentico espíritu que hace moverse a un Sagitario y su noble misión: la incansable búsqueda de la verdad.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Dr. Carlos Jerez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y darme el apoyo necesario para finalizar esta Tesis. Al Dr. Nicolás Guiliani, Francisco Chavez, Lissette Valenzuela, Mario Vera, Claudio Navarro, Alvaro Orell, Simón Beard, Mauricio Acosta, Matías Castro, Cecilia Mauriaca, Alvaro Banderas, José Ponce, Lina Ruiz, Susana Valenzuela, Alex González, María José Gallardo, Valentina Abarca, Pilar Cortés por sus ayudas técnicas, buenas vibras y por supuesto por sus valiosos comentarios científicos, apoyos y críticas en los momentos oportunos. Para finalizar este segmento, quiero destacar la excelente calidad humana del señor Juan Araos. A todos ustedes les estoy profundamente agradecido.

Mis gracias van dirigidas también al Dr. Dave Ussery del Centro de Análisis de Secuencias Biológicas de la Universidad Técnica de Dinamarca por aceptarme en su laboratorio para trabajar por un par de meses en el desarrollo de la sección bioinformática de esta Tesis.

A las personas que me ayudaron en Borstel, Alemania: al Dr. Otto Holst por su oportunidad de dejarme “curiosear” con mis investigaciones en su laboratorio. A Reggina Engel por su excelente ayuda técnica, y a mis amigos Néstor González (“Pinche Nestor”), Kay Vogel (Kayuchín), Elena Ciliberti (“Mi Senti Papa”), Anna Hanuszkiewicz (“Aniuchquevesich”), Irela Mazar (“Irelita”), Marcela Manrique (“Azubi Girl”) y Zj Liu (“Step by Step”).

A mis amistades del Programa del Doctorado por hacer de éste una “instancia” más agradable: Aniela Wozniak, Jae Yen Shin, Verónica García, Alba Ricardo y José Perez.

A mis amigos “Los Abuslemianos” por brindarme todo su apoyo: Jorge Martínez, Cristian Orellana, Alejandro Orellana, Patricio Abusleme, Juan Pablo Jarufe, José Luis Moncada y Cristian Arredondo.

A mi familia, por darme su total e incondicional apoyo durante esta larga travesía, a ellos les estoy profundamente agradecido.

Por último a toda esa gente que de alguna u otra forma me ayudado con su buena disposición y que en este momento se me queda en el tintero...

Finalmente mis agradecimientos a las Instituciones que me brindaron el apoyo económico para realizar esta Tesis. CONICYT por su beca de mantención y la beca de apoyo de Tesis, así como a la beca MECESUP para realizar las dos estadías en el extranjero.



INDICE DE MATERIAS



1. Introducción.....	1
1.1. La contaminación ambiental. La situación de los PCBs en Chile.....	1
1.2. La biorremediación como estrategia para eliminar los PCBs.....	2
1.3. Biodisponibilidad de los PCBs.....	4
1.4. Quimiotaxis y su papel en la biorremediación.....	4
1.5. Los biosurfactantes y su participación en la biorremediación.....	7
1.5.1. Los biosurfactantes de bajo peso molecular y la degradación de los PCBs.....	8
1.5.2. Función de los biosurfactantes de alto peso molecular.....	9
1.6. Función de las proteínas extracelulares y características generales de los translocones involucrados en secreción.....	11
2. Materiales y Métodos.....	16
2.1. Materiales.....	16
2.1.1. Cepas bacterianas.....	16
2.1.2. Reactivos.....	16
2.2. Métodos.....	17
2.2.1. Condiciones de cultivo.....	17
2.2.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	17
2.2.3. Microscopía electrónica de barrido.....	18
2.2.4. Ensayo de “swimming” o de motilidad en placa.....	18
2.2.5. Ensayo modificado del capilar.....	18
2.2.6. Ensayos de “swarming” o quimiotaxis en placa.....	19
2.2.7. Ensayos de viabilidad en presencia de 3-CBA.....	20
2.2.8. Extracción de proteínas totales solubles desde <i>B. xenovorans</i> LB400.....	20
2.2.9. Extracción de proteínas extracelulares desde <i>B. xenovorans</i> LB400.....	21
2.2.9.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético.....	21
2.2.9.2. Precipitación de proteínas con rojo de pirogalol.....	21
2.2.10. Separación de proteínas por 2D-PAGE.....	22
2.2.11. Análisis y secuenciación de proteínas.....	22



2.2.12. Preparación de sobrenadantes de cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400 para análisis de posibles EPS.....	23
2.2.13. Separación cromatográfica del material liofilizado por columna de filtración molecular.....	23
2.2.14. Determinación de azúcares neutros.....	24
2.2.15. Estudio de las propiedades emulsificantes de los sobrenadantes de cultivo.....	25
2.2.16. Análisis bioinformáticos.....	25
3. Resultados.....	27
3.1. Caracterización de la movilidad de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400 mediante microscopía y ensayos de movilidad.....	27
3.2. Cuantificación de la quimiotaxis de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400 tanto hacia bifenilo como a distintos clorobifenilos e intermediarios de la degradación de los PCBs.....	28
3.2.1. Quimiotaxis hacia bifenilo y policlorobifenilos utilizando ensayos cualitativo y cuantitativos.....	28
3.2.2. Quimiotaxis hacia ácido benzoico y cloroderivados utilizando ensayos cualitativo y cuantitativos.....	31
3.2.3. Inhibición del crecimiento por los ácidos clorobenzoicos.....	34
3.3. Determinación de las propiedades emulsificantes de preparaciones crudas de las proteínas extracelulares de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400.....	35
3.3.1. Análisis de una posible sustancia exopolimérica en <i>B. xenovorans</i> LB400 y <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	35
3.3.2. Actividad emulsificante de los sobrenadantes de cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400.....	38
3.4. Análisis <i>in silico</i> de las posibles proteínas secretadas en <i>B. xenovorans</i> LB400....	39
3.4.1. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas secretadas.....	39
3.4.2. Análisis <i>in silico</i> de las proteínas secretadas en otros microorganismos del género <i>Burkholderia</i>	40
3.4.3. Búsqueda informática de ortólogos de la proteína AlnA de <i>A. radioresistens</i> K53 en el genoma de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	41



3.5.	Caracterización de las proteínas extracelulares y su expresión diferencial en <i>B. xenovorans</i> LB400 crecida en medio definido y utilizando bifenilo, ácido benzoico (un intermediario de la degradación de bifenilo) o glucosa como únicas fuentes de carbono y energía.....	44
3.5.1.	Estandarización de un protocolo de precipitación de proteínas.....	44
3.5.2.	Comparación de los perfiles de proteínas de las fracciones de extractos totales solubles y extracelulares mediante 2D-PAGE.....	45
3.5.3.	Separación y secuenciación de las proteínas extracelulares de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	47
4.	Discusión.....	57
4.1.	Caracterización de la movilidad de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400 mediante microscopía y en ensayos de movilidad.....	57
4.2.	Cuantificación de la quimiotaxis de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400 tanto hacia bifenilo como a distintos clorobifenilos e intermediarios de la degradación de los PCBs.....	58
4.3.	Determinación de las propiedades emulsificantes de preparaciones crudas de las fracciones extracelulares de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y de <i>B. xenovorans</i> LB400....	62
4.4.	Análisis <i>in silico</i> de las posibles proteínas secretadas en <i>B. xenovorans</i> LB400.....	65
4.5.	Caracterización de las proteínas extracelulares y su expresión diferencial en <i>B. xenovorans</i> LB400 crecida en medio definido suplementado con glucosa, bifenilo, o ácido benzoico como únicas fuentes de carbono y energía.....	67
5.	Conclusiones.....	74
6.	Referencias.....	76
7.	Anexos.....	84
7.1.	Anexo I.....	84
7.2.	Anexo II.....	85

ABREVIATURAS

1D-PAGE	:	electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida
2D-PAGE	:	electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
AB	:	ácido benzoico
ABC	:	ATP binding cassette. Dominio que une ATP
BLAST	:	basic local alignment search tool
CB	:	clorobifenilo
CBA	:	ácido clorobenzoico
CHAPS	:	3-[(3-clamidopropil)-dimetilamino] propansulfato
COPs	:	compuestos orgánicos persistentes
D.O.	:	densidad óptica a 600 nm
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	ácido etilendiaminotetracético
EPS	:	sustancias exopoliméricas
ESI-QUAD-TOF	:	ionización por electrospray y un analizador de tiempo de vuelo
IQR	:	índice quimiotáctico relativo
LB	:	Luria Bertani
MCP	:	methyl accepting chemotaxis protein. Proteínasceptoras de grupos metilo
NAPL	:	fase líquida no acuosa
OMP	:	proteína de membrana externa
PBS	:	amortiguador fosfato salino
PCBs	:	policlorobifenilos
PMSF	:	fluoruro de metilsulfonilfenilo
PRMM	:	reactivo de rojo de pirogalol
PVDF	:	fluoruro de polivinildeno
SEM	:	microscopía electrónica de barrido
SDS	:	sodio dodecil sulfato
TCA	:	ácido tricloacético
TEM	:	microscopía electrónica de transmisión
Tris	:	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UFC	:	unidades formadoras de colonia



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía metabólica propuesta para la degradación de bifenilo y de la cometabolización de los PCBs en <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707 y <i>B. xenovorans</i> LB400.....	3
Figura 2. Esquema simplificado del fenómeno de quimiotaxis en bacterias Gram-negativas.....	5
Figura 3. Esquema general de los seis sistemas de secreción (I-VI) en bacterias Gram-negativas.....	13
Figura 4. Movilidad de las bacterias degradadoras de PCBs.....	27
Figura 5. Presencia de estructuras flagelares en <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y <i>B. xenovorans</i> LB400.....	28
Figura 6. Respuesta quimiotáctica de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 utilizando el ensayo de “swarming”.....	29
Figura 7. Quimiotaxis de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 hacia varias concentraciones de bifenilo.....	30
Figura 8. Efecto del crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 en dos medios de cultivo en la quimiotaxis hacia bifenilo y sus derivados clorados.....	31
Figura 9. Respuesta quimiotáctica de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 hacia ácido benzoico y sus derivados clorados observado por el ensayo de “swarming”.....	31
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 en distintas fuentes de carbono.....	32
Figura 11. Quimiotaxis de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 hacia varias concentraciones de ácido benzoico.....	33
Figura 12. Efecto del crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 en dos medios de cultivo en la quimiotaxis hacia el ácido benzoico y sus derivados clorados.....	33
Figura 13. Efecto tóxico de diferentes ácidos clorobenzoicos en <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	34
Figura 14. <i>B. xenovorans</i> LB400 y <i>Pseudomonas</i> sp. B4 presentan un posible EPS.....	36
Figura 15. Separación cromatográfica de los sobrenadantes de cultivo de <i>B. xenovorans</i> LB400 y <i>Pseudomonas</i> sp. B4 crecidas en glucosa al 1%.....	37



Figura 16. Perfil cromatográfico de las muestras de azúcares neutros de posibles EPS en <i>B. xenovorans</i> LB400 y en <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	37
Figura 17. Determinación de la actividad emulsificante de los sobrenadantes de cultivo extraídos desde las dos fases de crecimiento en <i>Pseudomonas</i> sp. B4 y en <i>B. xenovorans</i> LB400.....	38
Figura 18. Representación gráfica de los datos obtenidos a partir del análisis computacional del proteoma de <i>B. xenovorans</i> LB400 usando el programa SubCell v.1.0.....	40
Figura 19. Análisis del proteoma de <i>B. xenovorans</i> LB400 y de bacterias pertenecientes al género <i>Burkholderia</i>	41
Figura 20. Alineamiento de la secuencia de la AlnA de <i>A. radioresistens</i> K53 con la secuencia aminoácídica codificada por el gen Bxe_A3482 de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	43
Figura 21. Comparación de los protocolos de precipitación de proteínas mediante SDS-PAGE.....	45
Figura 22. Comparación de perfiles de proteínas totales solubles (ES) y de proteínas de la fracción extracelular (CS) de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	46
Figura 23. Separación de las proteínas extracelulares extraídas desde sobrenadantes de cultivo de <i>B. xenovorans</i> LB400 mediante 2D-PAGE.....	47
Figura 24. Cuatro secciones de los geles bidimensionales indicando la ubicación de las manchas de proteínas cuya expresión diferencial se observó en las tres condiciones de cultivo.....	48
Figura 25. Modelos tridimensionales de algunos integrantes de la superfamilia de proteínas YceI.....	55
Figura 26. Modelo tridimensional de la proteína YceI de <i>B. xenovorans</i> LB400 acomplejada con un ligando.....	72
Figura 27. Posibles funciones de la quimiotaxis y de los biosurfactantes (proteicos o de carácter polisacárido) en la interacción de las bacterias degradadoras con los PCBs.....	73



LISTA DE TABLAS

Tabla I. Compuestos atrayentes para algunas de las bacterias que degradan agentes contaminantes.....	7
Tabla II. Algunos ejemplos de biosurfactantes de alto y bajo peso molecular encontrados en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.....	8
Tabla III. Cuatro ejemplos de biosurfactantes de alto peso molecular.....	10
Tabla IV. Resumen del análisis global del proteoma de <i>B. xenovorans</i> LB400 organizado por segmentos génicos utilizando el servidor SubCell v. 1.0.....	39
Tabla V. Posibles proteínas ortólogas a la AlnA de <i>A. radioresistens</i> K53 que están codificadas en el genoma de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	46
Tabla VI. Identificación de las proteínas aisladas desde los sobrenadantes de cultivo de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	49
Tabla VII. Identificación de las señales de secreción en las proteínas secuenciadas desde la fracción extracelular.....	51

RESUMEN

La liberación de contaminantes ambientales, principalmente por industrias, causa varios problemas asociados a la salud humana y un severo daño a la biósfera. De las variadas estrategias que se han utilizado para resolver este problema ambiental, la solución mediante el uso de bacterias degradadoras de contaminantes ambientales (biorremediación) es una alternativa eficiente y menos costosa en comparación a otros métodos. La mayoría de los avances que se han logrado en los últimos 25 años respecto al tema de la biorremediación se han enfocado principalmente en caracterizar tanto a nivel genético como enzimático muchas de las cepas aisladas de suelos contaminados.

Los policlorobifenilos (PCBs) son compuestos organoclorados que han sido catalogados como uno de los principales contaminantes medioambientales. Muchos microorganismos son capaces de transformar algunos PCBs a unidades más sencillas e inocuas utilizando rutas metabólicas especiales. Entre estos se encuentran las bacterias Gram-negativas *Pseudomonas* sp. B4 y *Burkholderia xenovorans* LB400, las que pueden transformar y, en algunos casos, usar algunos PCBs como únicas fuentes de carbono y energía. La vía metabólica que transforma los PCBs se identificó en *B. xenovorans* LB400, lográndose aislar y clonar el locus *bph* responsable de la degradación de estos compuestos.

Se supone que las enzimas que transforman los PCBs presentan una localización citoplásmica y para que lleven a cabo sus actividades enzimáticas requieren de moléculas de agua. La mayoría de los PCBs son insolubles en agua por lo que en suelos se encontrarían firmemente adheridos a éste formando parte de una fase líquida no acuosa. Si las bacterias poseen movilidad y quimiotaxis, la degradación se llevaría a cabo más eficientemente ya que los microorganismos accederían más fácilmente a los compuestos a degradar. Posteriormente, las bacterias podrían secretar y/o excretar moléculas con actividades biosurfactantes (proteínas o polisacáridos) que facilitarían la emulsificación de

la molécula de PCB. El resultado de estas interacciones sería un aumento en la biodisponibilidad del PCB para su posterior metabolismo.

La movilidad y la quimiotaxis corresponden al movimiento directo de una bacteria acercándose o alejándose en las gradientes de un compuesto. Determinamos que *Pseudomonas* sp. B4 es más móvil que la cepa modelo *B. xenovorans* LB400. Observamos que la cepa más móvil presentó quimiotaxis hacia bifenilo y cloroderivados utilizando dos tipos de ensayos. La bacteria también fue atraída hacia el ácido benzoico, un intermediario de la degradación de bifenilo. El intermediario de la degradación de 3-clorobifenilo, 3 clorobenzoato, fue tóxico para *Pseudomonas* sp. B4. Debido a la falta de movilidad de la cepa modelo *B. xenovorans* LB400, los ensayos para demostrar quimiotaxis no se pudieron realizar con este microorganismo. Los microorganismos degradadores de PCBs debiesen tener la capacidad para moverse y responder a gradientes formadas por estos compuestos haciendo más eficiente la biorremediación.

Por otra parte, estudiamos la presencia de actividades emulsificantes en los sobrenadantes de cultivo de las bacterias en estudio. En la búsqueda de estas actividades se evidenció, mediante microscopía electrónica, la presencia de un material amorfo que rodeó a la envoltura celular en la fase exponencial y que disminuyó en la fase estacionaria. Este material estuvo presente en forma independiente del sustrato en el cual se crecieron ambas bacterias. Por análisis cromatográficos de estos compuestos encontramos que estos posiblemente correspondan a sustancias exopoliméricas (EPS) constituídas por manosa, glucosa y galactosa en *Pseudomonas* sp. B4 y dos tipos de EPS en *B. xenovorans* LB400 constituídos por glucosa y galactosa. Sin embargo, evidenciamos que muestras liofilizadas provenientes de los sobrenadantes de cultivo de ambas bacterias extraídas de las dos fases de crecimiento, carecieron de actividad emulsificante hacia una mezcla de dos compuestos hidrofóbicos.

Finalmente se abordó la caracterización diferencial de las proteínas extracelulares en *B. xenovorans* LB400. Primero, mediante un análisis *in silico* encontramos que esta bacteria y algunos miembros del género *Burkholderiae* secretarían entre un 13-19 % de sus proteomas. *B. xenovorans* LB400 posee 1.195 proteínas que podrían ser destinadas a la membrana interna, al espacio periplásmico, la membrana externa y/o al espacio extracelular. Una de estas proteínas presentó un 26,7 % de identidad con la AlnA de *Acinetobacter radioresistens* K53, el caso más estudiado de proteínas extracelulares con actividad emulsificante hacia compuestos hidrofóbicos. Sin embargo, el ortólogo de *B. xenovorans* LB400 careció de dos de las cuatro regiones de la proteína AlnA, necesarias para la emulsificación de compuestos hidrofóbicos.

Utilizando 2D-PAGE caracterizamos la expresión diferencial de las proteínas extracelulares en *B. xenovorans* LB400 en tres condiciones de cultivo. Encontramos que de las doce proteínas más abundantes en el sobrenadante, ocho de ellas se encontraron en nuestra lista de posibles proteínas secretadas, indicando que en efecto ellas son secretadas de forma activa al medio extracelular. Siete de estas doce proteínas se encontraron en mayor concentración en los sobrenadantes de cultivo de las células crecidas en bifenilo. Una de estas proteínas, que también se encontró en los sobrenadantes de células crecidas en ácido benzoico, corresponde a una proteína perteneciente a la superfamilia de las proteínas YceI. Este grupo de proteínas presenta un pliegue similar al de las lipocalinas, proteínas caracterizadas por transportar y almacenar moléculas con naturaleza hidrofóbica. Esta proteína presenta una masa molecular de 21 kDa y un punto isoelectrico de 7,3. Además, presentó un péptido señal de tipo sec que teóricamente tendría 22 residuos. La masa de la proteína madura sería de 18,8 kDa con un punto isoelectrico de 6,3. Usando modelos cristalográficos ya descritos en la base de datos, determinamos que esta proteína presenta una estructura de tipo barril de ocho hebras β -antiparalelas en cuyo interior alberga residuos de aminoácidos con cadenas laterales de carácter apolar que

interactuarían con las moléculas hidrofóbicas. Sugerimos que esta proteína podría estar involucrada en el transporte de moléculas tales como los PCBs desde el espacio extracelular hacia la membrana externa de la bacteria, fenómeno que es enteramente desconocido en estos microorganismos y que podría ser relevante en su actividad de biorremediación.

ABSTRACT

The release of pollutants to the environment, mainly by industrial processes, is in part responsible for the increase in the actual human health problems and biosphere damage. The bioremediation process seems to be the most convenient strategy to solve the problem caused by pollutants. In the last 25 years scientific investigation was focused mainly in the characterization at genetic and enzymatic level of metabolic routes which are involved in transformation of these compounds.

The polychlorobiphenyl (PCBs) are hydrophobic molecules catalogued as priority pollutants. Microorganisms like bacteria are capable to transform some PCBs to less harmful molecules using special metabolic routes. *Burkholderia xenovorans* LB400 and *Pseudomonas* sp. B4 are two Gram-negative bacteria which can transform PCB molecules, and in some cases, use some PCBs molecules as the only carbon source. The *bph* locus in *B. xenovorans* LB400 encodes for enzymes which are involved in PCB transformation.

It is assumed that enzymes which transform PCBs have an intracellular localization and for an efficient transformation they require water molecules for their activities. However, PCBs congeners are hydrophobic molecules and possibly they are adsorbed to solid surfaces being part of a non-aqueous liquid phase, limiting their bioavailability. Motility and chemotaxis phenomena and biosurfactant production are two physiological processes suggested to be necessary for an efficient degradation of PCB contaminated soils. Motility and chemotaxis should bring bacteria to the polluted sites where they eventually could secrete or excrete molecules (proteins or polysaccharides) with emulsifying activity.

Motility and chemotaxis are two behavioral responses, that involve the direct movement of the bacteria towards or against a gradient of compound. We showed that *Pseudomonas* sp. B4 is more motile than the model bacteria strain *B. xenovorans* LB400. We

observed that *Pseudomonas* sp. B4 shown chemotaxis towards biphenyl and chlorobiphenyl using two different assays. Furthermore, this bacteria was attracted to benzoic acid, an intermediate of biphenyl degradation and 3-chlorobenzoic acid, the intermediate of 3-chlorobiphenyl, was toxic for this bacteria. Due to the lack of motility of the model strain *B. xenovorans* LB400 the chemotaxis assay could not be performed in this microorganism. PCB degrading bacteria should have the ability to sense and swim to preformed gradients of these compounds generating a more efficient bioremediation process.

We studied the presence of emulsifying activities in the supernatant of our two bacteria. First, we observed the presence of an amorphous material surrounding the cells, independent of the carbon source used to grown both bacteria. This material was abundant in exponential phase and diminished at the stationary phase. By chromatographic analysis, we determined that this material could be exopolymeric substances constituted mainly by mannose, glucose and galactose in *Pseudomonas* sp. B4 and two types of EPS in *B. xenovorans* LB400 composed mainly by glucose and galactose molecules. We demonstrated that the crude fraction of these supernatants have a weak emulsifying activity against a mix of two hydrophobic molecules.

We initiate the analysis of the extracellular proteins of *B. xenovorans* LB400 in order to characterize the extracellular components which could be involved in the interaction with hydrophobic compounds such as biphenyl or PCB in the supernatant of these bacteria. First, by *in silico* analysis, we found that this bacteria and some members of the genera secretes between a 13-19 % of their proteomes. *B. xenovorans* LB400 secreted 1.195 proteins which are possibly located to inner membrane, periplasmic space, external membrane and extracellular space. One of this proteins had 26,7 % of identity with AlnA from *Acinetobacter radioresistens* K53, the most studied example of extracellular proteins with emulsifying activity toward hydrophobic compounds. However, two of four regions

which were necessary for emulsification were missing in the *B. xenovorans* LB400 orthologue.

Using a 2D-PAGE approach we characterized the differential protein expression pattern of extracellular proteins in *B. xenovorans* LB400. We found that in the twelve most abundant proteins, eight were found in our secreted list of proteins, suggesting truly secreted fractions. Seven of twelve proteins were found in high levels at the culture supernatants fractions from biphenyl growing cells. One of these proteins, which was also found in the benzoic acid culture supernatants, belongs to the YceI superfamily of proteins. This group of proteins have a similar structure to the lipocalin family which store and transport hydrophobic molecules. This protein has 21 kDa of molecular mass and an isoelectric point of 7,3. Besides, it showed a signal peptide of sec type which teorically has 22 aminoacid residues, giving a mature protein of 18,8 kDa with an isoelectric point of 6,3. We used the aminoacidic sequence of this protein to create a 3D model using crystallographic data derived of some members of this superfamily. This protein has a barrel shape composed of eight β -antiparallel secondary structure that suggest that this protein could bind molecules of hydrophobic nature as predicted by the lateral non-polar residues present inside the barrel. We suggest that this protein could be involved in the transport or storage of molecules such as PCBs from the contamination site to the bacterial surface. So far, this is an unknown phenomenon that could play a key role in the PCB metabolism and that will be of a great concern for future studies.

1. INTRODUCCION

1.1. La contaminación ambiental. La situación de los PCBs en Chile.

La liberación de contaminantes al medio ambiente es una de las principales causas de daño al ecosistema, en especial a la salud humana. La mayoría de estos compuestos fueron introducidos gradualmente por incrementos de la actividad humana. Al grupo de compuestos originados exclusivamente por el hombre se les conoce con el nombre genérico de agentes xenobióticos.

Los policlorobifenilos (PCBs) son una clase de agentes xenobióticos que han sido catalogados como uno de los principales contaminantes orgánicos persistentes en el medio ambiente (COPs). Esto debido a que presentan gran estabilidad a la degradación química y biológica. Esta propiedad facilitó entre el período 1930-1980 sus aplicaciones en equipamiento industrial, como por ejemplo en transformadores eléctricos, equipamiento hidráulico, productos plásticos, cauchos y pigmentos, entre otras aplicaciones. Debido a su naturaleza liposoluble, estos compuestos se acumulan en los tejidos adiposos de los organismos vivos causando un gran número de efectos adversos en el sistema endocrino, inmune, reproductivo y nervioso (Pieper y Reineke, 2000; Pieper, 2005).

Los PCBs son compuestos que son producidos por cloración directa de la molécula de bifenilo, generando de esta forma 209 diferentes "congéneres", los que contienen entre 1 y 10 átomos de cloro. La molécula de bifenilo, a su vez, está compuesta por dos anillos bencénicos fusionados por un enlace covalente y está presente de manera natural en el alquitrán mineral, en el crudo y en el gas natural. Esta molécula se usa como fungicida previniendo el crecimiento de hongos en frutos cítricos durante la etapa de transporte y almacenaje.

En la naturaleza los PCBs se encuentran formando complejas mezclas de distintos tipos de congéneres, como el "Aroclor", un tipo de mezcla comercial de aproximadamente 20 tipos distintos de congéneres (Pieper, 2005).

Ante la evidencia de la toxicidad y de la persistencia en el ambiente de los PCBs, los países industrializados prohibieron la producción y restringieron el uso de este tipo de molécula (Firma del Convenio de Estocolmo). En nuestro país, recién en el año 1982 el Gobierno de Chile dictó una resolución para restringir el uso de los PCBs en transformadores y en condensadores (Resolución N° 610 de la Superintendencia de Electricidad y Combustibles). Asimismo, esta resolución permite continuar el uso de los equipos que contengan estos compuestos hasta que se encuentren operativos y sea necesario su vaciamiento, después de lo cual solamente podrán ser llenados con otros aceites libres de PCBs. Sin embargo, aún existen focos de contaminación que no han sido sometidos a una fiscalización y que no están exentos de liberar estos contaminantes al medio ambiente por mal manejo de los equipos, derrames accidentales, etc. (PNUMA, 1999).

1.2. La biorremediación como estrategia para eliminar los PCBs.

De las múltiples estrategias que se han utilizado para aliviar el daño producido por los COPs, la biorremediación, vale decir, la utilización de microorganismos para su degradación hasta moléculas más sencillas e inocuas, es sin duda la más atractiva en términos de costos y beneficios (Ohtsubo y col., 2004). Durante el transcurso de estas dos últimas décadas, el estudio de la biorremediación, se ha enfocado principalmente al aislamiento de estos microorganismos desde suelos, sedimentos y aguas contaminadas y en la caracterización tanto a nivel genético como enzimático de sus sistemas degradativos (Philp y col., 2005).

Durante el estudio de la biorremediación de PCBs, se han aislado y caracterizado varios microorganismos capaces de cometabolizar estas moléculas, vale decir, las transforman en moléculas más simples. Este proceso se realiza en condiciones aeróbicas y en presencia de bifenilo como molécula inductora de la vía degradativa. Ejemplos de estos corresponden a bacterias Gram-negativas (*Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Arthrobacter* entre otras) y Gram-positivas (*Rhodococcus*) (Beyersdorf-Radeck, B. y col., 1998). De los primeros, los más estudiados son los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderiae* y de ellos, se han caracterizado en detalle las vías metabólicas responsables de la transformación de estos compuestos (Figura 1).

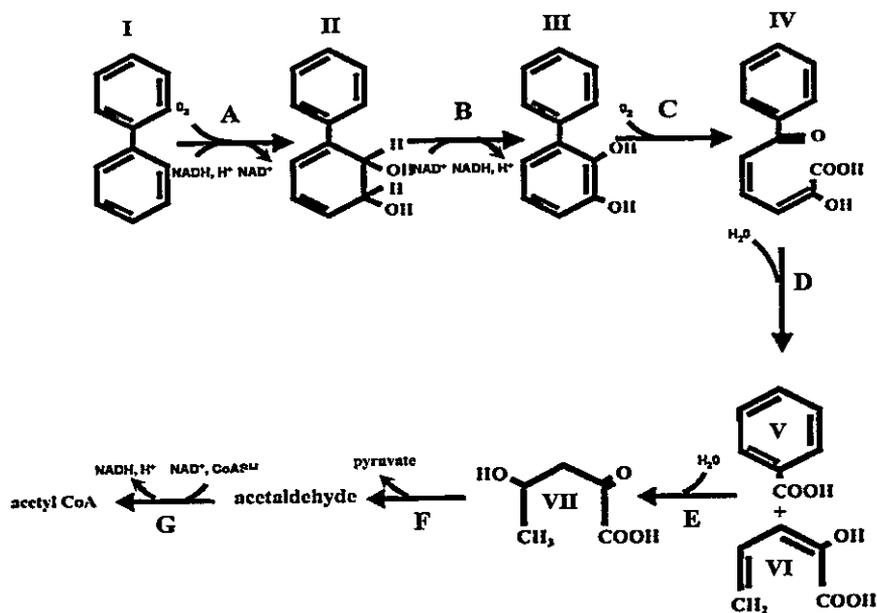


Figura 1. Vía metabólica propuesta para la degradación de bifenilo y de la cometabolización de los PCBs en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 y *B. xenovorans* LB400. Compuestos: I, bifenilo; II, 2,3-dihidroxi-4-fenilhexa-4,6-dieno; III, 2,3-dihidroxi-bifenilo; IV, ácido 4-hidroxi-6-oxo-fenilhexa-2,4-dienoico (HOPDA); V, ácido benzoico; VI, ácido 2-hidroxi-penta-2,4-dienoico; VII, ácido 4-hidroxi-2-oxovalérico. Las reacciones enzimáticas catalizadas por las proteínas codificadas en el locus *bph* de *B. xenovorans* LB400 y *P. pseudoalcaligenes* KF707 son las siguientes: A: subunidad mayor de la bifenilo 2,3-dioxigenasa (BphA2), ferredoxina (BphA3) y ferredoxina reductasa (BphA4); B, bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa (BphB); C, 2,3-dihidroxi-bifenilo-1,2-dioxigenasa (BphC); D, 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (BphD); E, 2-hidroxi-penta-2,4-dienoato hidratasa (BphH o BphX1); F, 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa (BphI o BphX2); G, acetaldéhidó deshidrogenada (BphJ o BphX3) (Adaptado de Furukawa y col., 2004).

Los genes que codifican para las enzimas encargadas del metabolismo de los PCBs se organizan en un segmento génico conocido como locus *bph*. A partir del conocimiento de estas vías, se ha logrado estudiar en profundidad algunas enzimas que catalizan los pasos que son limitantes en la vía degradativa, llegando incluso a modificar sus especificidades de sustrato (Furukawa y col., 2004).

1.3. Biodisponibilidad de los PCBs.

Se supone que las enzimas que metabolizan los PCBs presentan localización citoplasmática y requieren de moléculas de agua para sus actividades enzimáticas (Denef y col., 2005). Sin embargo, la molécula de bifenilo y sus derivados clorados presentan bajas solubilidades en este solvente. Debido a su naturaleza liposoluble, estos compuestos se encontrarían firmemente adheridos al suelo formando parte de una fase líquida no acuosa, por lo que la biodisponibilidad de estos compuestos se vería reducida y en consecuencia, su degradación prácticamente limitada. Este fenómeno se ha sugerido para el caso de la molécula de naftaleno, cuya estructura es similar a la de la molécula de bifenilo aunque presenta mayor solubilidad en agua que este última (Marx y Aitken, 2000; Law y Aitken, 2003).

Dos estrategias que utilizaría la bacteria para vencer esta limitación serían su acercamiento a la fase líquida no acuosa mediante los fenómenos de movilidad y quimiotaxis y la excreción y/o secreción de moléculas con propiedades biosurfactantes (Stelmack y col., 1999; Pieper y Reineke, 2000; Parales y Harwood, 2002).

1.4. Quimiotaxis y su papel en la biorremediación.

La quimiotaxis bacteriana se define como el movimiento de las bacterias generado por una gradiente de concentración de un compuesto químico que les permite

moverse rápidamente hacia micro-ambientes óptimos para su crecimiento. El compuesto que es percibido por la bacteria puede ser un atrayente (quimiotaxis positiva) o un repelente (quimiotaxis negativa). Este fenómeno se ha estudiado extensivamente tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella enterica* serovar *thyphimurium* y sus determinantes moleculares han sido identificados. Estas bacterias perciben azúcares, aminoácidos y otras moléculas del medio utilizando receptores de membrana interna llamados proteínasceptoras de grupos metilo (MCPs del inglés methyl-accepting chemotaxis proteins). En forma resumida, cuando las moléculas son transportadas al periplasma y se unen a estos receptores, se gatilla un cambio conformacional, que provoca la inhibición de la autofosforilación de la proteína con actividad quinasa CheA lo que a su vez provoca una reducción en la concentración de la proteína CheY en su forma fosforilada y en consecuencia, su interacción con la proteína FliM del motor flagelar. Esta interacción es clave para cambiar la rotación del motor. Esto resulta en que la bacteria nade en la dirección donde se concentra el atrayente por más tiempo y deje de moverse en forma azarosa (Stock y Surette, 1996) (Figura 2).

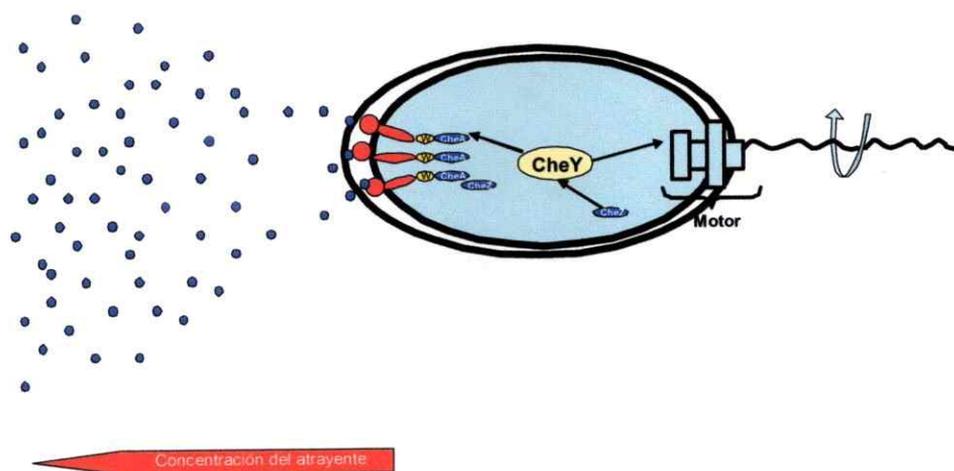


Figura 2. Esquema simplificado del fenómeno de quimiotaxis en bacterias Gram-negativas. El compuesto que es percibido (círculos azules) se une a un receptor de membrana interna (rojo) y desencadena una cadena de fosforilaciones que culminan con el giro del flagelo en el sentido contrario de las agujas del reloj. La concentración de la proteína CheY en su estado fosforilado o desfosforilado dictará la orientación que finalmente ejecutará el sistema flagelar.

Se ha estudiado en detalle el tipo de compuesto por el cual son atraídas las bacterias que son capaces de degradar compuestos xenobióticos. Si bien muchas de estas moléculas son percibidas por estas bacterias, ello no significa que éstas puedan ser utilizadas como fuentes de carbono. Por otra parte, se ha determinado que el fenómeno de la quimiotaxis hacia estos compuestos puede ser inducido cuando la bacteria se crece en una fuente de carbono con una estructura similar al compuesto percibido o en presencia de algún metabolito intermediario resultante de su biodegradación. Al momento de iniciar esta Tesis, se habían identificado tres genes que codifican para quimiorreceptores de compuestos xenobióticos y para moléculas derivadas de la biodegradación de polímeros constituyentes de la pared celular de plantas en las bacterias *Pseudomonas putida* G7, *Pseudomonas putida* PRS2000 y *Cupriavidus necator* JMP134. Estos genes se localizan dentro de grupos o "clusters" de genes involucrados en la biodegradación de estos compuestos y se ha demostrado que se expresan de manera coordinada, lo que explicaría el fenómeno de inducción de quimiotaxis para estos casos (Tabla I) (Pandey y Jain, 2002; Parales y Harwood, 2002). Al inicio de esta tesis, no se había comunicado la existencia de quimiotaxis (positiva o negativa) de las bacterias que degradan PCBs hacia estos compuestos. Dada su persistencia en el ambiente, es de gran importancia conocer si los microorganismos que degradan estos compuestos son atraídos o repelidos por estos compuestos, lo que resultaría finalmente en su mayor eficiencia en su capacidad para descontaminar.

Tabla I.

Compuestos atrayentes para algunas de las bacterias que degradan agentes contaminantes (adaptado de Parales y Harwood, 2002).

Microorganismo	Atrayentes detectados	Receptor	Ubicación del receptor
<i>P. putida</i> G7	Salicilato* (I) Naftaleno * (I) Bifenilo (I)	NahY	Plásmido NAH7
<i>P. putida</i> PRS2000	4-hidroxibenzoato * (I)	PcaK	Cluster <i>pca</i> (genes de la vía β - ceto adipato)
<i>Cupriavidus necator</i> JMP134 (pJP4)	Acido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) * (I)	TfdK	Cluster <i>tfd</i> (degradación de 2,4 D) en el plásmido pJP4

* Compuesto metabolizable. (I) Respuesta quimiotáctica inducida.

1.5. Los biosurfactantes y su participación en la biorremediación.

La baja solubilidad que presentan la mayoría de los PCBs en solución acuosa impone a los microorganismos una limitante al momento de biodegradarlos. Para aumentar la superficie de contacto entre la bacteria y el compuesto hidrofóbico a degradar y así favorecer su biodisponibilidad, las bacterias se han especializado en la producción de compuestos llamados biosurfactantes. Estos compuestos de naturaleza anfipática pueden dividirse en dos grupos: moléculas de bajo peso molecular, que causan una disminución en la tensión interfacial y superficial entre dos fases inmiscibles o, biosurfactantes de alto peso molecular, que son capaces de estabilizar las emulsiones o unirse fuertemente a superficies (Tabla II) (Desai y Banat, 1997; Ron y Rosenberg, 2001 y 2002; Mulligan, 2005).

Tabla II.

Algunos ejemplos de biosurfactantes de alto y bajo peso molecular encontrados en bacterias Gram- negativas y Gram-positivas (adaptado de Rosenberg y Ron, 1999).

Biosurfactantes de bajo peso molecular	Microorganismo
Lípidos de Trehalosa	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i>
Ramrólpidos	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia rubidea</i>
Lípidos de soforosa	<i>Candida apicola</i> , <i>C. bombicola</i> , <i>C. lipolytica</i>
Glicólpidos	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>R. erythropolis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Tsukamurella sp</i>
Lipopolisacáridos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>C. lipolytica</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>
Biosurfactantes de alto peso molecular	Microorganismo
Emulsano 378	<i>P. fluorescens</i>
Polisacárido sulfatado	<i>H. eurihalinia</i>
Biodispersano	<i>A. calcoaceticus</i> A2
Manano-lípido-proteína	<i>C. tropicales</i>
Liposano	<i>C. lipolytica</i>
Acetilheteropolisacárido	<i>S. paucimobilis</i>
Emulsano RAG-1 y BD4	<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1, <i>A. calcoaceticus</i> BD4
Alasan	<i>A. radioresistens</i> KA53

1.5.1. Los biosurfactantes de bajo peso molecular y la degradación de los PCBs.

Para el caso de los PCBs, se ha demostrado que la adición de ramrólpidos (uno de los glicólpidos más estudiados) aumentó la degradación de PCBs por las bacterias *Alcaligenes eutrophus* y *Burkholderia cepacia* (Robinson y col., 1996). Sin embargo, cuando se utilizan algunos biosurfactantes como lipopéptidos, ésteres de maltotriosas o surfactantes sintéticos, los resultados sobre la degradación de PCBs han sido contradictorios (Golyshin y col., 1999; Ferrer y col., 2003).

1.5.2. Función de los biosurfactantes de alto peso molecular.

El biosurfactante alasan es sintetizado por *A. radioresistens* KA53 y está constituido por un heteropolisacárido aniónico y tres proteínas con un peso molecular aproximado total de 1×10^6 Da, donde el componente proteico está conformado por las proteínas AlnA, AlnB y AlnC de 45, 31 y 16 kDa, respectivamente (Navon-Venezia y col., 1995; Toren y col., 2001). La proteína de 45 kDa presenta un 27 % de identidad a nivel aminoacídico con OmpA de *E. coli* y es la más eficiente en estabilizar las emulsiones agua-hidrocarburo y en solubilizar hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs). Además, presenta la mayor actividad del biosurfactante alasan (Toren y col., 2002a y 2002b). Por otra parte, la proteína de 31 kDa presenta un 78 % de identidad con una peroxiredoxina de *P. putida* KT2440. Esta proteína presenta una baja actividad emulsificante, sin embargo ayuda a estabilizar la actividad emulsificante de la AlnA (Bekerman y col., 2005).

El emulsano de *A. venetianus* RAG-1 es un polímero complejo de un lipoheteropolisacárido y una esterasa los cuales no están covalentemente unidos. Este complejo presenta un peso molecular aproximado de $9,9 \times 10^5$ Da. El mayor componente del apoemulsano son D-galactosaminas, ácido D-galactosaminurónico y glucosamina diaminodidesóxido. Los ácidos grasos están covalentemente unidos al polisacárido a través de enlaces O-ester y N-acilo (Zuckerberg y col., 1979; Rosenberg y col., 1979a y b). Cuando se libera al medio de cultivo, el polisacárido capsular forma un complejo con la esterasa, el cual llega a ser un activo emulsificador. A diferencia del alasan, la esterasa del emulsano no es un emulsificador activo y sólo aumenta la actividad del componente polisacárido (Tabla III).

Tabla III.

Cuatro ejemplos de biosurfactantes de alto peso molecular (adaptado de Rosenberg y Ron, 1999).

Microorganismo	Composición del polisacárido	Proteína (s) asociada (s)	Tipo de actividad
<i>A. radioresistens</i> K53	Amino azúcares N-acilados, ácidos urónicos y una alanina covalentemente unida	AlnA (tipo OmpA), AlnB (peroxiredoxina), AlnC (N.D.)	Emulsificador de compuestos alifáticos de cadena larga y de policíclicos aromáticos y estabilizador
<i>A. venetianus</i> RAG-1	N-acetil-D-galactosamina, ácido N-acetilgalactosaminurónico y un N-acetilaminoazúcar	Esterasa asociada a la superficie celular	Emulsificador de mezclas de hidrocarburos alifáticos con aromáticos (o alcanos cíclicos) y estabilizador
<i>A. calcoaceticus</i> BD4	L-ramnosa, D-glucosa, ácido D-glucurónico y D-manosa	N.D.	Emulsificador de mezclas de hidrocarburos alifáticos y estabilizador
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> S-2	D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, ácido D-glucurónico, ácido hexadenoico y dodecanoico	N.D.	Emulsificador de mezclas aromáticas

N.D.: no determinada.

Por otra parte, el emulsano de *A. calcoaceticus* BD4 es un polisacárido de tipo capsular que se compone de unidades repetitivas de L-ramnosa, D-glucosa, ácido D-glucurónico y D-manosa en relaciones molares 4:1:1:1. Las fracciones extracelulares que contienen proteína, libre de polisacárido y el polisacárido por sí mismo no presentaron

actividad. Sin embargo ésta se puede reconstituir al mezclar las fracciones proteicas y polisacáridas por separado (Kaplan y col., 1987) (Tabla III).

La importancia del estudio de los exopolisacáridos se ejemplifica no sólo por los casos de emulsificación comunicados en bacterias del género *Acinetobacter*. En *R. rhodochrous* S-2, se produce un polisacárido extracelular denominado S-2 EPS, que contiene D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, ácido D-glucurónico, ácido hexadenoico y dodecanoico y que demostró ser importante en la tolerancia de la bacteria a una fracción que contenía compuestos aromáticos del petróleo crudo. Las colonias de *R. rhodochrous* se caracterizaron por presentar un fenotipo mucoide y son más resistentes a *n*-hexadecano, mientras que los derivados con fenotipo liso son sensibles a este compuesto (Iwabuchi y col., 2000). Cuando el polisacárido extracelular producido por la cepa mucoide se agregó a los cultivos de las cepas lisas, estas últimas adquirieron resistencia a *n*-hexadecano. Finalmente, la adición de este polímero al agua de mar contaminada con aceite provocó la emulsificación de éste, aumentando la degradación de hidrocarburos poliaromáticos (PAH) presentes en esta muestra (Iwabuchi y col., 2002) (Tabla III).

1.6. Función de las proteínas extracelulares y características generales de los translocos involucrados en secreción.

Las bacterias secretan al medio extracelular numerosas proteínas que son necesarias para adaptarse y sobrevivir en el medio ambiente. Estas proteínas presentan muchos roles como nutrición, adhesión a sustratos abióticos o bióticos, comunicación célula-célula, virulencia y emulsificantes, entre otros (Kostakioty y col., 2005; Pallen, y col., 2003).

La mayoría de las bacterias Gram-negativas utilizan dos vías principales para secretar sus proteínas desde el espacio citoplasmático al espacio periplásmico: las vías *sec*- dependientes y *tat*- dependientes. Las proteínas secretadas por la vía *sec* son translocadas por el complejo SecYEG unido a membrana interna y la proteína SecA, una ATPasa asociada que actúa como motor molecular. El mecanismo a través de la vía *tat* se ha descrito recientemente y está compuesto por un translocón constituido por las proteínas TatA, TatB, TatC, y la proteína TatE, las que muestran muy baja identidad con los componentes del translocón Sec. Las proteínas periplásmicas que son translocadas por estos dos sistemas son destinadas al medio extracelular preferentemente por el sistema de secreción del tipo II y V. Además, las bacterias Gram-negativas cuentan con otros aparatos especializados de secreción de proteínas directamente al medio externo sin pasar necesariamente por intermediarios periplásmicos, como los sistemas de secreción tipo I, III y IV (Kostakioti y col., 2005). Finalmente, hay un grupo de proteínas que son secretadas a pesar de no presentar en su secuencia aminoacídica una señal de secreción identificable. Estas se agrupan como proteínas secretadas bajo un sistema de secreción no clásico (Bendtsen y col., comunicación personal) (Figura 3).

Como se mencionó anteriormente, para el caso de proteínas que son componentes de los polímeros de las bacterias del género *Acinetobacter*, queda demostrada la importancia que presentan en el fenómeno de emulsificación de compuestos hidrofóbicos. Aún se desconoce si las bacterias degradadoras de policlorobifenilos producen proteínas con este tipo de actividades.

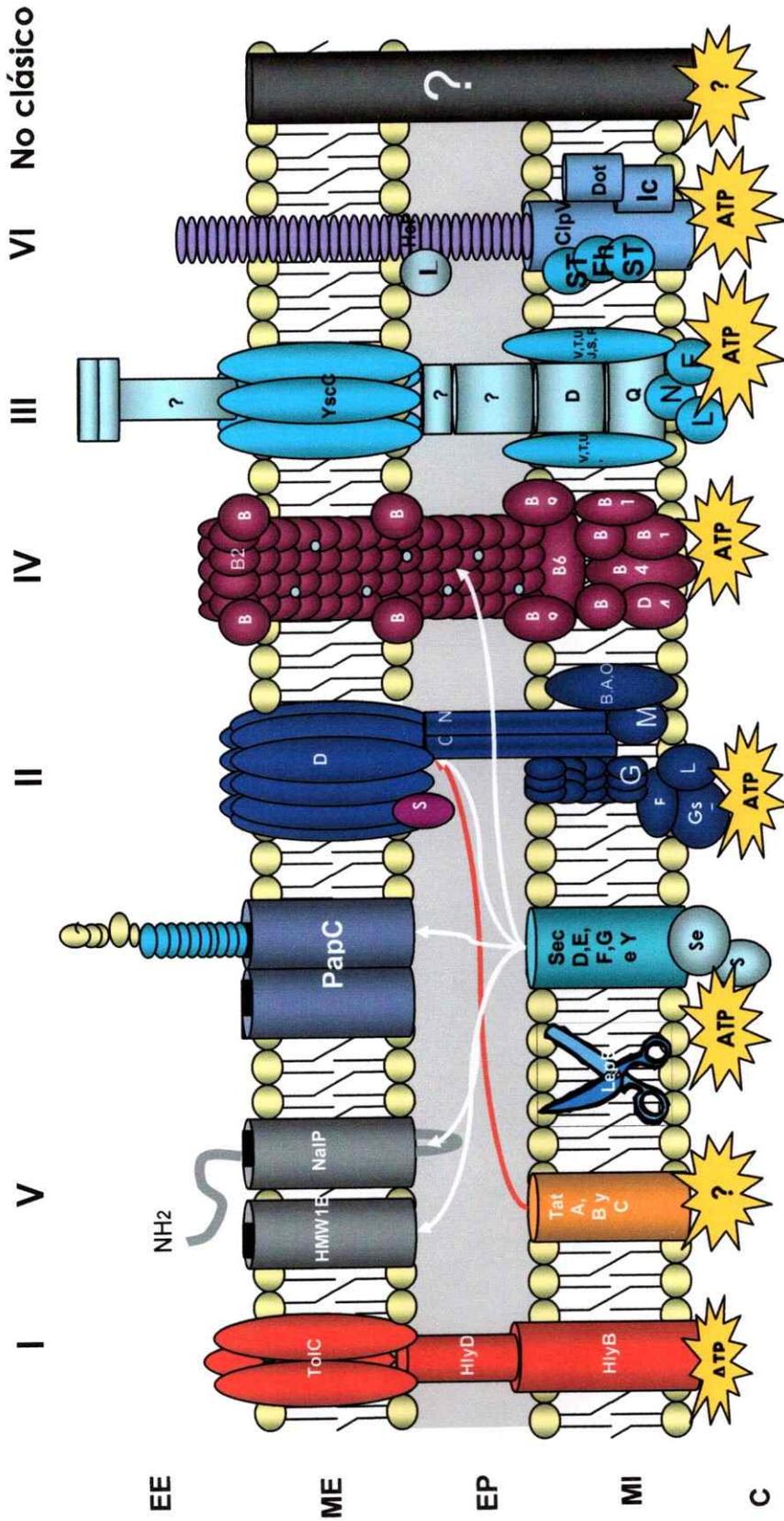


Figura 3. Esquema general de los seis sistemas de secreción (I-VI) en bacterias Gram-negativas. Abreviaturas: M.E., membrana externa; M.I., membrana interna; E.P. espacio periplásmico; C: citoplasma. La flecha roja indica la vía de secreción de proteínas desde el translocón Tat al espacio extracelular, mientras que las blancas indican las vías más usadas por el translocón SEC para secretar proteínas al espacio extracelular.

En base a estos antecedentes, proponemos que las bacterias degradadoras de PCBs podrían secretar algunas proteínas necesarias para la interacción de la bacteria con el compuesto a degradar. Esta interacción sería además grandemente facilitada por procesos de movilidad y quimiotaxis hacia estos tipos de compuestos. Ambos procesos son de gran relevancia para la biodegradación de estos compuestos contaminantes.

HIPOTESIS

Los microorganismos degradadores de PCBs *Pseudomonas* sp. B4 y *Burkholderia xenovorans* LB400 son atraídos por quimiotaxis hacia los policlorobifenilos y producen proteínas extracelulares que podrían ser necesarias para interactuar con estos contaminantes ambientales.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es estudiar la quimiotaxis y analizar la presencia de proteínas extracelulares con actividad emulsificante y la identificación de algunas de ellas en bacterias degradadoras de PCBs.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar la movilidad de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400 mediante microscopía y ensayos de movilidad.
2. Cuantificar la quimiotaxis de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400 tanto hacia bifenilo como a distintos clorobifenilos e intermediarios de la degradación de los PCBs.
3. Determinar las propiedades emulsificantes de preparaciones crudas de las proteínas extracelulares de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400.

4. Analizar *in silico* las posibles proteínas secretadas por *B. xenovorans* LB400.
5. Caracterizar las proteínas extracelulares y su expresión diferencial en *B. xenovorans* LB400 crecida en medio definido y utilizando bifenilo, ácido benzoico (un intermediario de la degradación de bifenilo) o glucosa como únicas fuentes de carbono y energía.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Materiales.

2.1.1. Cepas bacterianas.

B. xenovorans LB400 es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la clase de las β -proteobacterias que hasta la fecha, es considerada como el mejor degradador en condiciones aeróbicas de los PCBs. Esta bacteria se aisló desde el río Hudson, ubicado en el estado de New York por un grupo de investigación de la empresa General Electric (Bopp y col., 1986).

Pseudomonas sp. B4 es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la clase de las γ -proteobacterias, aislada del Río Elba en Alemania. A diferencia de *B. xenovorans* LB400, las capacidades metabólicas de esta bacteria hacia distintos congéneres de PCBs aún no se han comunicado, pero sí es capaz de crecer en bifenilo y algunos PCBs como única fuente de carbono y energía (Chávez y col., 2006).

2.1.2. Reactivos.

- AccuStandard (New Haven, EUA): 2-clorobifenilo, 3-clorobifenilo, 4-clorobifenilo y 2,3 policlorobifenilo.
- Biorad (California, EUA): tiras de punto isoelectrico immobilizado (no lineal 3-10), anfolitos Bio-Lyte®, acrilamida y bisacrilamida.
- Difco (NJ, EUA): triptona, agar y peptona.
- Merck (Hohenbrunn, Germany): bifenilo, isooctano, n-hexano, tetróxido de osmio, acetato de uranilo, trisaminometano, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, glicerol, metanol, nitrato de plata, $MgSO_4$, Iodoacetamida y CHAPS.
- Pierce (Illinois, EUA): cassettes de diálisis, sistema comercial para la identificación de proteínas (Coomassie Plus Protein Assay Reagent).

- Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA): DNAsa, RNAsa, ácido benzoico, ácidos 2, 3 y 4 , clorobenzoicos, β -mercaptoetanol, ácido tricloroacético, glutaraldehído, PMSF, rojo de pirogalol, molibdato de sodio y oxalato de sodio, ácido succínico, urea, tiourea, DTT, SDS, azul de coomassie R y G250, ácido cítrico y 4-cloro-1-naftol.

2.2. Métodos.

2.2.1. Condiciones de cultivo.

B. xenovorans LB400 y *Pseudomonas* sp. B4 se crecieron rutinariamente a 30 °C en medio Luria-Bertani. Para los estudios de quimiotaxis, expresión diferencial de proteínas, caracterización de EPS y búsqueda de actividad biosurfactante, se utilizó el medio mínimo M9 suplementado con glucosa (1 %), bifenilo (0,1 %) o ácido benzoico al (0,1 %) como únicas fuentes de carbono y energía. Para evaluar el crecimiento en estas fuentes de carbono, se midió la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm (Chávez y col., 2004).

2.2.2. Microscopía electrónica de transmisión.

Para la preparación de muestras sin tinción, las células se recolectaron de cultivos en fase exponencial o fase estacionaria y se llevaron a una D.O. \sim 0,5 con medio mínimo 1X. Por otra parte, las células cosechadas en estos mismos estados de crecimiento se centrifugaron a 10.000 rpm por 5 min y se lavaron con amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,4, para finalmente ser centrifugadas y suspendidas en el mismo amortiguador. Se aplicaron 10 μ L sobre la grilla, se esperó 2 min para que los microorganismos se depositaran en la superficie del formvar con carbón, retirándose el exceso de ligando por succión por capilaridad mediante un trozo de papel filtro. Esta operación se repitió por cinco veces. Las células se observaron directamente al microscopio electrónico de transmisión (Phillips Tecnai 12).

2.2.3. Microscopía electrónica de barrido.

Las bacterias se colectaron del medio de cultivo por filtración en una membrana de nitrocelulosa Millipore GS y se fijaron en glutaraldehído (3 %) en amortiguador cacodilato 0,138 M pH 7,2 durante 4 h. Luego de un lavado con agua destilada se deshidrató la preparación en acetona de 50, 70, 95 y 100 % durante 5 min cada vez y se realizó secado de punto crítico con CO₂. Las muestras se sombrearon con oro en Varian Vacuum Evaporator y se observaron en un microscopio de barrido Jeol JSM25SII a 30 kV.

2.2.4. Ensayo de "swimming" o de motilidad en placa.

Los medios usados para el ensayo contenían medio mínimo M9 y dos fuentes de carbono (glucosa o casaminoácidos) a las concentraciones de 1 % y además agar al 0,1 %. Las placas se inocularon con las bacterias crecidas en medio LB por toda la noche. Para evitar la evaporación del solvente acuoso, las placas se sellaron con Saran Wrap y se incubaron a 30 °C por 12-14 h.

2.2.5. Ensayo modificado del capilar.

Se realizó el ensayo modificado del capilar descrito inicialmente por Mazumder y col. Las bacterias crecidas en las tres condiciones de cultivo se cosecharon por centrifugación (10.000 g x 5 min a 4 °C). Estas se lavaron con amortiguador de quimiotaxis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4) y se resuspendieron en el mismo amortiguador hasta una D.O.~ 0,5. Luego, se depositaron 100 µL en una punta de micropipeta la que se puso en contacto con una jeringa tipo tuberculina de 1 mL que contenía 200 µL de una solución del compuesto a estudiar a una concentración de 1 mM disuelto en amortiguador de quimiotaxis y en presencia de iso-octano al 0,2 %. El control del ensayo contenía sólo el amortiguador e iso-octano. Este solvente se utilizó para solubilizar bifenilo y clorobifenilos, los que en el amortiguador de quimiotaxis fueron prácticamente insolubles. Después de 90

min. de incubación a temperatura ambiente, se tomó 100 μ L del contenido de la jeringa y las células en suspensión, se diluyeron 5.000 veces en medio LB para ser sembradas en placas de LB-agar. Las placas se incubaron a 30 °C por toda la noche. La acumulación de bacterias dentro de la jeringa se calculó promediando el número de UFC obtenidas en cada placa proveniente de tres ensayos independientes. A partir de estas determinaciones se calculó el IQR definido como el número de bacterias que entraron a la jeringa en presencia del compuesto a ensayar como atrayente, respecto a las que entraron a la jeringa en presencia de sólo el amortiguador. Como referencia se utilizó un índice igual o mayor a 2 para demostrar quimiotaxis hacia el compuesto a estudiar según lo comunicado por otros investigadores (Mazumder y col., 1999; Harwood y col., 1994).

2.2.6. Ensayos de “swarming” o quimiotaxis en placa.

Para confirmar la quimiotaxis hacia los compuestos a estudiar, se utilizó el ensayo de “swarming” descrito por Harwood y col., (1994). Se utilizó placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían medio mínimo suplementado con el quimioatrayente a una concentración final de 1 mM y agar al 0,3 %. De igual forma se preparó una placa control la que contenía agar 0,3 % y el medio mínimo. Estas placas se dejaron secar a temperatura ambiente por dos horas antes de ser usadas. Las placas se inocularon con 10 μ L de un cultivo de *Pseudomonas* sp. B4 crecido hasta la fase estacionaria en un medio mínimo suplementado con glucosa al 1 %. Las placas se incubaron a 30 °C por un período de 72 h, tiempo en el cual se observó un anillo de crecimiento de las células móviles. Este ensayo requiere que la bacteria genere su propia gradiente de concentración al metabolizar los compuestos presentes en el medio. Las células son colocadas en el centro de la placa y la quimiotaxis se visualiza como un anillo de crecimiento que se expande hacia los bordes de la placa, debido al nado de las bacterias a través del agar siguiendo una gradiente de concentración del atrayente una vez que se ha metabolizado (Parales y Harwood, 2002) .

Para analizar los efectos tóxicos de algunos compuestos en *Pseudomonas* sp. B4 se utilizó una placa preparada para swarming con ácido benzoico 1 mM como quimioatrayente, la que contenía a una distancia de unos 5 cm del centro de inoculación, cuatro tapones o "plugs" de agar con los ácidos benzoico, 2-clorobenzoico, 3-clorobenzoico y 4-clorobenzoico, respectivamente, a una concentración de 100 mM. Las placas se inocularon con 10 μ L de un cultivo de *Pseudomonas* sp. B4 crecido hasta fase estacionaria en un medio mínimo suplementado con glucosa al 1 % y se incubaron a 30 °C por un período de 72 h.

2.2.7. Ensayos de viabilidad en presencia de 3-CBA.

La bacteria se creció previamente en medio mínimo con glucosa al 1 % como única fuente de carbono hasta la fase exponencial. Las células se lavaron con amortiguador de quimiotaxis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4) y se resuspendieron en el mismo amortiguador hasta una D.O. ~ 0.5 en presencia de distintas concentraciones de 3-CBA. Se tomaron muestras de estas preparaciones al tiempo cero y a 90 min, y luego de diluir 100.000 veces en medio LB, se sembraron en placas LB-agar y se incubaron toda la noche a 30 °C. Finalmente, se determinó el número de unidades formadoras de colonia para cada muestra.

2.2.8. Extracción de proteínas totales solubles desde *B. xenovorans* LB400.

Las células se cosecharon de tres cultivos crecidos en medio mínimo M9 suplementados con glucosa, bifenilo o ácido benzoico, y se centrifugaron a 5.500 x g por 15 min a 4 °C (Beckman Coulter Avanti J-26 XP). Las células se lavaron una vez con 50 mL de amortiguador PBS y se centrifugaron a la misma velocidad. Finalmente se suspendieron en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0 en presencia de PMSF 100 mM y RNAsa A 50 μ g/mL. Para romper las células, la muestra se sonicó con un programa de tres ciclos de 30 s de sonicado y 30 s de descanso utilizando ciclos de

congelamiento/descongelamiento entre cada ruptura. El material celular que no se lisó por sonicación se eliminó de esta fracción por centrifugación a 10.000 g x 5 min a 4 °C. Finalmente se adicionó a la muestra DNAsa a una concentración de 50 µg/mL y se dejó reposar en hielo por 10 min. Se extrajo una alícuota para cuantificar las proteínas por el método de Bradford.

2.2.9. Extracción de proteínas extracelulares desde *B. xenovorans* LB400.

2.2.9.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético.

Para la extracción de proteínas extracelulares, el sobrenadante de los cultivos centrifugados se filtró utilizando filtros de nitrocelulosa de 0,22 µm. A esta fracción se adicionó TCA al 10 % final y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Luego se centrifugó a 10.000 g x 2 h (Beckman Coulter Avanti J-26 XP), a 4 °C y el precipitado se lavó tres veces con una solución de etanol al 70 %. El precipitado se dejó secar a 37 °C y se almacenó a -80 °C (Sambrook y col., 1989).

2.2.9.2. Precipitación de proteínas con rojo de pirogalol.

El sobrenadante de cultivos centrifugados a 5.500 x g por 15 min a 4 °C se filtró utilizando filtros de 0,22 µm. Para la precipitación de las proteínas se adicionó un volumen igual de una solución de PRMM (rojo de pirogalol 0,05 mM, molibdato de sodio 0,16 mM, oxalato de sodio 1,0 mM, ácido succínico 50 mM, metanol 20 % (vol/vol) en H₂O, y ajustada la solución a pH 2,0 con HCl) al sobrenadante. Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a 2,8 y se dejó a temperatura ambiente por 1 a 2 h. Luego se incubó la solución a 4 °C por toda la noche. El precipitado se sedimentó por centrifugación a 10.000 x g por 1 h, y el sobrenadante se removió cuidadosamente. El precipitado se lavó repetidamente con acetona y se dejó remover por evaporación a temperatura ambiente. El precipitado se dejó secar a 37 °C y se almacenó a -80° C (Caldwell y Lattemann, 2004).

2.2.10. Separación de proteínas por 2D-PAGE.

Un equivalente a 100 µg of proteínas de los extractos solubles o de proteína extracelular se solubilizaron en 250 µL de amortiguador de rehidratación para isoelectroenfoque (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2 %, DTT al 2 %, anfolitos Bio-Lyte® de rango de punto isoelectrico de 3-10 al 0,27 % y anfolitos de rango de punto isoelectrico de 5-7 al 0,15 %). Las muestras se rehidrataron de forma pasiva por toda la noche en tiras de 17 cm de largo, fabricadas con una gradiente no lineal preformada de anfolitos con un rango de pH de 3 a 10. Las condiciones para el enfoque fueron las siguientes: 250 V por 15 min con una pendiente lenta, 2.000 V por 2 h con una pendiente lenta, 8.000 V por 4 h con una pendiente lineal, 10.000 V por 11 h con una pendiente lineal y finalmente a 50 V por 4 h con una pendiente rápida. Al finalizar la corrida, las tiras se incubaron en la solución de equilibrio I (urea 6 M, tris-HCl 0,024 M pH 8,8, glicerol 30 %, SDS al 2 % y DTT al 2,4 %) y luego en la solución de equilibrio II (urea 6 M, tris-HCl 0,024 M pH 8,8, glicerol al 30 %, SDS al 2 % y yodoacetamida al 2,5 %) por 15 min cada vez. Las tiras se dejaron en amortiguador de corrida y se transfirieron a geles de acrilamida al 12,5% de 20 cm × 20 cm para la segunda dimensión. El gel se selló con una solución de compuesta por agarosa al 1 % y azul de bromofenol al 0,1 %. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 50 V a temperatura ambiente. Posteriormente, las proteínas separadas se visualizaron con nitrato de plata según un protocolo adaptado de Shevchenko y col. (1996) para un análisis comparativo. De igual forma, se utilizó la tinción con azul de Coomassie CBB G-250 para la extracción de proteínas de los geles bidimensionales para su posterior secuenciación por espectrometría de masas.

2.2.11. Análisis y secuenciación de proteínas.

Las intensidades de las manchas de las proteínas de interés en los geles bidimensionales se cuantificaron con el programa Quantity One (Biorad, USA). Las

manchas se aislaron usando un bisturí y cada pedazo de gel se depositó en un tubo eppendorf. La muestra se digirió con tripsina según un protocolo del operador. Las soluciones con los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas con un equipamiento de ionización por electrospray y un analizador de tiempo de vuelo (ESI-QUAD-TOF). Las muestras se procesaron en el Centro de Proteómica de la Universidad de Cambridge (Reino Unido). Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com/index.html>) utilizando el genoma de *B. xenovorans* LB400 obtenido desde el Joint Genome Institute.

2.2.12. Preparación de sobrenadantes de cultivo de *Pseudomonas* sp B4 y de *B. xenovorans* LB400 para análisis de posible EPS.

Las bacterias se crecieron hasta fase exponencial y estacionaria. De cada fase se extrajo el sobrenadante de cultivo el que se filtró utilizando filtros de 0,22 μm y luego se dializó 48 h contra agua milli Q usando membranas de corte 3.500 MWCO. Posteriormente, el sobrenadante se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó a una temperatura de -60 °C y a una presión de 0,036 mbar. Este material se almacenó a -20 °C para posteriores análisis.

2.2.13. Separación cromatográfica del material liofilizado por columnas de filtración molecular.

Las muestras liofilizadas (50-100 mg) se disolvieron en un mínimo volumen de amortiguador piridina/acetato (3:1), se centrifugaron a una baja velocidad y la fracción soluble se cargó en una columna de filtración molecular Sephadex G50 cuya fase móvil era el mismo amortiguador. El posible material polisacárido se eluyó de la columna utilizando un flujo de 6,3 mL/h. Este material se recolectó en fracciones previa detección del eluido por refractometría. Las fracciones que contenían mayor índice refractométrico respecto a

un control (amortiguador acetato/piridina) se recolectaron y concentraron en un rotaevaporador. El material se secó, resuspendió en agua nanopura y se volvió a concentrar. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, la muestra se resuspendió en agua nanopura, liofilizó y almacenó para su posterior uso.

2.2.14. Determinación de azúcares neutros.

Se preparó una solución stock de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del probable EPS separado en la columna de filtración molecular Sephadex G50. De esta se usó 500 μg que se colocaron en un vial de 10 mL. Se agregó 1 mL de HCl 0,1 M y se dejó hidrolizando por 48 h a 100 °C. Luego se agregó 30 μg de xilosa, que se utilizó como estándar interno. Las muestras se concentraron 40 °C. Posteriormente se agregó 1 mL de una mezcla de 10% eter en hexano para remover los ácidos grasos y se agitó la muestra suavemente por cinco seg. Luego esta fase se descartó y los vapores del solvente se volatilizaron con N_2 . Para la reducción del grupo carbonilo del azúcar se agregó 500 μL de agua MQ, se chequeó que el pH de la muestra fuese 8 y luego se agregó 2 mg de NaBH_4 (en tres pasos). Las muestras se incubaron toda la noche en la oscuridad junto con una aguja para dejar escapar el CO_2 y posteriormente para detener la reacción se agregó unas gotas de HCl. Se lavaron tres veces con un 1 mL de una mezcla HAc/MeOH y luego tres veces con 1 mL de MeOH. Finalmente se agregó a cada vial, 100 μL de piridina y 50 μL de dietileter. Se dejó esta mezcla por 30 min a 85 °C y finalmente se volatilizó la mezcla con N_2 . Se agregó 1 mL de CHCl_3 y se volatilizó con N_2 . Luego se agregó 100 μL de CHCl_3 y se utilizaron 10 μL para ser inyectados en el cromatógrafo de gases.

2.2.15. Estudio de las propiedades emulsificantes de los sobrenadantes de cultivo.

Se utilizó un protocolo modificado en el cual se mezcló en un tubo de vidrio de 1,5 mL, 1 mL de un amortiguador tris-HCl 20 mM, MgSO₄ 10 mM pH 7,0 y 50 µL de hexano en el cual fueron previamente disueltos los cristales de bifenilo (concentración final 1 mM). Posteriormente se agregaron 100 µL que contenían distintas concentraciones de las muestras a ensayar. Estas mezclas se agitaron vigorosamente en un vortex por 10 seg y posteriormente se les midió la turbidez generada por la emulsión a 600 nm en un espectrofotómetro (Toren y col., 2001),

2.2.16. Análisis bioinformáticos.

Para el análisis *in silico* de las posibles proteínas secretadas de *B. xenovorans* LB400 y el análisis comparativo con otros microorganismos del género *Burkholderiae* (*B. mallei* ATCC23344, *B. pseudomallei* K96243, *B. cepacia* J2315) se trabajó con los proteomas *in silico* de estos microorganismos, los que se obtuvieron desde la base de datos del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBS) de la Universidad Tecnológica de Dinamarca. En esta Tesis, se entiende por proteínas secretadas a las que son secretadas por los dos translocos de membrana interna y el sistema de secreción no canónico y que son destinadas al espacio periplásmico, membrana interna, externa y/o al espacio extracelular. Con los proteomas disponibles en la base de datos del CBS, se analizó los marcos de lectura abiertos que contenían posibles secuencias con péptidos señal utilizando el servidor SubCell v1.0. Este programa contiene a su vez subprogramas que identifican los péptidos señal que son procesados por la vía de secreción sec (SignalP v3.0 y LipoP v1.0), el sistema de secreción de tipo tat (TatP v1.0) y el sistema de secreción no canónico (SecretomeP v1.0) (Figura 3). El programa SubCell, contiene además, un subprograma que identifica en el proteoma proteínas con putativas hélices de transmembrana, las que son categorizadas de forma separada (TMHMM). Los marcos de lectura que no se encasillaron en las distintas

categorías (secretadas o de transmembrana) son clasificadas automáticamente como proteínas citoplásmicas (Bendtsen y col., comunicación personal). Para la comprobación de la secreción de algunas proteínas detectadas por SubCell, se utilizó el servidor Cello (www.cello.life.nctu.edu.tw).

Para la búsqueda de genes ortólogos en los genomas de *B. xenovorans* LB400 u otros microorganismos se utilizó la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (Psi-BLAST). Esta herramienta busca y encuentra regiones de similitud local entre las secuencias aminoacídicas. El programa compara secuencias aminoacídicas con las secuencias de las bases de datos y calcula la significancia estadística de los ensambles (Altschul y col., 1990). Las secuencias extraídas de las bases de datos se analizaron con el programa DNASTar (Lasergene) para el cálculo de punto isoeléctrico, masa molecular y otras características. Para el alineamiento de las secuencias conocidas se utilizó el servidor ClustalW2 (www.ebi.ac.uk).

El modelamiento de la proteína YceI de *B. xenovorans* LB400 se obtuvo utilizando el programa Accelrys DS Visualizer v2.0.1.7347, usando como modelo las estructuras cristalográficas de proteínas depositadas en la base de datos del Protein Data Bank (*Thermus thermophilus*. 1WUB y *Escherichia coli*. 1YOG).

3. RESULTADOS.

3.1. Caracterización de la movilidad de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400 por microscopía y ensayos de movilidad.

Observaciones preliminares utilizando microscopía óptica de *Pseudomonas* sp. B4 y de la *B. xenovorans* LB400, crecidas en medio LB hasta la fase exponencial mostraron que la primera es mucho más móvil que la cepa modelo. Para verificar este fenómeno, utilizamos ensayos de movilidad en placa o “swimming”. Este fenómeno toma lugar en la placa de Petri cuando la capa del fluido acuoso es suficientemente gruesa para permitir el nado al azar de la bacteria en presencia de una fuente de carbono metabolizable. Con este ensayo, observamos la formación de claros anillos en menos de 20 h de incubación a 30 °C sólo en *Pseudomonas* sp. B4 (Figura 4).

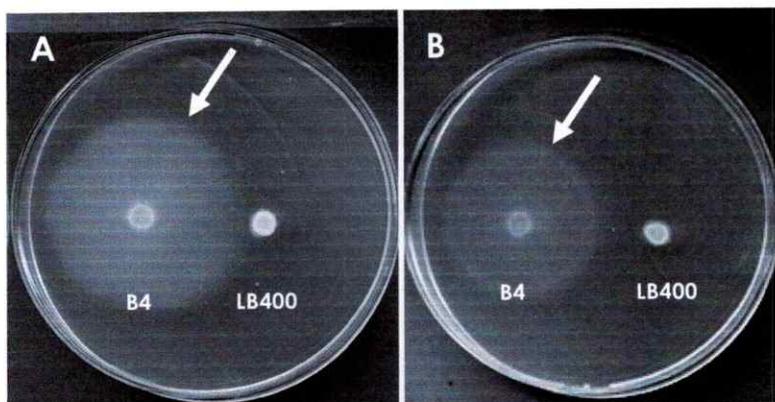


Figura 4. Movilidad de las bacterias degradadoras de PCBs. Las bacterias *Pseudomonas* sp. B4 (B4) y *B. xenovorans* LB400 (LB400) se crecieron hasta fase estacionaria en medio LB y se inocularon en placas de movilidad que contenían medio mínimo con glucosa al 1% como única fuente de carbono y energía (A) o medio mínimo con casaminoácidos como única fuente de carbono y energía (B). La flecha blanca indica los anillos generados por el movimiento de la bacteria en el medio.

A pesar que *B. xenovorans* LB400 ha sido descrita por otros investigadores como una cepa móvil (Goris y col., 2004), la carencia de movilidad en estos ensayos probablemente se deba a una falta de las estructuras flagelares. Para verificar esto, utilizamos microscopía electrónica para la cuantificación del número de bacterias con flagelo. Observamos que en promedio, ~80 % de las bacterias presentaron flagelos en

Pseudomonas sp. B4, mientras que en *B. xenovorans* LB400 sólo mostró un ~10 %. Ambas bacterias presentaron flagelos de tipo polar (Figura 5).

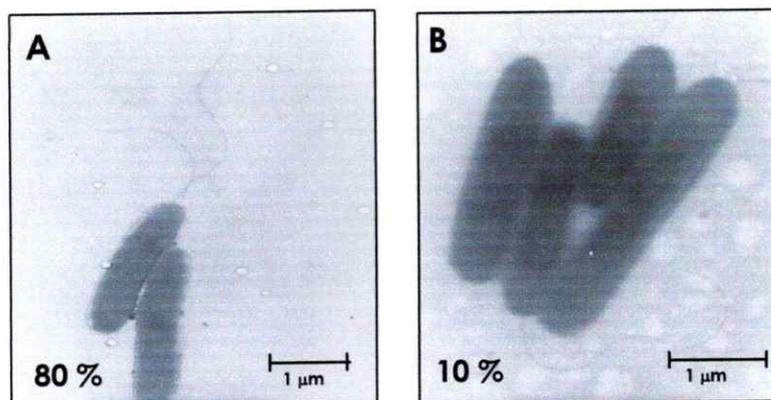


Figura 5. Presencia de estructuras flagelares en *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400. Ambas bacterias se crecieron hasta fase estacionaria en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y se depositaron directamente sobre una grilla de cobre. **A:** *Pseudomonas* sp. B4 observada con un aumento de 9.900 X. **B:** *B. xenovorans* LB400 observada con un aumento de 11.500 X.

Debido a que *B. xenovorans* LB400 careció de movilidad, los ensayos de quimiotaxis cualitativa y cuantitativa no se pudieron realizar con este microorganismo.

3.2. Cuantificación de la quimiotaxis de *Pseudomonas* sp. B4 tanto hacia bifenilo como a distintos clorobifenilos e intermediarios de la degradación de los PCBs.

3.2.1. Quimiotaxis hacia bifenilo y policlorobifenilos utilizando ensayos cualitativo y cuantitativos.

Las bacterias perciben y nadan hacia gradientes de concentración de un determinado compuesto y se acumulan cerca de la fuente de origen si es un atrayente. En el ensayo de “swarming”, se requiere la formación de un gradiente de concentración del compuesto presente en el agar a medida que es metabolizado por la bacteria. Las células se depositan en el centro de una placa de petri con un bajo porcentaje de agar (entre un 0,3-0,5 %). La quimiotaxis se visualiza por la formación de un anillo de crecimiento desde el punto de inoculación; donde en el borde de este

anillo se acumulan las células que nadan más rápido a través del agar siguiendo el gradiente del atrayente que se genera a medida que se va metabolizando (Parales y Harwood, 2002; Rashid, M. H. y Kornberg, A. 2000). Mediante este ensayo encontramos que la *Pseudomonas* sp. B4 fue atraída por bifenilo, 2-clorobifenilo, 3-clorobifenilo o 4-clorobifenilo cuando estos están presentes en la placa de petri como única fuente de carbono y energía (Figura 6). Estos resultados coinciden con la capacidad que tiene esta bacteria para crecer en estos compuestos (Chávez y col., 2004).

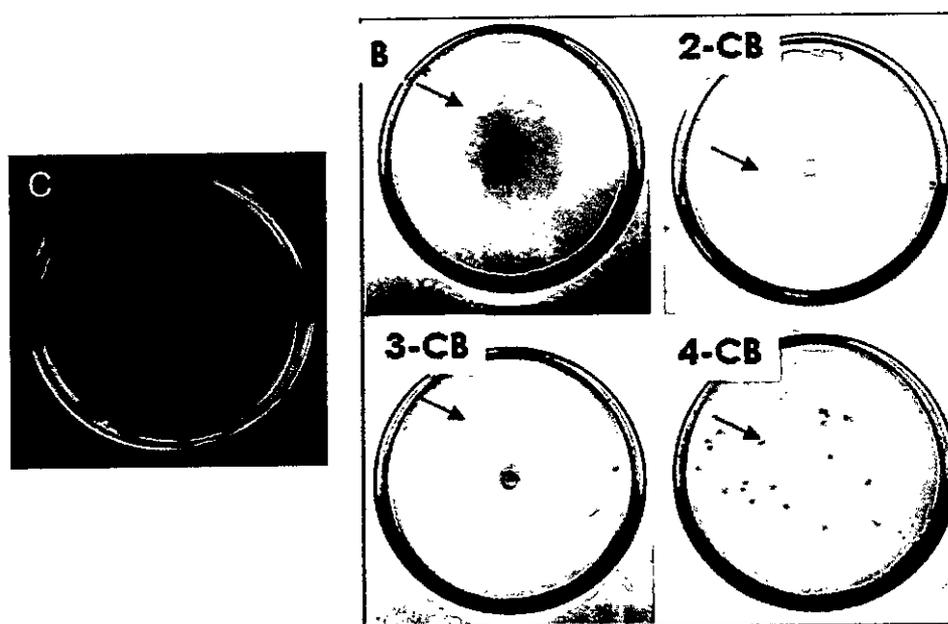


Figura 6. Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas* sp. B4 utilizando el ensayo de "swarming". 10 μ L de la cepa crecida en medio mínimo hasta fase estacionaria se depositaron sobre una placa de Petri que contiene agar por sobre 0,3 %, medio mínimo y un sustrato a una concentración 1 mM del compuesto que indicado. Con una flecha se muestra la ubicación del borde del anillo debido al crecimiento de las células. C corresponde a la placa control en presencia de isooctano 0,2 %.

Utilizando el ensayo modificado del capilar cuantificamos la quimiotaxis de *Pseudomonas* sp. B4 hacia bifenilo y distintos clorobifenilos (CBs). Al evaluar la concentración de bifenilo en la cual obteníamos el mayor número de células dentro del capilar encontramos que a una concentración nominal de 1 mM se producía la mayor

acumulación de células, por lo que escogimos esta concentración para realizar la comparación con los de derivados clorados (Figura 7).

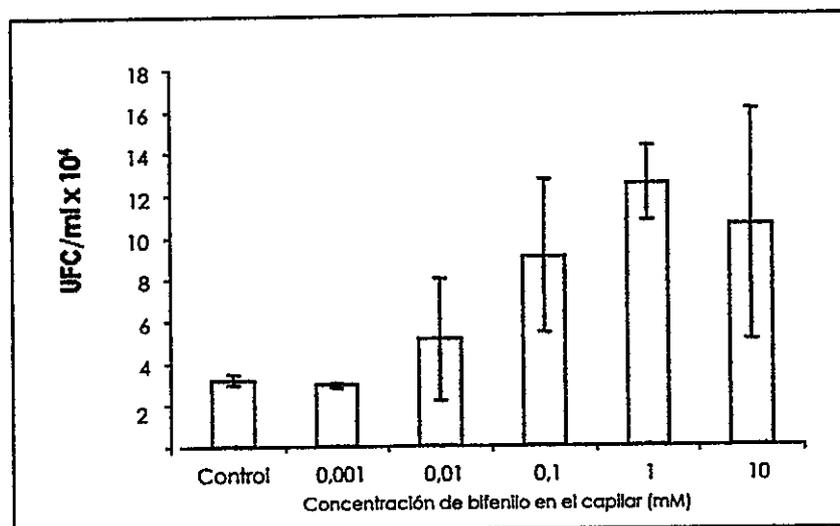


Figura 7. Quimiotaxis de *Pseudomonas* sp. B4 hacia distintas concentraciones de bifenilo. Las bacterias se crecieron hasta la fase exponencial en medio mínimo suplementado con glucosa al 1 % como única fuente de carbono y energía. Los microorganismos se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en amortiguador de quimiotaxis. El número de bacterias atraídas por bifenilo se determinó después de sembrar las bacterias en placas LB-agar. Las barras de error indican la desviación estándar obtenidas desde tres réplicas.

Como *Pseudomonas* sp. B4 es capaz de crecer en bifenilo y en varios clorobifenilos (Chávez y col., 2004), analizamos si el previo crecimiento de esta bacteria en bifenilo induciría una respuesta quimiotáctica hacia estos compuestos. Esta respuesta fue comparada con células crecidas previamente en glucosa. La quimiotaxis hacia bifenilo y clorobifenilos no fue inducida previo crecimiento de las células en bifenilo, comparada con la respuesta de las células crecidas en glucosa (Figura 8).

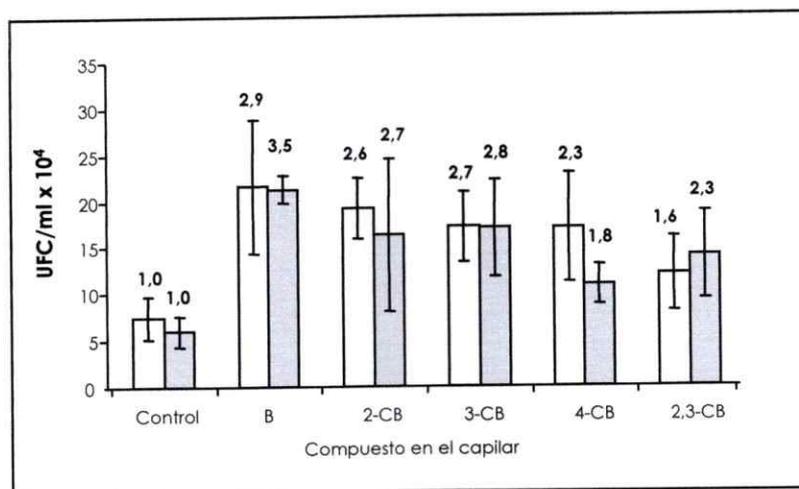


Figura 8. Efecto del crecimiento de *Pseudomonas* sp. B4 en dos medios de cultivo en la quimiotaxis hacia biphenilo y sus derivados clorados. La bacteria se creció hasta la fase exponencial media en medio mínimo con glucosa al 1 % como única fuente de carbono (barras grises) o biphenilo al 0,1 % (barras blancas). Las células se centrifugaron y resuspendieron en amortiguador de quimiotaxis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), para posteriormente realizar el ensayo modificado del capilar y analizar su respuesta quimiotáctica frente a biphenilo (B) y cloro biphenilos (CBs). Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó el test de ANOVA de dos vías para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los dos grupos de tratamiento. Sobre cada barra se muestra el índice quimiotáctico relativo (valor respecto al control que utiliza sólo amortiguador de quimiotaxis).

3.2.2. Quimiotaxis hacia ácido benzoico y cloroderivados utilizando ensayos cualitativo y cuantitativo.

Observamos que las bacterias sólo presentaron quimiotaxis hacia ácido benzoico (BA) y no hacia sus derivados clorados cuando éstos se utilizaron como fuentes de carbono y energía en la placa de Petri (Figura 9).

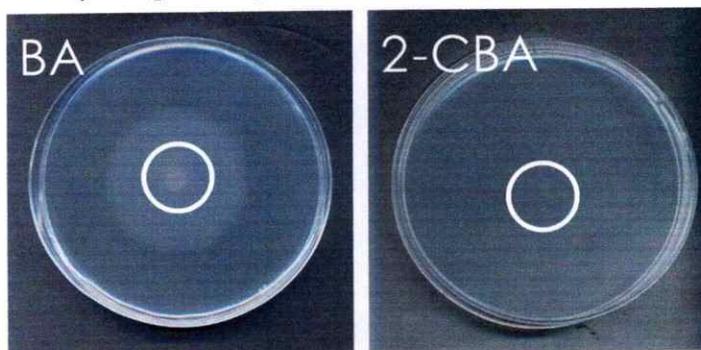


Figura 9. Respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas* sp. B4 hacia ácido benzoico y sus derivados clorados observada por el ensayo de "swarming". Las células se crecieron en medio mínimo y se inocularon en el centro de una placa (círculo blanco) que contenía el mismo medio suplementado con ácido benzoico (BA) o ácido 2-clorobenzoico (2-CBA), como las únicas fuentes de carbono y energía. El efecto en las placas con los ácidos 3-CBA y 4-CBA fue similar al observado con el 2-CBA. La aparición del anillo de "swarming" se registró después de incubar cada placa a 30 °C por un periodo de 48 h.

Esta bacteria fue incapaz de crecer en los ácidos clorobenzoicos (Figura 10A y B). El aumento en la absorbancia cuando la bacteria se crece en presencia de 3-CBA posiblemente se deba a la aparición de un componente que absorbe a una longitud de onda cercana a los 600 nm. Este medio presentó un color café en el medio de cultivo tal como se muestra en la Figura 10B. Esta coloración posiblemente se deba a la acumulación de los productos de autooxidación del 3-clorocatecol tal como en el caso de *P. putida* mt-2 (Bartels y col., 1984). Los resultados de las Figuras 9 y 10 indican que hay una correlación entre el fenómeno de swarming y la capacidad que tiene esta bacteria para crecer en estos compuestos (Figura 10).

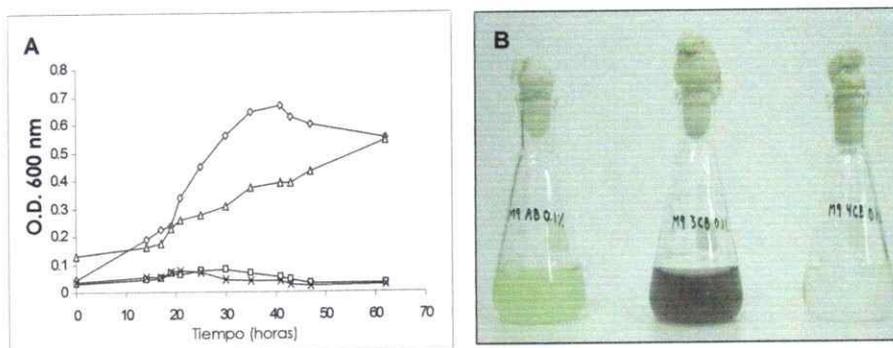


Figura 10. A: cinética de crecimiento de *Pseudomonas* sp. B4 en distintas fuentes de carbono. Las bacterias se crecieron toda la noche en medio Luria Bertani y se inocularon (dilución 1/10) en medio mínimo suplementado con ácido benzoico al 0,1% (rombos), ácido 2-clorobenzoico (cuadrados), ácido 3-clorobenzoico (triángulos) o ácido 4-clorobenzoico (cruces) como únicas fuentes de carbono y energía. La densidad óptica de los cultivos se monitoreó a 600 nm. **B:** Visualización de los cultivos de *Pseudomonas* sp. B4 descritos en **A**. Obsérvese la coloración parduzca del medio de cultivo, para el caso del 3-CBA luego de incubar la bacteria por ~50 h. Esta coloración no se observó cuando el medio no se incubó con la bacteria.

Con el ensayo modificado del capilar se cuantificó la quimiotaxis de *Pseudomonas* sp. B4 hacia ácido benzoico y distintos CBAs. Al igual que en el caso de bifenilo, se realizó un ensayo para evaluar la concentración de ácido benzoico en la cual se obtiene el mayor número de células dentro del capilar. En este caso, se observó un mayor número de células atraídas a una concentración de BA de 0,1 mM (Figura 11).

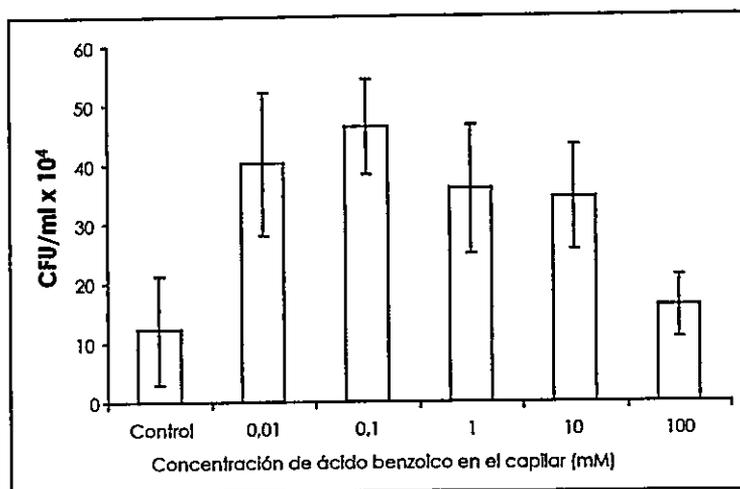


Figura 11. Quimiotaxis de *Pseudomonas* sp. B4 hacia distintas concentraciones de ácido benzoico. Las bacterias se crecieron hasta la fase exponencial en medio mínimo suplementado con glucosa al 1 % como única fuente de carbono y energía. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en amortiguador de quimiotaxis. El número de bacterias atraídas por el compuesto en el capilar se determinó después de sembrar las bacterias en placas de LB-agar. Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$). Sobre cada barra se muestra el índice quimiotáctico relativo (valor respecto al control que utiliza sólo amortiguador de quimiotaxis).

Similar al caso de bifenilo y derivados clorados, se observó quimiotaxis hacia el ácido benzoico cuando la bacteria se creció previamente en glucosa y en bifenilo lo que sugiere nuevamente un fenómeno de quimiotaxis constitutiva (Figura 12).

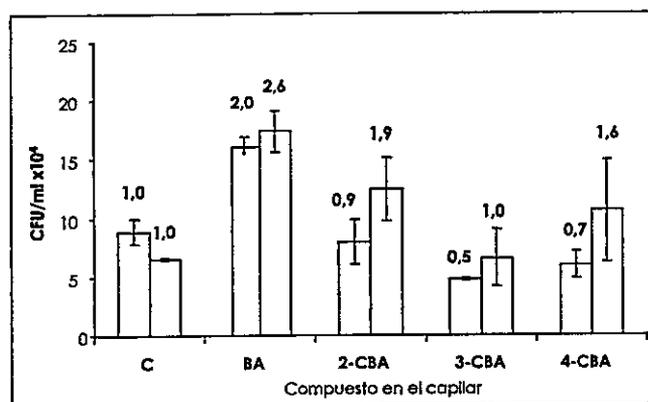


Figura 12. Efecto del crecimiento de *Pseudomonas* sp. B4 en dos medios de cultivo en la quimiotaxis hacia el ácido benzoico y sus derivados clorados. La bacteria se creció hasta la fase exponencial media en medio mínimo con glucosa al 1 % como única fuente de carbono (barras grises) o bifenilo al 0,1 % (barras blancas). Las células se centrifugaron y resuspendieron en amortiguador de quimiotaxis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), para posteriormente realizar el ensayo modificado del capilar y analizar su respuesta quimiotáctica frente a ácido benzoico (BA), ácido 2-clorobenzoico (2-CBA), ácido 3-clorobenzoico (3-CBA) y ácido 4-clorobenzoico (4-CBA). Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó el test de ANOVA de dos vías para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los dos grupos de tratamiento. Sobre cada barra se muestra el índice quimiotáctico relativo (valor respecto al control).

3.2.3. Inhibición del crecimiento por los ácidos clorobenzoicos.

Los bajos valores de UFC que se obtienen luego de incubar *Pseudomonas* sp. B4 con 3-CBA (ensayo del capilar) podrían explicarse por un efecto repelente de este compuesto o simplemente por un efecto tóxico. Por una parte, mediante un ensayo de “swarming” combinado con un ensayo con tapones de agarosa, se observó la presencia de un halo de inhibición cerca del “plug” que contenía 3-CBA. Este halo presentó una tonalidad parduzca, similar a aquella que se obtiene al incubar la bacteria en medio mínimo con este compuesto como única fuente de carbono y energía (Figura 13 A). El efecto tóxico del 3-CBA quedó demostrado cuando la bacteria se incubó en presencia de concentraciones por sobre 0,01 mM de este compuesto (Figura 13 B).

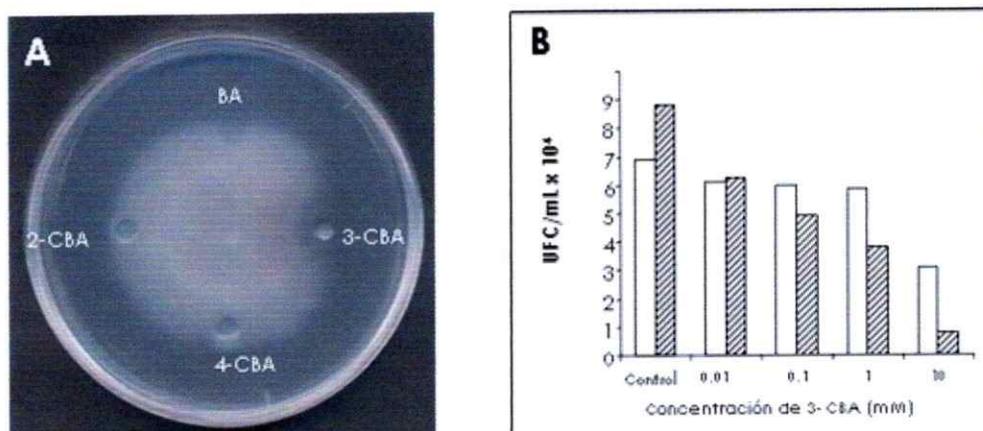


Figura 13. Efecto tóxico de diferentes ácidos clorobenzoicos en *Pseudomonas* sp. B4. **A:** efecto inhibitorio del ácido 3-clorobenzoico observado por un ensayo de “swarming” combinado con ensayo del “plug” de agarosa. Las bacterias se crecieron hasta la fase exponencial en medio mínimo suplementado con glucosa al 1% y se inocularon en las placas que contenían ácido benzoico 1 mM como la única fuente de carbono. En los círculos que se observan en cada extremo de la placa se colocaron “plugs” de agarosa que contenían cada uno de los compuestos indicados a una concentración de 100 mM. La placa se incubó por 30 °C por un período de 72 h. **B:** efecto de diferentes concentraciones de ácido 3-clorobenzoico en la viabilidad de *Pseudomonas* sp. B4. Suspensiones de células previamente crecidas en glucosa 1 % hasta la fase exponencial se incubaron con las concentraciones de 3-CBA indicadas y se tomaron muestras a los cero (barras blancas) y 90 min (barras achuradas) en los cuales se determinó el número de unidades formadoras de colonias.

3.3. Determinación de las propiedades emulsificantes de preparaciones crudas de fracciones extracelulares de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400.

3.3.1. Análisis de una posible sustancia exopolimérica en *B. xenovorans* LB400 y *Pseudomonas* sp. B4.

La simple observación de la forma de las colonias de la *Pseudomonas* sp. B4 sugirió claramente un fenotipo mucoide, a diferencia de las colonias de la *B. xenovorans* LB400 (datos no mostrados). Hemos observado que este fenotipo está correlacionado con la capacidad de la bacteria de moverse en medios semisólidos (secciones 3.1 y 3.2). Estos antecedentes hicieron suponer que la posible presencia de una sustancia exopolimérica podría estar relacionada con fenómenos de emulsificación de compuestos hidrofóbicos en las bacterias en estudio, tal como en el caso comunicado en *R. rhodochrous* donde se caracterizaron cepas con fenotipo mucoide y lisas, resistentes y sensibles al solvente orgánico *n*-hexadecano, respectivamente (Iwabuchi y col., 2000).

Utilizando microscopía electrónica se observó la presencia de un material extracelular denso al paso de los electrones en contacto con la membrana de *B. xenovorans* LB400 y de *Pseudomonas* sp. B4. Este material desaparece cuando las bacterias entran en fase estacionaria (Figura 14), fenómeno similar al observado en *A. calcoaceticus* RAG-1 cuando produce el biosurfactante emulsano (Pines y col., 1983). Este material estuvo presente en la fase exponencial independientemente de la fuente de carbono en la cual se crecieron las bacterias y además fue removido cuando las células se sometieron a un paso de centrifugación, lo que sugiere que no se encuentra fuertemente adherido a la envoltura celular como es el caso de algunos polisacáridos capsulares (Figura 14 C y F).

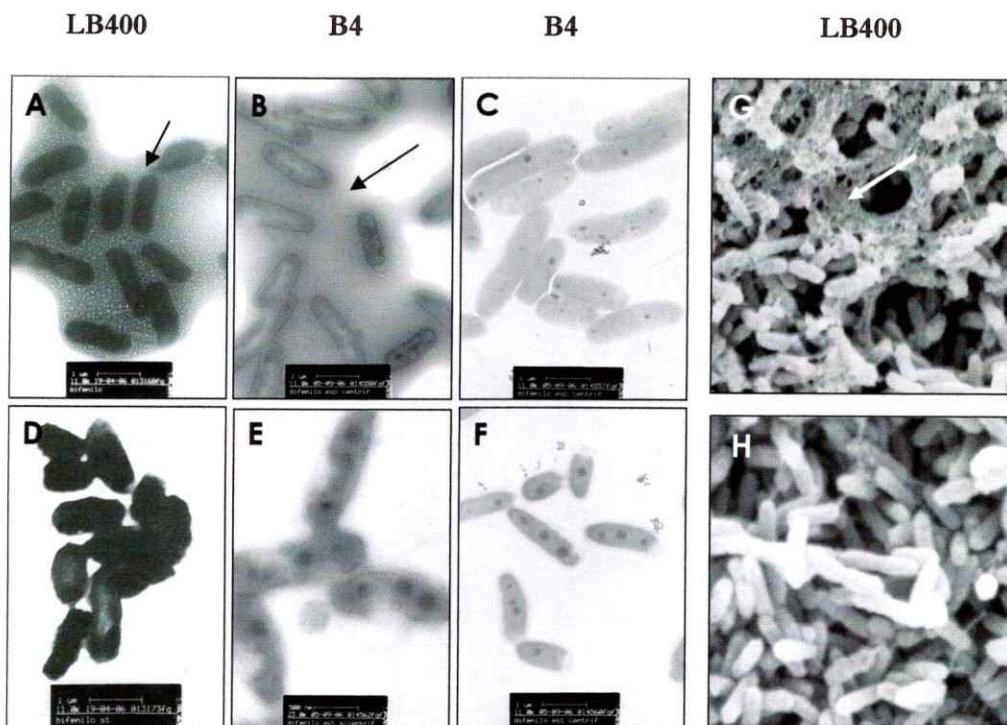


Figura 14. *B. xenovorans* LB400 y *Pseudomonas* sp. B4 presentan una posible EPS. Las células se crecieron hasta la fase exponencial (A, B, C y G) y hasta la fase estacionaria (D, E, F y H) en medio mínimo suplementado con glucosa 1 % y se visualizaron directamente utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM) (A, B, C, D, E y F) o microscopía electrónica de barrido (SEM) (G y H). Las flechas negras y la flecha blanca señalan la presencia del posible EPS, el cual se remueve al centrifugar y lavar las células con PBS salino (C y F). LB400: *B. xenovorans* LB400. B4: *Pseudomonas* sp. B4.

Utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM), se ratificó que este material se encuentra presente sólo en la fase exponencial y disminuye notoriamente cuando ambos tipos de bacterias se cosechan desde la fase estacionaria de cultivo (Figura 14 y datos no mostrados).

Para profundizar en la caracterización de este material, aprovechamos una colaboración iniciada con el Centro de Investigación Científica Borstel, Alemania. Para ello crecimos las bacterias hasta la fase exponencial, separamos los sobrenadantes de cultivo y los concentramos por liofilización. Luego, este material se separó en columnas de filtración molecular. Se observó la elución de dos picos de alto peso molecular provenientes de las muestras de la *B. xenovorans* LB400 y de un pequeño pico en las muestras provenientes de la *Pseudomonas* sp. B4. Ninguno de estos picos eluyó de la

columna de filtración cuando se cargó en ella el medio mínimo M9 previamente liofilizado (Figura 15A).

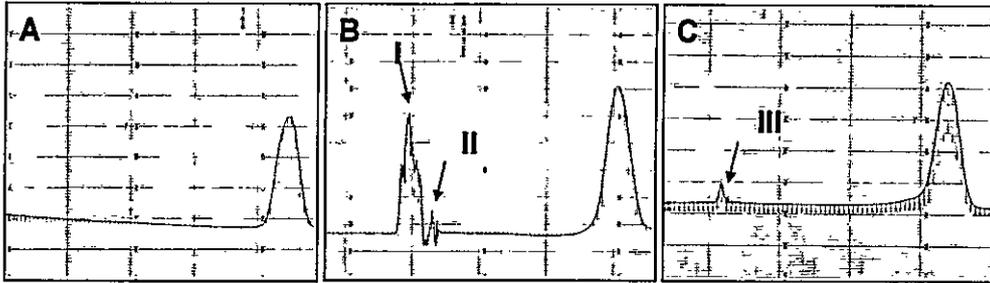


Figura 15. Separación cromatográfica de los sobrenadante de cultivo de *B. xenovorans* LB400 y *Pseudomonas* sp. B4 crecidas en glucosa 1%. Las flechas indican la aparición de picos de posibles polisacáridos (picos I y II) que fueron detectados por el refractómetro sólo en las muestras de sobrenadantes de *B. xenovorans* LB400 (B) y *Pseudomonas* sp. B4 (C) y que no aparecieron en el control (A). Se cargaron aproximadamente 40 mg de material en A, 43 mg de material en B y 90 mg de material en C. Las masas moleculares de los polisacáridos van desde $1,5 \times 10^5$ Da hasta $1,1 \times 10^6$ Da. El eje horizontal corresponde a las fracciones eluidas y el eje vertical corresponde a la medición del índice refractométrico de las muestras.

Sé recolectó las fracciones correspondientes y se analizó la presencia de azúcares neutros en las muestras. Los picos I y II provenientes de *B. xenovorans* LB400 revelaron la presencia de glucosa y galactosa, mientras que el único pico de *Pseudomonas* sp. B4 (pico III) reveló la presencia de manosa, glucosa y galactosa, como principales azúcares de la muestra (Figura 16).

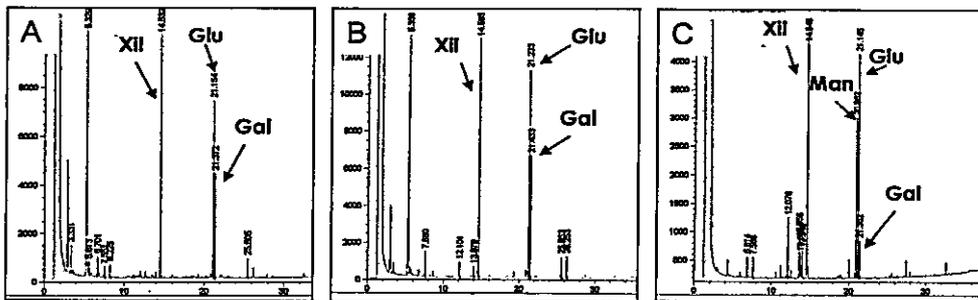


Figura 16. Perfil cromatográfico de la hidrólisis de las muestras de azúcares neutros de posibles EPS en *B. xenovorans* LB400 y en *Pseudomonas* sp. B4. Las flechas indican la detección de picos de los azúcares: Xil: xilosa (estándar interno), Glu: glucosa, Man: manosa y Gal: galactosa, de los picos I y II (A y B) de *B. xenovorans* LB400 y del pico III de *Pseudomonas* sp. B4 (C).

3.3.2. Actividad emulsificante de los sobrenadantes de cultivos de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400.

Se analizó las posibles propiedades emulsificantes de sobrenadantes de cultivos contra una mezcla isooctano/bifenilo. La Figura 17 muestra las actividades de los sobrenadantes de cultivos de ambas bacterias crecidas en los tres medios de estudio y extraídos en las dos fases de crecimiento. Los sobrenadantes fueron previamente dializados contra agua nanopura, liofilizados y estandarizados por concentración de proteínas en el ensayo. Los sobrenadantes de cultivo presentaron una baja actividad emulsificante, comparable con la actividad de la misma cantidad de la proteína BSA, la que fue usada como control. Los valores de absorbancia para las muestras de la fase exponencial y estacionaria que se obtienen son menores que los obtenidos para el control del ensayo utilizando el surfactante nonidet P40.

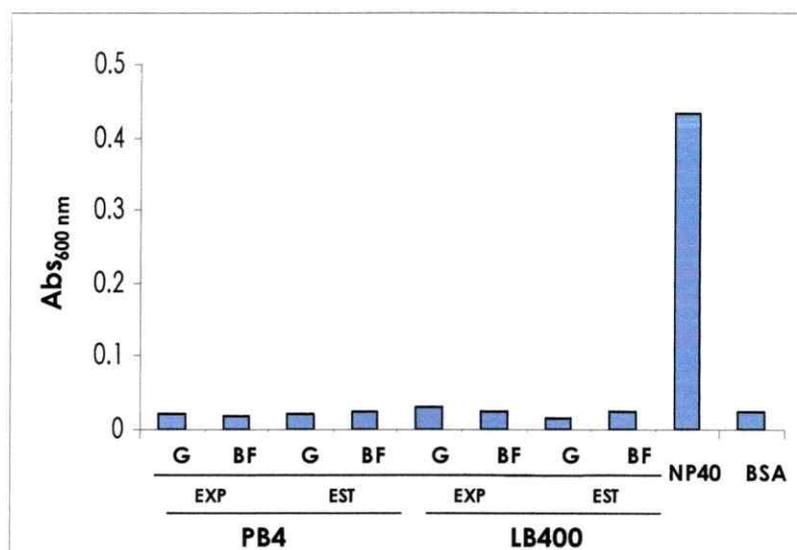


Figura 17. Determinación de la posible actividad emulsificante de los sobrenadantes de cultivo extraídos desde las dos fases de crecimiento en *Pseudomonas* sp B4 (PB4) y *B. xenovorans* LB400 (LB400). Ensayos de emulsificación de las siguientes muestras: sobrenadantes de cultivo extraídos de glucosa (G), bifenilo (BF), nonidet P40 (NP40) y albúmina de suero de bovino (BSA). Se utilizó 20 µg medidos de proteína total de los sobrenadantes extraídos desde la fase exponencial (EXP) o desde la fase estacionaria (EST) y 20 µg de BSA. NP40 se aplicó a una concentración de 15 mM.

3.4. Análisis *in silico* de las posibles proteínas secretadas por *B. xenovorans*

LB400.

3.4.1. Análisis *in silico* de las proteínas secretadas.

Se abordó la caracterización *in silico* de las proteínas secretadas por *B. xenovorans* LB400 cuyo genoma fue secuenciado por el Joint Genome Institute. Posee un tamaño de 9,73 Mbp y contiene aproximadamente 8.696 secuencias codificantes las que se reparten en tres replicones circulares: en el cromosoma 1 (4,90 Mbp), en el cromosoma 2 (3,36 Mbp), y en un megaplásmido (1,47 Mbp) (Tabla IV).

Se analizó cada marco de lectura abierto utilizando el servidor SubCell v1.0 (ver Materiales y Métodos) y se obtuvo en promedio que un 13,4 % del proteoma de este microorganismo es posiblemente secretado. Este grupo de 1.195 proteínas se destinaría a los cuatro compartimentos que serían: la membrana interna, el espacio periplásmico, la membrana externa y el espacio extracelular (Tabla IV y Figura 18).

Tabla IV.

Resumen del análisis global del proteoma de *B. xenovorans* LB400 organizado por segmentos génicos utilizando el servidor SubCell v. 1.0. Los números en paréntesis muestran el valor en porcentaje respecto al total.

Segmento Génico	Tamaño del genoma (Mpb)	Marcos de lectura abiertos	Citoplásmicas	Transmembrana	Secretadas			
					TatP	SignalP	Lipop	SecretomeP
Megaplásmido	1,47	1.293	933 (72)	200 (15,4)	13 (1)	136 (10,5)	7 (0,5)	4 (0,3)
Cromosoma 1	4,90	4.444	3.126 (70,3)	724 (16,2)	28 (0,6)	421 (9,5)	93 (2,1)	52 (1,2)
Cromosoma 2	3,36	2.959	2.044 (69)	498 (17)	41 (1,4)	324 (10,9)	37 (1,2)	15 (0,5)
Total	9,73	8.696	6.103 (70,2)	1.422 (16,3)	82 (0,9)	893 (10,1)	139 (1,6)	81 (0,8)

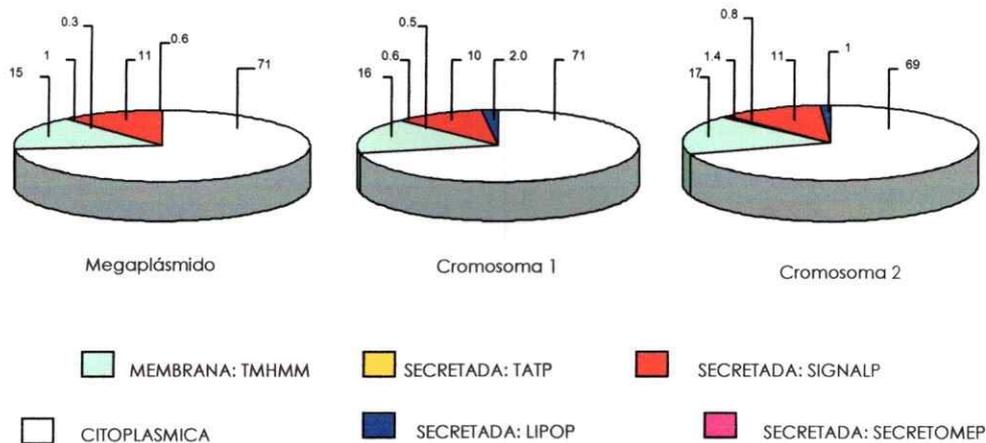


Figura 18. Representación gráfica de los datos obtenidos a partir del análisis computacional del proteoma de *B. xenovorans* LB400 usando el servidor SubCell v. 1.0. Los números en cada segmento génico representan los porcentajes de cada fracción analizada respecto al total (ver Tabla IV).

3.4.2. Análisis *in silico* de las proteínas secretadas en otros microorganismos del género *Burkholderia*.

Una forma de verificar que los datos obtenidos anteriormente son representativos es realizar un análisis comparativo utilizando para ello los proteomas de microorganismos filogenéticamente relacionados. Para ello se utilizó los genomas de las bacterias del género *Burkholderia* los que se encontraban disponibles en la base de datos del CBS. Al realizar el mismo análisis, encontramos que entre un 13-19 % de los proteomas de estos microorganismos son posiblemente secretados (Figura 19).

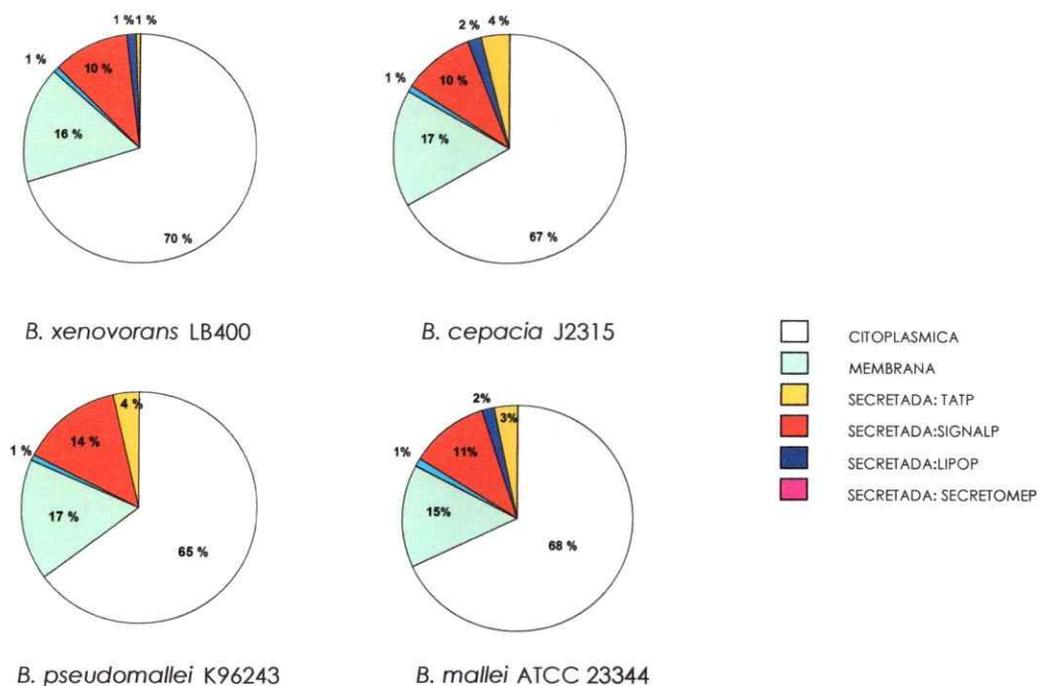


Figura 19. Análisis del proteoma de *B. xenovorans* LB400 y de bacterias correspondientes al género *Burkholderia* utilizando el servidor SubCell v1.0. Para cada proteoma se muestra la distribución en porcentaje de cada sistema de secreción.

3.4.3. Búsqueda informática de ortólogos de la proteína AlnA de *A. radioresistens* K53 en el genoma de *B. xenovorans* LB400.

Se inició la búsqueda de los posibles ortólogos de la proteína AlnA de *A. radioresistens* K53 en el genoma de la *B. xenovorans* LB400. Se utilizó para ello la herramienta Psi-Blast del NCBI, usando la secuencia aminoacídica de la proteína AlnA extraída desde la misma base de datos (Genbank n° AAK57731). Esta proteína es responsable de la mayor actividad del complejo emulsificante alasan (Toren y col., 2002a y b). Encontramos seis proteínas con un valor “e” menor a 7×10^{-5} . Al analizar sus secuencias aminoacídicas con el servidor SubCell, tres de ellas presentaron señal de secreción; dos de ellas Lipop, una SignalP, una secretomeP, dos con señales de transmembrana y una con localización citoplásmica (Tabla V).

Tabla V.

Posibles proteínas ortólogas a la AlnA de *A. radioresistens* K53 que están codificadas en el genoma de *B. xenovorans* LB400.

Gen	Predicción	Masa molecular (Daltons)	pI	Valor E	Identidad (%)	Proteína
<i>alnA</i>	SignalP	37.852	4,7	100	Proteína precursora tipo OmpA del complejo alasan
Bxe_A3482	Lipop	21.966	9,4	3e-19	26,7	Proteína de membrana externa, familia OmpA/MotB
Bxe_A0175	TMHMM	60.275	6,7	8e-07	23,1	Proteína de membrana externa, familia OmpA/MotB
Bxe_A2088	TMHMM	48.805	9,0	7e-06	12,1	Proteína hipotética
Bxe_B0804	Citoplásmica	23.242	5,6	2e-05	15,8	Proteína hipotética
Bxe_A0587	SecretomeP	28.618	9,1	3e-05	16,9	Proteína de membrana externa, familia OmpA
Bxe_A3921	Lipop	18.636	6,9	3e-05	21,9	Proteína de membrana externa, familia OmpA/MotB

La secuencia que presenta mayor identidad con la AlnA de *A. radioresistens* K53 es la secuencia codificada por el gen Bxe_A3482 (26,7 %; Tabla V). La secuencia aminoterminal de esta proteína contiene una señal de secreción de tipo Lipop, lo que sugiere que codifica para una putativa lipoproteína. Un examen más detallado de la secuencia aminoacídica de esta proteína comparada con la secuencia de la AlnA de *A. radioresistens* K53 muestra que la putativa lipoproteína de *B. xenovorans* LB400 sólo comparte dos de las cuatro regiones necesarias para la actividad emulsificante ubicadas en cuatro “loops” de la proteína AlnA (Toren y col., 2002c; Walter y col., 2006). Según este alineamiento, las regiones I y II presentan un 25 % y un 43 % de identidad en sus secuencias respectivamente, mientras que las zonas III y IV están ausentes en la secuencia aminoacídica de la *B. xenovorans* LB400 (Figura 20).

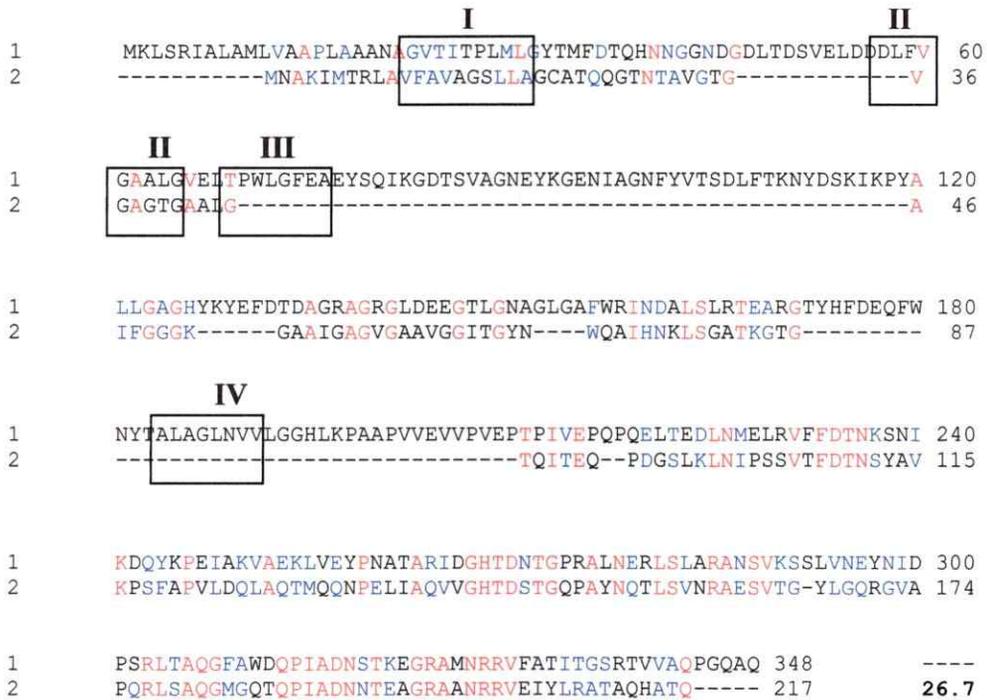


Figura 20. Alineamiento de la secuencia de AlnA de *A. radioresistens* K53 con la secuencia aminoácídica codificada por el gen Bxe_A3482 de *B. xenovorans* LB400. En rojo se indican los residuos conservados. En azul se indican los residuos parcialmente conservados en todas las secuencias. En rectángulos y destacados en números romanos se muestran cuatro regiones (“loops”) necesarios para la actividad emulsificante de la AlnA de *Acinetobacter radioresistens* K53. El porcentaje de identidad de la proteína codificada por el gen Bxe_A3482 con respecto al de la secuencia de la AlnA de la *A. radioresistens* K53 se muestra al final del alineamiento. 1: *Acinetobacter radioresistens* K53. 2: Bxe_A3482 de *B. xenovorans* LB400.

A pesar de que no se encontró un alto grado de identidad en los residuos encargados de la emulsificación, estos resultados no descartan la posibilidad de que en efecto esta proteína sea secretada al espacio extracelular y presente actividad emulsificante.

3.5. Caracterización de las proteínas extracelulares y su expresión diferencial en *B. xenovorans* LB400 crecida en medio definido suplementado con glucosa, bifenilo o ácido benzoico como únicas fuentes de carbono y energía.

3.5.1. Estandarización de un protocolo de precipitación de proteínas.

Para caracterizar las proteínas extracelulares de los sobrenadantes de cultivo de la *B. xenovorans* LB400, se adaptó dos protocolos de precipitación de proteínas: el método del ácido tricloroacético (TCA) y el método de precipitación con rojo de pirogalol (PRMM) (Sambrook y col., 1989; Caldwell y Lattemann, 2004). El método de precipitación con TCA produce variados efectos, los que combinados, permiten la precipitación de las proteínas. El principal efecto es la reducción del poder solvador de las moléculas de agua que interactúan con las proteínas. El método del PRMM utiliza rojo de pirogalol y en presencia de molibdato y oxalato en condiciones ácidas, se une a las proteínas y forma un complejo coloreado. La adición de metanol a esta solución ayuda a disminuir la constante dieléctrica del solvente acuoso y así facilitar la precipitación de proteínas. A pesar que el método PRMM parece ser más eficiente que el TCA (Caldwell y Lattemann, 2004), en nuestras condiciones no hubo diferencias apreciables en el rendimiento de las proteínas precipitadas (Figura 21). Escogimos el método del TCA por su fácil manejo para realizar los experimentos que siguieron a continuación.

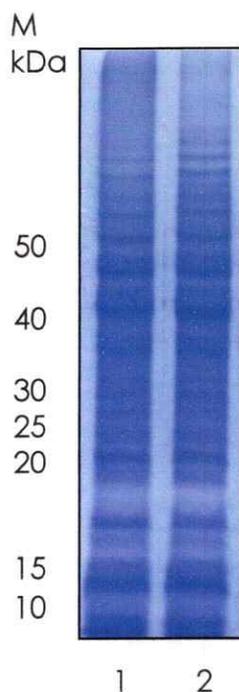


Figura 21. Comparación de los protocolos de precipitación de proteínas mediante SDS-PAGE. El sobrenadante de cultivo de *B. xenovorans* LB400 se precipitó con el método de PRMM (carril 1) o con el método del TCA (carril 2). Se utilizaron 10 µg de cada preparación para ser separada en un gel monodimensional SDS-PAGE al 12,5 %. Las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie R250. M: marcador de peso molecular.

3.5.2. Comparación de los perfiles de proteínas de las fracciones de extractos totales solubles y fracciones extracelulares mediante 2D-PAGE.

Para caracterizar las proteínas totales solubles y las proteínas extracelulares de *B. xenovorans* LB400, el microorganismo se creció en medio mínimo suplementado con glucosa, bifenilo o ácido benzoico. Las bacterias se cosecharon en la fase exponencial tardía con el objeto de minimizar la lisis celular que ocurre en la fase estacionaria. Cuando se separó la fracción extracelular mediante 2D-PAGE y se comparó visualmente con la fracción de proteínas proveniente de un extracto total soluble, se observó en la primera una preparación enriquecida en algunas proteínas mayoritarias. A la inversa, hay algunas proteínas presentes en los extractos totales solubles que desaparecen en el sobrenadante de cultivo, especialmente en la zona de los puntos isoeléctricos ácidos (Figura 22).

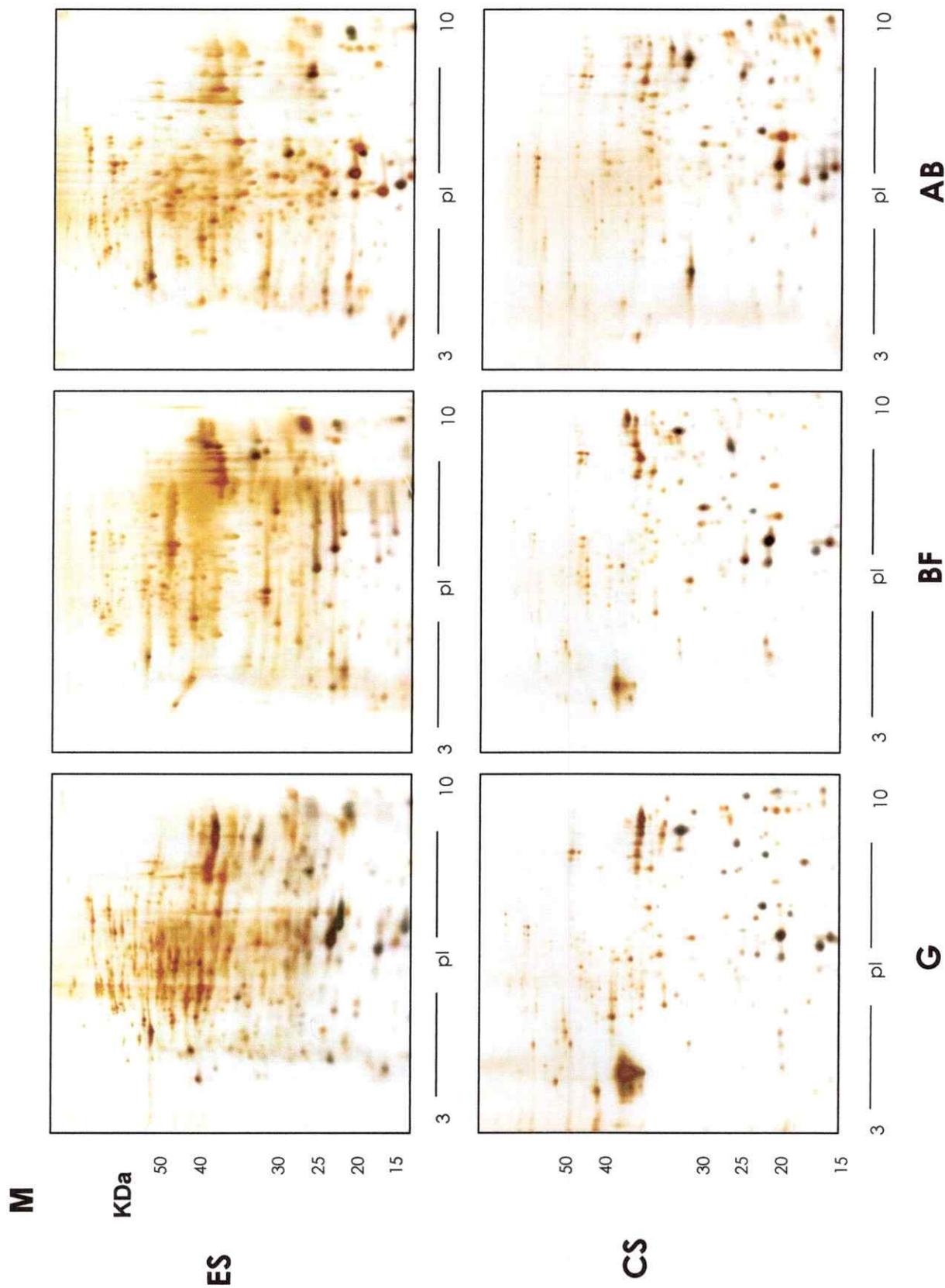


Figura 22. Comparación de los perfiles de proteínas totales solubles (ES) y de las fracciones extracelulares (CS). Cien microgramos de cada fracción se separaron mediante 2D-PAGE utilizando un gradiente no lineal de anfólitos inmobilizados con un rango de pH 3 a 10. M: marcador de peso molecular. G: glucosa, BF: bifenilo y AB: ácido benzoico.

3.5.3. Separación y secuenciación de las proteínas extracelulares de *B. xenovorans* LB400.

La separación electroforética de las proteínas extracelulares se observa nuevamente en la Figura 23, sin embargo en esta figura destacamos con mayor claridad a cuatro zonas que contienen manchas las cuales variaron en su expresión en las tres condiciones de cultivo (ver más adelante).

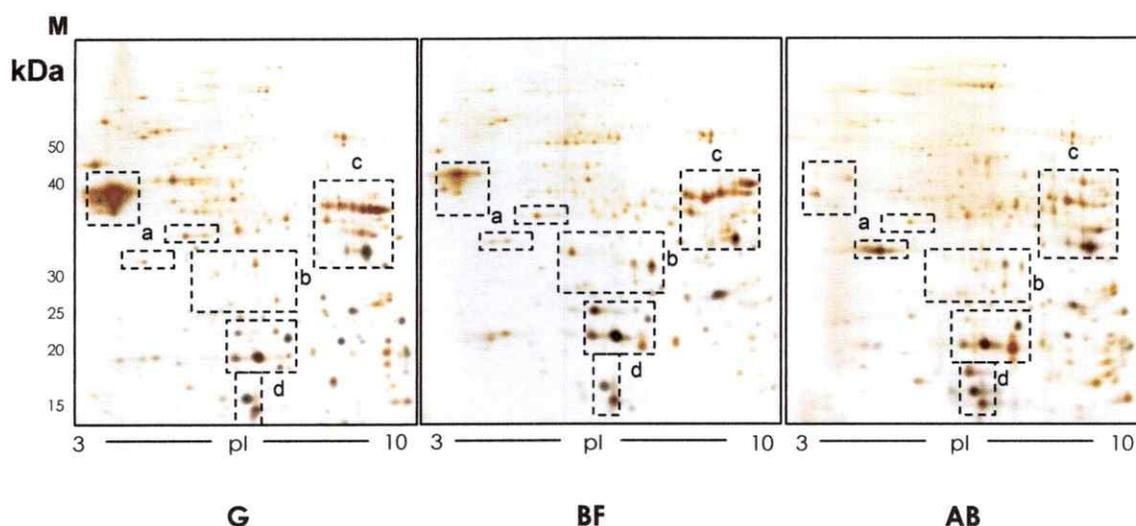


Figura 23. Separación de las proteínas extracelulares extraídas de los sobrenadantes de cultivos de *B. xenovorans* LB400 mediante electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE). Se han destacado en líneas discontinuas cuatro secciones de los geles que contienen manchas cuyas intensidades variaron en las tres condiciones de cultivo. M: marcador de peso molecular. G: glucosa, BF: bifenilo, AB: ácido benzoico.

Las manchas de los geles se cuantificaron utilizando el programa Quantity One de Biorad y en ellos se visualizó aproximadamente 198, 226 y 198 manchas en los geles provenientes de glucosa, bifenilo y ácido benzoico respectivamente. Las más abundantes (sectores destacados como a, b, c y d de la Figura 23), se secuenciaron por espectrometría de masas. Para mayor claridad en la visualización, las manchas de proteínas correspondientes al análisis diferencial se representan en la Figura 24.

Sector
del gel

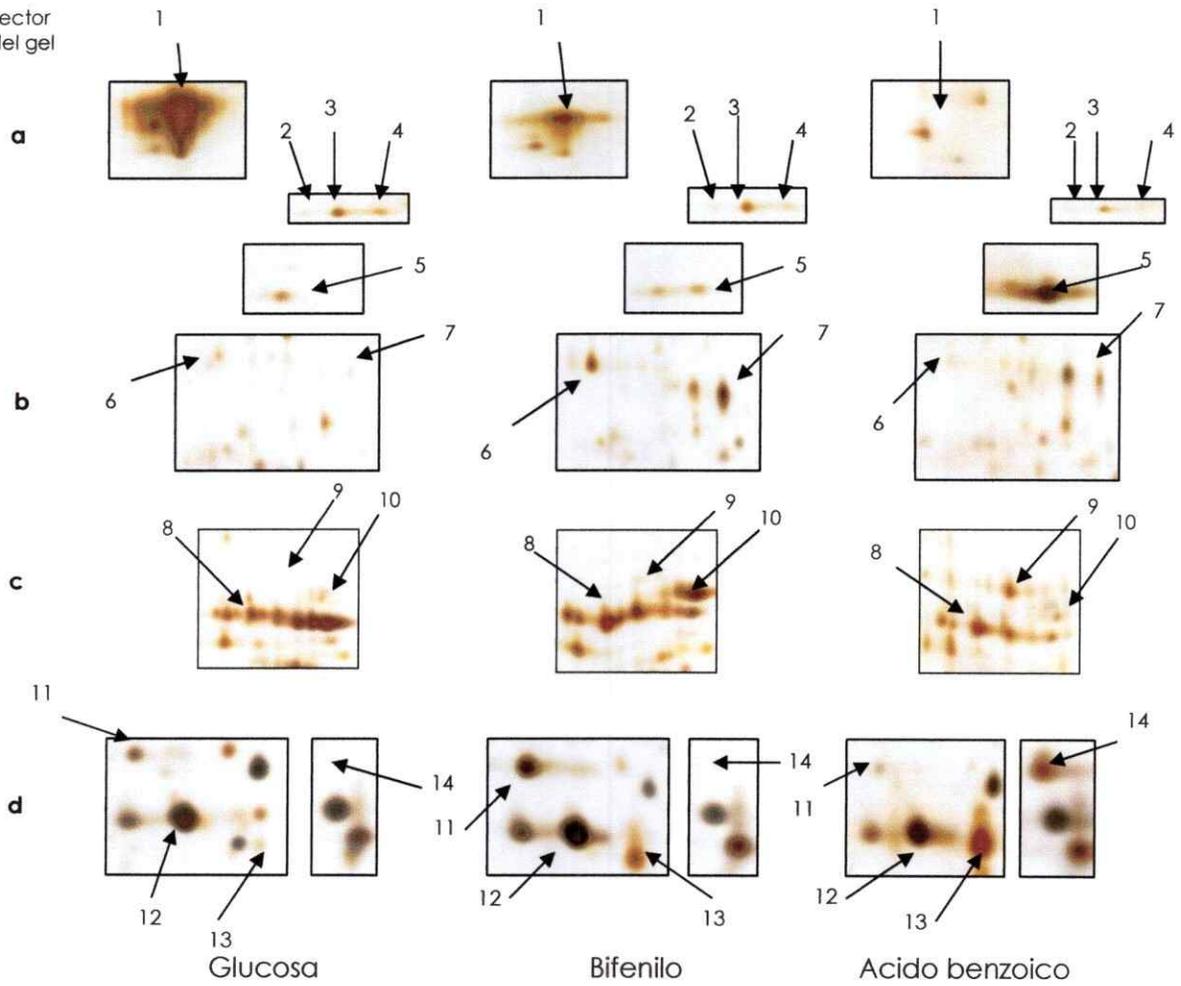


Figura 24. Cuatro secciones de los geles bidimensionales mostrados en la Figura 23 indicando la ubicación de las manchas de proteínas cuya expresión diferencial se observó en las tres condiciones de cultivo. La identidad de cada mancha correspondiente a proteína se presenta en la Tabla VI.

Tabla VI.Identificación de las proteínas aisladas desde los sobrenadantes de cultivo de *B. xenovorans* LB400.

Número de la mancha	Gen	Masa Molecular teórica (Da) ¹	pI teórico ¹	Puntaje MASCOT	Intensidad relativa (BF/GLU)	Intensidad relativa (AB/GLU)	Hit más probable
1	Bxe_A0103	38.103	4,3	479	0,9	0,2	Flagelina (FliC)
2	Bxe_B0845	38.846	5,6	126	0,9	0,9	Antiportador nucleósido/H ⁺
3	Bxe_B0845	38.846	5,6	126	1,0	0,8	Antiportador nucleósido/H ⁺
4	Bxe_B0845	38.846	5,6	126	0,6	0,5	Antiportador nucleósido/H ⁺
5	Bxe_A2109	33.232	5,1	577	3,8	9,7	Catecol 1,2-dioxigenasa (CatA)
6	Bxe_C1191	33.204	5,7	200	2,2	0,7	Bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa (BphC)
7	Bxe_C1186	32.028	6,4	181	5,2	3,2	2 hidroxí-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (BphD)
8	Bxe_B0420	44.383	8,8	583	1,7	1,5	Transportador de azúcares del tipo ABC. Proteína periplásmica de unión a ligando
9	Bxe_A4327	42.270	8,8	622	1,7	0,1	Transportador de aminoácidos del tipo ABC. Proteína periplásmica de unión a ligando
10	Bxe_A3706	43.229	8,9	821	2,5	0,6	Transportador de aminoácido ramificado del tipo ABC. Proteína periplásmica de unión a ligando
11	Bxe_C1196	24.978	5,9	325	1,6	0,6	Bifenil 2,3-dioxigenasa, subunidad menor (BphA2)
12	Bxe_A0769	21.445	6,2	271	1,2	1,2	Superóxido dismutasa (SodB)
13	Bxe_B2066	21.001	7,3	545	6,7	8,2	Proteína hipotética (YceI)
14	Bxe_A0769	19.967	6,1	377	1,0	8,7	Flavoproteína NADPH oxiquinona reductasa (WrbA)

¹ La masa teórica y el punto isoeléctrico se calcularon para la secuencia aminoacídica completa extraída desde la base de datos del CBS.

En las tres condiciones, se encontró catorce manchas claramente identificables cuando los geles se tiñeron con nitrato de plata. Estas manchas se identificaron también en geles preparativos teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250 (datos no mostrados). Las manchas se aislaron desde estos geles y se secuenciaron en el Centro de Proteómica de la Universidad de Cambridge.

Se encontró ocho proteínas presentes a una concentración mayor (inducción mayor a 1,5 veces) en los sobrenadantes de las células crecidas en bifenilo respecto a las crecidas en glucosa. Estas fueron tres enzimas que pertenecen al locus *bpb*: la subunidad menor de la bifenilo 2,3-dioxigenasa (mancha 11), la bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa (mancha 6) y la 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4- dienoato hidrolasa (mancha 7). También se encontró, la catecol dioxigenasa (mancha 5), una proteína hipotética (mancha 13) y dos proteínas periplásmicas de unión a ligando (manchas 8 y 10). En cambio, las proteínas inducidas en los sobrenadantes de las células crecidas en ácido benzoico respecto a las crecidas en glucosa fueron la catecol 1,2 dioxigenasa, la 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4- dienoato hidrolasa, una proteína periplásmica de unión a ligando (mancha 9), la proteína hipotética y una flavoproteína NADPH oxiquinona reductasa (mancha 14). Las proteínas que no se encontraron inducidas en las dos condiciones respecto a glucosa fueron la flagelina (mancha 1), la superóxido dismutasa (mancha 12) y un transportador nucleósido/H⁺ con posibles modificaciones postraduccionales (manchas 2, 3 y 4) (Tabla VI).

Una vez secuenciadas, se buscó estas doce proteínas distintas en la lista de posibles proteínas secretadas por si ellas contenían señales de secreción (Anexo II). Se encontró que sólo ocho de ellas contenían estas señales: flagelina, el antiportador, las tres proteínas periplásmicas de unión a ligando, la superóxido dismutasa, la proteína hipotética y la flavoproteína. Las enzimas; catecol 1,2 dioxigenasa y las tres

enzimas involucradas en la metabolización de bifenilo, entregaron localización citoplásmica (Tabla VII).

Tabla VII.

Identificación de las señales de secreción en las proteínas secuenciadas desde la fracción extracelular.

Número de la mancha	Proteína	Gen	Predicción SubCell	Predicción Cello
1	Flagelina (FliC)	Bxe_A0103	SecretomeP	Extracelular
14	Flavoproteína NADPH oxiquinona reductasa (WrbA)	Bxe_A0278	SecretomeP	Periplásmica
9	Transportador de aminoácido ramificado del tipo ABC. Proteína periplásmica de unión a ligando	Bxe_A4327	SecretomeP	Periplásmica
12	Superóxido dismutasa (SodB)	Bxe_A0769	SecretomeP	Extracelular
2,3,4	Antiportador nucleósido/H ⁺	Bxe_B0845	SignalP	Extracelular, periplásmica,
10	Transportador de aminoácido ramificado del tipo ABC. Proteína periplásmica de unión a ligando	Bxe_A3706	SignalP	Periplásmica, citoplásmica
8	Transportador de azúcares del tipo ABC. Proteína periplásmica de unión a ligando	Bxe_B0420	SignalP	Periplásmica
13	Proteína hipotética (YceI)	Bxe_B2066	SignalP	Periplásmica
5	Catecol 1,2-dioxigenasa (CatA)	Bxe_A2109	Citoplásmica	Citoplásmica
6	Bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa (BphC)	Bxe_C1191	Citoplásmica	Citoplásmica
7	2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa (BphD)	Bxe_C1186	Citoplásmica	Citoplásmica
11	Bifenil 2,3-dioxigenasa, subunidad menor (BphA2)	Bxe_C1196	Citoplásmica	Citoplásmica

Como una forma de validar la localización subcelular de las proteínas encontradas en los sobrenadantes de cultivo, se sometió la secuencia de las proteínas encontradas en el sobrenadante a un segundo análisis utilizando el servidor Cello. Con este análisis, confirmamos la localización citoplásmica de las enzimas codificadas por el locus *bph*, la catecol 1,2-dioxigenasa y de una proteína periplásmica de unión a ligando. Además, se encontró localización periplásmica de la flavoproteína, las tres proteínas periplásmicas de unión a ligando, el antiportador y la proteína hipotética.

Por último, encontramos localización extracelular de la flagelina, la superóxido dismutasa y del antiportador (Tabla VII).

Como se describió anteriormente, BphA2, BphC y BphD son enzimas encargadas de la metabolización de bifenilo y de la transformación de PCBs. BphA2 es la subunidad menor de la bifenilo 2,3-dioxigenasa, la que formaría un complejo con la subunidad mayor o BphA1 para catalizar la primera reacción de la vía. BphC es la 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa que cataliza la ruptura del anillo aromático. BphD es la 2-hidroxi-6-fenil-6-oxohexa-2,4-dienoato (HOPDA) hidrolasa la que produce 2-hidroxipenta-2,4-dienoato y ácido benzoico (Figura 1). Estas tres enzimas se han encontrado inducidas en extractos citoplasmáticos cuando *B. xenovorans* LB400 se creció en bifenilo como única fuente de carbono y energía (Denef y col., 2005). Por otra parte, la catecol 1,2-dioxigenasa es la segunda enzima de la vía *ben-cat* involucrada en el metabolismo del ácido benzoico. Específicamente, se encarga de la ruptura oxidativa del catecol (vía de ruptura *ortho*) para dar ácido mucónico y es claramente inducida cuando la célula crece en ácido benzoico como única fuente de carbono y energía (Denef y cols., 2005).

La superóxido dismutasa SodB, constituye la primera línea de defensa contra radicales superóxido generados por estrés oxidativo. Este radical inhibe algunas enzimas del ciclo de Krebs y algunas enzimas de la biosíntesis de aminoácidos ramificados, entre otras. En *P. aeruginosa* existen dos genes que codifican para superóxido dismutasas: *sodA* y *sodB*. La proteína SodA utiliza manganeso como cofactor y se induce en estados de carencia de hierro y en cepas sobreproductoras del exopolímero alginato, mientras SodB, utiliza hierro como cofactor y sería más importante que la Mn-SOD cuando las células crecen aeróbicamente, así como en la resistencia al efecto del generador de radicales paraquat y en la producción de fiocianina (Hassette y col., 1995).

Las proteínas periplásmicas de unión a ligando forman parte del sistema de secreción de tipo I (T1SS), el que consiste de un transportador ABC de membrana interna (encargado de la hidrólisis de ATP que produce la energía requerida para transportar moléculas), una proteína de unión a ligando (o proteína de fusión de membrana) que conecta la membrana interna y la externa y una proteína de membrana externa (Bendtsen y col., comunicación personal). Una de estas proteínas (aquella codificada por el gen BxB_3706) se encuentra en el cromosoma 1 formando parte de un grupo de proteínas relacionadas con la síntesis de LPS (datos no mostrados). Proteínas que posiblemente están relacionadas con la biosíntesis de LPS se han encontrado en preparaciones de membrana de *A. radioresistens* S13 cuando esta bacteria se expone a compuestos aromáticos, como el ácido benzoico o fenol (Pessione y col., 2003).

La flavodoxina pertenece a una familia de transportadores de electrones que usan mononucleótidos de flavina como cofactor. Presentan la misma función que las proteínas de tipo ferredoxina mediando esencialmente el mismo proceso redox entre un gran número de promiscuos dadores y aceptores de electrones. El gen *wrbA* de *E. coli* se encuentra regulado por el sistema de dos componentes ArcA-ArcB, el cual regula la transcripción de un subset de genes que responden a cambios en los estados redox de la célula. Por otra parte, la proteína se encuentra sobreexpresada cuando *E. coli* entra a la fase estacionaria y se somete a la presencia de agentes estresantes como ácidos, sales y H₂O₂, y además se encuentra bajo el control del factor sigma RpoS (factor sigma de respuesta al estrés) (Andrade, S. L., y col., 2007; Lelong y col., 2007; Lacour y Landini, 2004).

A pesar que no se encontró el posible ortólogo de la proteína AInA de *A. radioresistens* K53 entre las proteínas mayoritarias en los sobrenadantes de cultivo de la *B. xenovorans* LB400, nos enfocamos en la caracterización de una proteína hipotética

cuya secuencia aminocídica al ser analizada por el servidor Psi-Blast, resultó pertenecer a la superfamilia de las proteínas YceI. Esta proteína presenta una masa molecular de 21 kDa, y un punto isoeléctrico de 7,3. Además, presentó un péptido señal de tipo sec el que teóricamente presentaría 22 residuos, de esa forma se generaría una proteína madura de 18,8 kDa con un punto isoeléctrico de 6,3. Según la predicción Cello su probable localización sería periplásmica, no descartándose ser secretada al medio extracelular (Tabla VII).

Se conoce la estructura cristalográfica de tres integrantes de la superfamilia; la proteína YceI de *Thermus thermophilus*, la de *Campilobacter jejuni* y la de *E. coli*. La estructura de estas proteínas sugiere que ellas podrían unir compuestos hidrofóbicos (Handa y col., 2005)(Figura 25 A y B). Se utilizó los modelos cristalográficos de dos de estas proteínas para modelar la proteína de *B. xenovorans* LB400 usando el software DS Visualizer (Figura 25C). Los modelos tridimensionales de estas proteínas muestran claramente una alta similitud estructural entre ellas, a pesar de sus bajos porcentajes de identidad (la proteína de *B. xenovorans* LB400 presenta 23,6 % y 24,2 % de identidad con YceI de *E. coli* y *T. thermophilus* respectivamente). Las tres proteínas están conformadas por un barril β que se compone de ocho hebras antiparalelas en cuyo interior se encuentran los residuos aminoacídicos cuyos grupos laterales, preferentemente de carácter apolar, se encargarían de interactuar con compuestos de su misma naturaleza. Cuando se observa desde abajo, este barril presenta una ligera forma elíptica, donde ambos extremos de la proteína están abiertos al solvente (Figura 25D).

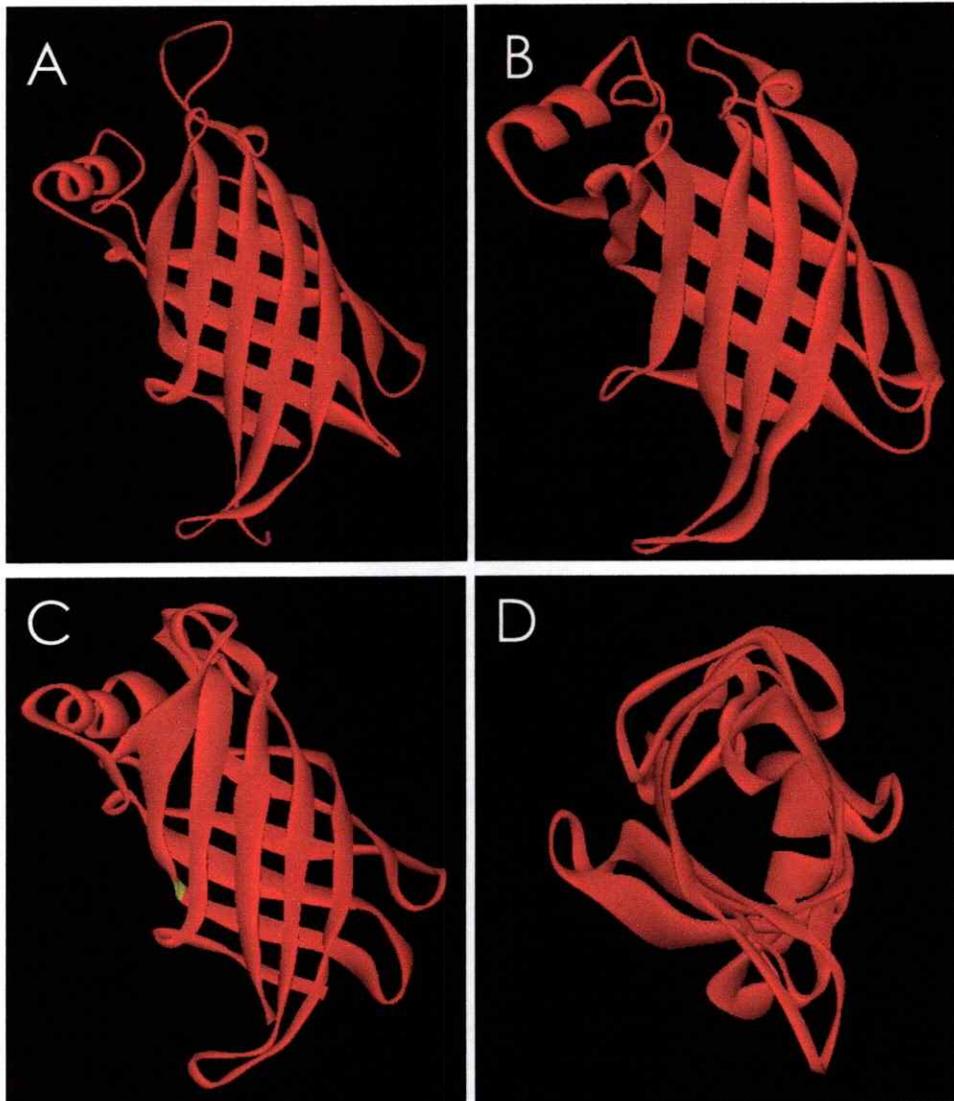


Figura 25. Modelos tridimensionales de algunos integrantes de la superfamilia de proteínas YceI. (A) Vista longitudinal de la proteína YceI de *T. thermophilus* (PDB: 1WUB). (B) Vista longitudinal de la proteína YceI de *E. coli* (PDB: 1YOG). (C) Vista longitudinal de la proteína YceI de *B. xenovorans* LB400 y (D) vista desde debajo de la proteína de *B. xenovorans* LB400. La proteína se modeló utilizando las estructuras cristalográficas de las proteínas ortólogas obtenidas de la base de datos del PDB. La estructura secundaria de la proteína muestra claramente que se compone de un barril que contiene ocho hebras beta antiparalelas.

La proteína YceI de *B. xenovorans* LB400 está codificada por el gen Bxe_B2066 y se encuentra río arriba del gen Bxe_B2065. Ambos genes se encuentran codificados en el cromosoma 2. El gen Bxe_B2065 codifica para una proteína de igual forma anotada como tipo YceI, sin embargo existe un 18,8 % de identidad a nivel aminoacídico entre estas proteínas. Por búsquedas bioinformáticas observamos que estos genes presentarían copias parálogas las que se encuentran codificadas en el cromosoma 1 (genes Bxe_A3996 y Bxe_A3995). En donde la proteína codificada por el gen Bxe_A3995 presenta un 72 % de identidad con la proteína codificada por el gen Bxe_B2066, mientras que las otras parejas presentan un 70,6 % de identidad. La organización de estos cuatro genes es muy similar, pues cada grupo presenta río arriba a un gen que codifica para una posible proteína de membrana (citocromo b-561). Finalmente, existe un quinto gen (Bxe_B3019) que codifica para una proteína tipo YceI con 18,2 % de identidad con la codificada por el gen Bxe_B2066 (Anexo I).

4. DISCUSION.

4.1. Caracterización de la movilidad de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400 mediante microscopía y ensayos de movilidad.

La importancia de la movilidad en la biorremediación, ha quedado demostrada porque bacterias que no son móviles presentan bajos niveles de degradación de compuestos aromáticos (Law y Aitken, 2003). *B. xenovorans* LB400 se ha descrito como una bacteria móvil (Goris y col., 2004) y además contiene los genes que codifican para proteínas relacionadas con movilidad y quimiotaxis (datos no mostrados). Sin embargo, utilizando tanto microscopía óptica como ensayos de movilidad en placas observamos la carencia de movilidad de esta bacteria bajo nuestras condiciones experimentales. El bajo número de estructuras flagelares visibles por microscopía electrónica podría explicar este fenómeno. Aunque otros autores han comunicado la carencia de movilidad de esta bacteria, no descartamos la posibilidad de que se haya seleccionado una variante de la *B. xenovorans* LB400 incapaz de moverse en medios líquidos y/o sólidos debido principalmente a la constante presión selectiva cuando la bacteria se somete a varios pasajes en medios ricos, tales como LB. *Pseudomonas* sp. B4 es un aislado más reciente que la cepa modelo, por lo que muchas capacidades necesarias para sobrevivir en un medio adverso posiblemente se hayan perdido en esta última. En efecto, muchos investigadores concuerdan que son los aislados más recientes los que aún presentarían todas las características necesarias para enfrentar de una mejor forma a los compuestos presentes en sitios contaminados (por ejemplo, movilidad y formación de biopelículas).

4.2. Cuantificación de la quimiotaxis de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400 hacia bifenilo como a distintos clorobifenilos e intermediarios de la biodegradación.

Los ensayos del capilar mostraron que *Pseudomonas* sp. B4 se acumuló en los capilares que contenían concentraciones crecientes de bifenilo con un número máximo obtenido aparentemente a una concentración nominal de 1 mM. La baja solubilidad del bifenilo y cloroderivados en el amortiguador, obligó a emplear el solvente isooctano para solubilizar estos compuestos. Como primera aproximación, en estos ensayos se estandarizó la concentración de bifenilo que generase un mayor índice quimiotáctico. A la concentración de 10 mM en la jeringa, los cristales precipitaron en el amortiguador, formándose una capa aceitosa sobre la superficie del líquido y depositándose sobre las paredes del recipiente, por lo que los valores de células dentro del capilar fueron irreproducibles.

Cuando se analizó la quimiotaxis hacia otros congéneres de PCB, observamos que la tendencia de los valores de las respuestas quimiotácticas hacia esos compuestos es a la disminución. Posiblemente, a las concentraciones ensayadas se presentan otros efectos de los compuestos en las células los que pueden estar relacionados con la toxicidad de los mismos (Parnell y col., 2006; Cámara y col., 2004). Los resultados de quimiotaxis en capilar se correlacionan con los obtenidos en el ensayo de swarming, donde se verifica la quimiotaxis hacia compuestos que son metabolizables (Harwood y col., 2004). A diferencia de lo observado en *P. putida* G7 para el caso de la quimiotaxis hacia naftaleno, no observamos el mismo efecto de inducción de este fenómeno en *Pseudomonas* sp. B4 cuando las células se crecen previamente en bifenilo.

El naftaleno es un compuesto aromático que presenta una estructura similar al bifenilo. El bifenilo presenta un enlace covalente que separa los anillos aromáticos, mientras que los anillos de naftaleno están fusionados entre sí. El gen que codifica para un

posible receptor de naftaleno en *P. putida* G7 es *nahy*. Este gen forma parte de un operón que contiene los genes involucrados en la degradación de naftaleno y se transcribe en conjunto con uno de los genes de la vía metabólica que degrada naftaleno (vía inferior). Este gen codifica para la proteína NahY, del tipo MCP. Sin embargo, presenta un bajo porcentaje de identidad con las conocidas MCPs de *E. coli* o *S. Typhimurium* (Grimm y Harwood, 1997 y 1999). La secuencia parcial publicada en la base de datos del NCBI correspondiente al locus *bph* de *Pseudomonas* sp. B4 (Genbank n° AJ251217) no indica la existencia de un marco de lectura que codifique para una posible proteína del tipo MCP, similar a la del posible receptor de naftaleno de *P. putida* G7. Es más, aunque hasta el momento no se ha comunicado quimiotaxis hacia bifenilo en las cepas modelos que degradan bifenilo, *P. pseudoalcaligenes* KF707 y *B. xenovorans* LB400, no se ha encontrado algún ortólogo de la proteína NahY codificado en los respectivos locus *bph* de estas bacterias. Si en la quimiotaxis que observamos hacia bifenilo y PCBs está involucrada una proteína del tipo MCP similar al caso de naftaleno, no descartamos que el gen que codifica para esta proteína esté codificado en otra región del cromosoma de la *Pseudomonas* sp. B4. Mediante el análisis *in silico*, se han detectado del orden de 35 putativas proteínas del tipo MCP codificadas en el genoma de *B. xenovorans* LB400 y unas 25 MCPs en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, dando cuenta del gran número de posibles receptores en estas bacterias (datos no mostrados). Ahora bien, los intentos por encontrar respuestas quimiotácticas hacia determinados compuestos orgánicos a través de mutantes no han sido satisfactorios, sugiriendo que más de un posible receptor estaría involucrado en la percepción de un determinado compuesto en estas bacterias (Parales, y col. comunicación personal).

Se ha observado que la exposición de las bacterias a algunos PCBs e intermediarios de la transformación de los PCBs generan efectos nocivos para las células (Cámara y col., 2004). Algunos de estos metabolitos eventualmente podrían ser extruídos de las bacterias por bombas de eflujo dependientes de ATP, donde se acumularían en el

espacio extracelular y nuevamente serían percibidos por las bacterias (Ramos y col., 2002; Sikkema y col., 1995). Es por este motivo que estudiamos la presencia de quimiotaxis e inhibición del crecimiento de algunos metabolitos derivados del catabolismo de bifenilo (ácido benzoico) o de los intermediarios de la degradación derivados de la transformación de los compuestos 2-clorobifenilo (2-clorobenzoato), 3-clorobifenilo (3-clorobenzoato) y 4-clorobifenilo (4-clorobenzoato) (Potrawfke y col., 1998). *Pseudomonas* sp. B4 sólo fue capaz de crecer en ácido benzoico y no en los cloroderivados 2-CBA, 3-CBA y 4-CBA. En efecto, sólo se observó respuesta quimiotáctica al ácido benzoico en el ensayo de "swarming".

Se observó una respuesta quimiotáctica hacia ácido benzoico cuando las células crecen previamente en glucosa y bifenilo. Este fenómeno sería de igual forma de tipo constitutivo en estas condiciones. Sin embargo, hemos observado un efecto de inducción cuando las células se crecen en ácido benzoico, fenómeno similar al observado en la bacteria *P. putida* PRS2000 (Harwood y col., 1990). En esta bacteria, el ácido benzoico, 3-CBA y 4-CBA fueron atrayentes aunque el 4-CBA no se utilizó como fuente de carbono por *P. putida* PRS2000 (Harwood y col., 1984; Harwood y col., 1990). La bacteria *Pseudomonas* sp. B4 se comportó en forma similar a *P. putida* PRS2000 sólo cuando se enfrentó al ácido benzoico. Un posible receptor para la percepción de los derivados de ácido benzoico de *P. putida* PRS2000 (responsable de la quimiotaxis hacia ácido benzoico, toluatos, ácido *p*-hidroxibenzoico y salicilato) es inducido en presencia de un intermediario de la degradación de aromáticos como es el caso de β -cetoadipato. Otro posible receptor está asociado con la percepción de mandelato, benzilformato y β -benzilformato (Harwood y col., 1984). El gen *pcaK* codifica para un transportador no esencial para *p*-hidroxibenzoato y se demostró que es requerido para la quimiotaxis hacia ácido benzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico (Harwood y col., 1994). Tal como el caso de un posible receptor para los PCBs, será necesario contar con la secuencia del genoma de la *Pseudomonas* sp. B4 para

comenzar la búsqueda de un posible gen que codifique para el receptor de benzoato. Además sería interesante analizar si este posible gen se encuentra entre los genes que codifican para la degradación de compuestos aromáticos y si es transcrito junto con ellos.

Aunque no pudimos analizar un fenómeno de repelencia del compuesto 3-CBA, sí observamos un efecto inhibitorio del crecimiento en *Pseudomonas* sp. B4, debido posiblemente por toxicidad del metabolito *perse* o por algún compuesto transformado por enzimas presentes en la bacteria. Por ejemplo, algunos compuestos aromáticos, son repelentes para *E. coli* y *S. Typhimurium*, bacterias que carecen de vías metabólicas para mineralizar los compuestos aromáticos (Stock y Surette, 1993). En estas bacterias, el ácido benzoico y el salicilato transportan protones al citoplasma, por lo tanto las respuestas fisiológicas que presentan estas bacterias cuando se enfrentan a los compuestos aromáticos se deben probablemente a una baja del pH intracelular y no a la estructura del compuesto en sí (Stock y Surette, 1993).

Sin embargo, en bacterias que degradan los compuestos aromáticos, tales como ácido benzoico y sus cloroderivados, el efecto tóxico de algunos intermediarios que no son metabolizados al parecer es distinto. En estas bacterias, los compuestos aromáticos generalmente son metabolizados por vías oxidativas. Las dos primeras enzimas de la vía de metabolización de estos compuestos son una dioxigenasa y una deshidrogenasa las que producen la dihidroxilación del anillo para generar los respectivos catecol o clorocatecoles (Gibson y Parales, 2000). La ruptura oxidativa del catecol se puede producir en dos formas: intradiol (vía de ruptura *ortho*) para dar ácido mucónico o extradiol (vía de ruptura *meta*) para dar un ácido hidroximuconaldehídico. Para la primera vía, la primera enzima responsable es la 1,2 catecol dioxigenasa y para la segunda la 2,3 catecol dioxigenasa (Bugg y Winfield, 1998). Una posible explicación para el efecto tóxico del 3-CBA en *Pseudomonas* sp. B4, se ha descrito en *P. putida* mt-2. En esta bacteria se ha descrito un caso de inactivación de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa al transformar el 3-clorocatecol lo que

probablemente esté generando la acumulación de este producto tóxico para la célula (Bartels y col., 1984).

Como conclusión a lo observado en los microorganismos degradadores de PCBs podríamos visualizar que en términos de la eficiencia de un proceso de biorremediación este dependerá no sólo de factores tales como las capacidades enzimáticas, los comportamientos móviles y/o quimiotácticos, sino también de la toxicidad de los PCBs y de los intermediarios formados durante el proceso de transformación y/o mineralización. Hay que destacar también las posibles relaciones que se establecerían entre los miembros de una misma comunidad, los que son capaces de degradar los intermediarios producidos por los microorganismos transformadores de PCBs. Por ejemplo en un modelo de consorcio que consiste de dos microorganismos *B. xenovorans* LB400 (no móvil) y *Pseudomonas* sp. B13 (FR1) (móvil) los microorganismos aparentemente interactúan metabólicamente ya que *Pseudomonas* sp B13 (FR1) puede metabolizar los CBAs producidos por *B. xenovorans* LB400 cuando esta última se expone a clorobifenilos (Nielsen y col., 2000). En nuestro caso, si es que queremos usar a la bacteria móvil *Pseudomonas* sp. B4 en procesos de biorremediación de PCBs habría que considerar la toxicidad generada por el intermediario 3-CBA y diseñar una estrategia que involucre el uso de bacterias que remuevan este tóxico.

4.3. Determinación de las propiedades emulsificantes de preparaciones crudas de las fracciones extracelulares de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400.

Los microorganismos poseen una enorme versatilidad para sintetizar distintos tipos de biopolímeros, entre los cuales algunos poseen actividades emulsificantes y/o roles en la tolerancia a la presencia de compuestos hidrofóbicos. Los exopolímeros que forman cápsulas se encuentran firmemente unidos por interacciones covalentes a fosfolípidos o moléculas del tipo lípido A de la membrana celular. En los casos en los que las

interacciones son débiles el EPS se encuentra formando cápsulas periféricas difusas, o bien, es excretado al medio extracelular en forma de sustancia amorfa y/o mucilaginosa (Roberts, 1996). Los EPS observados en *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400 al parecer pertenecerían a este grupo, pues fueron fácilmente removidos de la bacteria al utilizar sólo la acción mecánica.

Cuando analizamos la composición del material separado desde los sobrenadantes de cultivo de *B. xenovorans* LB400 se observó dos picos cuya composición reveló la presencia de glucosa y galactosa. En el caso del género *Burkholderiae*, se ha observado que la cepa mucoide *B. cenocepacia* C9343 contiene una mezcla de tres diferentes polisacáridos: polisacárido I (compuesto por un disacárido de unidades repetitivas de glucosa y galactosa), polisacárido II o cepaciano (compuesto por un heptasacárido acetilado constituido por galactosa, manosa, ramnosa, glucosa y ácido glucurónico) y dextrano (Bylund y col., 2006). Por otra parte, un posible polisacárido capsular fue identificado en *B. gladioli* pv. *agaricola*, el que contiene unidades repetitivas de D-ramnosa (Kaczynski y col., 2006).

Cuando analizamos la composición del material separado de los sobrenadantes de cultivo en *Pseudomonas* sp. B4, observamos un pico cuya composición reveló la presencia sólo de manosa, glucosa y galactosa. En las bacterias *P. aeruginosa* PAO1 y PA14, se han descrito dos loci que sintetizan polisacáridos que son importantes en la formación y/o mantención de biopelículas. Estos son el locus *psl* y *pel*. El locus *psl* (del inglés polysaccharide synthesis) es un operón que comprende 15 genes que codifican para la biosíntesis del polímero. Las tinciones para carbohidratos indican que este polímero es rico en manosa y galactosa, sin embargo su estructura aún no se ha caracterizado (Ryder y col., 2007). El locus *pel* (del inglés pellicle) se compone de siete genes. Nuevamente, los análisis de tinciones sugieren que se compone de glucosa, el que parece no ser el polímero de celulosa (Friedman y Kolter, 2004). No descartamos que el material separado desde el sobrenadante de cultivo de la *Pseudomonas* sp. B4 también incluya más de un polímero,

como alginato. Este polímero está constituido por ácido manúrico o gularónico (o una mezcla de éstos) y se ha descrito hasta el momento como componente clave de las biopelículas y está presente en las cepas mucoides de *P. aeruginosa* PAO1 (Govan y Deretic, 1996).

La presencia de material de tipo EPS en el sobrenadante de cultivo sugirió un posible papel en la emulsificación de compuestos liposolubles no descartándose un rol de otro tipo para las moléculas presentes en el sobrenadante de cultivo, tales como proteínas u otro tipo de moléculas de alto peso molecular. Observamos una baja actividad emulsificante independiente del medio en que se crecieron las bacterias e independiente de la fase en el cual se extraen estos sobrenadantes. Se utilizó una concentración de entre 10 y 100 µg de proteína total para cada sobrenadante (datos no mostrados), sin embargo no descartamos que exista una actividad emulsificante que no se encontró en nuestros sobrenadantes a las concentraciones de proteínas usadas, posiblemente por la presencia de algún tipo de inhibidor. Por otra parte, no descartamos la presencia de moléculas más pequeñas que se hayan perdido por las diálisis que se realizaron para extraer las sales de los sobrenadantes de cultivo. Se utilizaron bolsas de diálisis con un corte de 3.000 Da y se ha descrito que *P. aeruginosa* PAO1 produce ramnolípidos (biosurfactantes de bajo peso molecular) los cuales presentan actividades emulsificantes hacia compuestos hidrofóbicos (Desai y Banat, 1997; Ron y Rosenberg, 1999, 2001 y 2002; Mulligan, 2005; Van Hamme y col., 2006).

La carencia de actividad emulsificante en los sobrenadantes de cultivo no descartan otra función para el posible EPS encontrado en estas bacterias. Uno de estos roles correspondería a la regulación de la adhesión a superficies. Algunos materiales excretados pueden formar biopelículas en la interfase, por lo tanto se podría estimular la colonización de ciertos microorganismos en ella e impedir la colonización por otros (Neu, 1996). Un ejemplo concreto de adhesión ocurre con el emulsano de *A. calcoaceticus* BD4. Esta cápsula

es utilizada para la adhesión a gotas de aceite que contiene el sustrato a metabolizar. Una vez que el sustrato se ha consumido, la bacteria migraría hacia otras zonas provistas de nutrientes, dejando la cápsula adherida a la gota de aceite, cambiando la superficie de la gota de hidrofóbica a hidrofílica. Por otra parte, la ausencia de este material sobre la envoltura celular podría cambiar la hidrofobicidad de la bacteria y facilitar la adhesión y el contacto con moléculas hidrofóbicas. Por ejemplo, en cepas de *P. aeruginosa*, uno de los mecanismos que se postulan para que los ramnolípidos puedan favorecer la biodegradación de compuestos hidrocarbonados es la solubilización directa de la molécula hidrofóbica (posiblemente dentro de estructuras micelares) y cambios en la hidrofobicidad de la superficie de la bacteria provocando una mejor solubilización del compuesto (posiblemente por remoción de moléculas de LPS) (Al-Tahhan y col., 2000).

Sería interesante analizar la composición de este posible EPS extraído de las otras dos condiciones de cultivo. Su composición entregaría información sobre su posible función en la adhesión a sustratos abióticos o en la tolerancia de la bacteria a sustratos hidrofóbicos.

4.4. Análisis *in silico* de las posibles proteínas secretadas por *B. xenovorans* LB400.

Una de las principales ventajas de contar con un genoma secuenciado es sin duda que, podemos por ejemplo, inferir la posible función de una proteína observando la ubicación que presenta su gen en un contexto génico en particular. Además, podemos hacer comparaciones con otros genomas disponibles, en especial en especies que pertenecen a una misma clase, como algunas del género *Burkholderiae*.

Iniciamos la búsqueda *in silico* de posibles proteínas secretadas en *B. xenovorans* LB400 con el objeto de encontrar alguna proteína que estuviese involucrada en la interacción con los PCBs, tomando como modelo a la proteína AlnA de *A. radioresistens* K53.

En nuestro análisis observamos que aproximadamente un 13,4 % de las proteínas que son codificadas en el genoma de la LB400 son putativamente secretadas por los aparatos de secreción de membrana interna sec, tat y un aparato de secreción no clásico. Este porcentaje es comparable a los valores de proteínas secretadas por otros miembros del género e incluso es compartido por miembros del género *Pseudomonas* (datos no mostrados). Las 1.195 proteínas predichas eventualmente se destinarían al periplasma de la bacteria, a las membranas interna o externa o serían secretadas al medio extracelular por los sistemas de secreción de tipo II o IV (Kostakioty y col., 2005). En estos análisis no se identificó posibles proteínas que pueden ser secretadas por los sistemas de secreción del tipo I, III, IV o VI, los que no utilizan intermediarios periplásmicos para la exportación de proteínas al medio extracelular. Por lo tanto el número total de proteínas secretadas podría eventualmente ser mayor que el predicho por nuestros análisis.

La proteína AInA es la responsable de la mayor actividad del complejo alasan de *A. radioresistens* K53 y se encontró en los sobrenadantes de cultivo de otras bacterias del género *Acinetobacter*, por lo que se propone que representaría un mecanismo general de emulsificación de compuestos hidrofóbicos en este género de bacterias (Toren y col. 2001, Walzer y col., 2006). Interesantemente, el ortólogo de esta proteína se encontró presente en mayores niveles en preparaciones de membrana de *A. radioresistens* S13 cuando ésta se creció en ácido benzoico y fenol como únicas fuentes de carbono y energía, respecto a su crecimiento sólo en acetato (Pessione y col., 2003). Como el ácido benzoico es un intermediario de la degradación del bifenilo, estos antecedentes nos motivaron a buscar esta proteína en bacterias que metabolizan este compuesto y así encontrar una posible función en la emulsificación de los PCBs.

La AInA de *A. radioresistens* K53 contiene cuatro "loops" hidrofóbicos (HL) que previamente se identificaron como esenciales para emulsificar una mezcla de hexadecano y metilnaftaleno (Toren y col., 2002). Estos "loops" presentan un alto grado de conservación

en las proteínas ortólogas de dos bacterias del género *Acinetobacter* (*Acinetobacter* sp. V-26 y *Acinetobacter* sp. ADP1). Como ya se mencionó, al igual que la AInA de *A. radioresistens* KA53, estas proteínas se encontraron en los sobrenadantes de cultivo de estas bacterias y presentan actividad emulsificante (Walzer y col., 2006). La búsqueda *in silico* reveló información sobre la similitud de secuencias de estas proteínas en *B. xenovorans* LB400. De las seis proteínas que se encontraron por el análisis *in silico*, la que presentó un alto porcentaje de identidad con respecto a AInA de *A. radioresistens* K53 sólo comparte dos módulos necesarios para emulsificar. Esta proteína está anotada como proteína de membrana externa de la familia OmpA/MotB, y no descartamos que en efecto estas dos zonas sean necesarias para la actividad emulsificante o que presente otras zonas que reemplacen a las presentes en la AInA. Sugerimos que estudios estructurales serán necesarios para aclarar la función de este ortólogo en *B. xenovorans* LB400.

4.5. Caracterización de proteínas extracelulares de *B. xenovorans* LB400 crecida en medio definido suplementado con glucosa, bifenilo o ácido benzoico como únicas fuentes de carbono y energía.

Un análisis general de los geles provenientes de los extractos solubles de esta bacteria indica que como se esperaba, la fracción extracelular presentó un número reducido de proteínas comparada con las proteínas provenientes desde los extractos solubles (Figura 23). En términos generales, encontramos alrededor de 200 manchas en los geles teñidos con plata las que fueron analizadas por el programa Quantity One de Biorad.

Aunque no realizamos un análisis extensivo de todas las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo, al momento de secuenciar las proteínas correspondientes a las manchas de proteínas más intensas, verificamos que la mayoría de ellas presentaron señales de secreción, utilizando para ello la base de datos obtenidas en el análisis *in silico*. Este resultado, muestra que en efecto los sobrenadantes de cultivo de *B. xenovorans* LB400

contienen proteínas que pudiesen ser secretadas por algunos de los mecanismos de secreción descritos en bacterias Gram-negativas. El análisis con un segundo servidor, tal como el Cello, permitió ratificar la secreción de ellas y más aún su posible localización celular.

Con respecto a este punto, Riedel y col. (2005) comunicó el análisis de las proteínas intracelulares, unidas a membrana y extracelulares de *B. cenocepacia* H1111 crecida hasta fase exponencial en un medio rico. Este grupo encontró 304 manchas que correspondieron a 51 proteínas distintas utilizando el mismo rango de anfolitos que nuestro estudio. Según el servidor SubCell, 29 de estas proteínas presentaron señales de secreción y 22 presentaron localización citoplásmica. Además, 15 de estas 51 proteínas se encontraron exclusivamente en la fracción extracelular. Cabe destacar que dentro de la lista de proteínas extracelulares se encontraron algunas proteínas sin señal de secreción que comúnmente se encuentran en las fracciones extracelulares de otros microorganismos, como GroEL, el factor de elongación Tu y proteínas ribosomales (Riedel y col., 2005; Kazemi-Pour y col., 2004; Kim y col., 2002). GroEL y el factor de elongación Tu, entre otras proteínas, son las más abundantes en las células por lo que la explicación más probable para que estas proteínas se encuentren en las fracciones extracelulares es la lisis de la bacteria. Cuatro de las proteínas secuenciadas desde los sobrenadantes de cultivo presentan localización citoplásmica según nuestro análisis *in silico*. No descartamos que al igual que en los casos anteriores, estas se secreten por un mecanismo alternativo o estén en el medio extracelular debido a ruptura celular.

Con respecto a este último punto, ¿cómo se podría explicar la presencia de proteínas sin señal de secreción (citoplásmicas) en el espacio extracelular? Como se mencionó anteriormente, una posibilidad se deba a la autólisis inherente cuando la célula entra a la fase estacionaria. Sin embargo ya se han descrito varios casos de proteínas que a

pesar de no tener una clara señal de secreción son encontradas en las fracciones extracelulares, lo que sugiere la presencia de mecanismos alternativos de secreción.

En bacterias Gram-positivas, tal como el caso de la bacteria patógena *Mycobacterium tuberculosis*, se ha descrito el caso de la secreción de las proteínas GlnA y SodA. GlnA es la glutamina sintetasa, la que cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato e ión amonio. GlnA presenta localización citoplásmica en *M. tuberculosis* y en la bacteria no patogénica *M. smegmatis*, sin embargo se ha encontrado también en el medio extracelular en *M. tuberculosis*. Por otra parte, cuando la GlnA de *M. tuberculosis* se expresó de forma recombinante en *M. smegmatis*, esta proteína de igual forma fue secretada, indicando que la señal de exportación se encuentra dentro de la proteína (Harth y col., 1994 y 1997). Por otra parte, la superóxido dismutasa (SodA) es una proteína que comúnmente se encuentra en el citoplasma de *M. tuberculosis*. También se ha descrito como una proteína secretada a pesar de no tener un péptido señal. Al igual que el caso de la proteína GlnA de *M. smegmatis*, SodA no es secretada en este microorganismo (Harth y Horwitz, 1999).

En el caso de *B. subtilis* se ha realizado un extensivo análisis de las proteínas extracelulares, lográndose identificar alrededor de 24 proteínas que no contienen péptido señal. Estas incluyen a una chaperona involucrada en el plegamiento de las proteínas exportadas, proteínas involucradas en metabolismo de carbohidratos (Eno, PdhB, PdhD y CitH), proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos (RocA y RocF), proteínas relacionadas con motilidad y quimiotaxis (Hag, FlgK y FliD) y proteínas involucradas en destoxificación (KatA y SodA) (Tjalsma y col., 2004).

En *E. coli*, se ha comunicado el caso de la proteína ClyA (una proteína que forma poros y muestra un efecto citotóxico en células de mamíferos) la que es liberada al medio extracelular mediante vesículas que se desprenden de la membrana externa (Wai y col., 2003).

Cuando caracterizamos las proteínas extracelulares de *B. xenovorans* LB400, encontramos a una proteína hipotética cuya secuencia aminoacídica reveló que ella pertenece a la superfamilia de las proteínas YceI. Analizando en detalle su secuencia aminoacídica, esta presentó un péptido señal del tipo sec, lo que sugiere que esta proteína es en efecto secretada.

Esta proteína inicialmente se encontró inducida en extractos citoplásmicos de *E. coli* cuando esta crece a pH alcalinos (Stancik, y col. 2002). Posteriormente, se encontró inducida en extractos citoplásmicos de *Delftia acidovorans* MC1 crecida en ácido 2,4-diclorofenoxipropionico (2,4-DCPP), un conocido herbicida cuya estructura química es similar a la del ácido benzoico (Benndorf, y col. 2004). Handa y col. (2005), obtuvo la estructura cristalográfica de YceI de *T. thermophilus* HB8 purificada de *E. coli*. Esta proteína fue cristalizada en presencia de una molécula de octaprenilpirofosfato, molécula involucrada en la biosíntesis de ubiquinonas. Esta proteína presenta una estructura que consiste de un barril beta de ocho hebras antiparalelas en cuyo centro alberga residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas que interaccionan con la cadena de poliisoprenoide (de 40 átomos de carbono) vía interacciones hidrofóbicas. Lo más interesante es que la estructura de YceI es similar a las estructuras que presentan la familia de las lipocalinas, proteínas encargadas de unir y transportar un amplio espectro de moléculas hidrofóbicas tales como las feromonas, entre otras (Flower, D. L., 1996; Handa y col., 2005).

Un análisis más detallado del contexto genómico de esta proteína indicó que su gen (BxeB_2066) se encuentra duplicado en el genoma de la *B. xenovorans* LB400. Además se encontraron otras tres posibles copias de genes que codifican para proteínas pertenecientes a la superfamilia de las YceI. Sin embargo, desconocemos si estos cuatro genes producen proteínas funcionales. Todas las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las YceI de *B. xenovorans* LB400 presentan péptido señal del tipo sec, lo que sugiere que al igual que la

proteína codificada por el gen Bxe_B2066 son de igual forma secretadas. Sería interesante estudiar si es que estos genes se expresan en forma diferencial, ya sea en respuesta al crecimiento en diferentes sustratos de tipo aromático o dependientes de la fase crecimiento.

Con respecto a este último punto, hay que destacar que *B. xenovorans* LB400 presenta una gran variedad de oxigenasas y proviene de un grupo filogenético de bacterias comúnmente aisladas desde rizosferas y suelos donde existe una gran variedad de compuestos aromáticos de origen natural. Además, presenta vías metabólicas para la degradación de una gran variedad de otros xenobióticos tales como fluoreno, 1,2 dicloroetano, nitrobenceno entre otros. No descartamos que el conjunto de proteínas de la familia YceI presentes en *B. xenovorans* LB400 pudiese estar involucrada en el transporte de estos tipos de compuestos tanto de origen natural como de origen antropogénico.

Por otra parte, las copias parálogas de estos genes se encuentran anteceditas por un gen que codifica para un posible citocromo b561, un componente de la cadena respiratoria, por lo que las proteínas de la familia YceI en esta bacteria pudiesen, tal como fue reportado originalmente, estar formando parte del metabolismo de las quinonas, las que participan en transporte de electrones de la cadena respiratoria (Handa y col., 2005). La inducción de la expresión de estas proteínas en estas condiciones estaría relacionada posiblemente a estrés de carácter nutricional u oxidativo que se dan en estas condiciones (Chávez y col., 2004, Agullo y col., 2007). No descartamos que esta proteína presente a su vez una doble función, en especial en el metabolismo de la molécula de bifenilo, PCBs y/o intermediarios de la degradación, la que pudiese estar involucrada en el transporte o almacenamiento de este tipo de moléculas hacia o desde la membrana externa de la célula. Nuestra proteína contiene residuos de carácter apolar que podrían interactuar con las moléculas hidrofóbicas tales como los PCBs (Figura 26). Estudios de modelamiento molecular de los PCBs interactuando con los residuos hidrofóbicos dentro del barril de la proteína YceI serán

necesarios para aclarar este punto. Además, serán necesarios los estudios de la afinidad de las moléculas de PCBs hacia la proteína nativa o hacia la proteína YceI recombinante. Con estos estudios aclararemos la función de esta proteína en el metabolismo de bifenilo y/o de los PCBs.

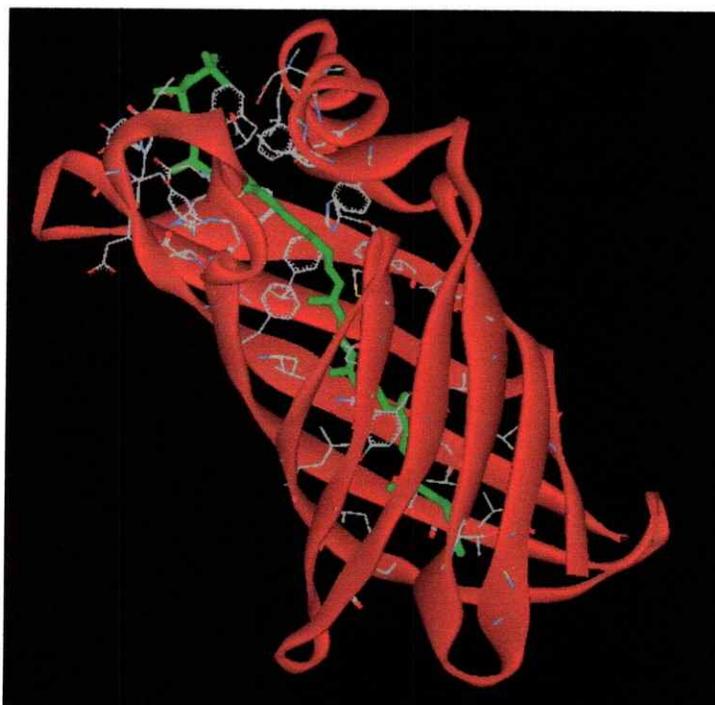


Figura 26. Modelo tridimensional de la proteína YceI de *B. xenovorans* LB400 acomplexada con un ligando. La proteína se modeló utilizando los modelos creados a partir de las estructuras cristalográficas de las proteínas YceI de *T. thermophilus* (PDB: 1WUB) y de *E. coli* (PDB: 1YOG). La proteína YceI de *B. xenovorans* LB400 se modeló con una molécula de octaprenilpirofosfato (40 átomo de carbono) ubicada en el interior del barril (verde). Dentro del barril e interactuando con la molécula de octaprenilpirofosfato se muestran los residuos de carácter apolar que interactúan con el sustrato.

Los resultados de esta tesis sugieren que las bacterias degradadoras de PCBs secretarían algunas proteínas necesarias para la interacción de la bacteria con el compuesto a degradar. Esta interacción sería facilitada por los procesos de movilidad y quimiotaxis hacia estos tipos de compuestos. Posiblemente en estas interacciones se generen metabolitos tóxicos que provoquen la lisis de la bacteria y es un elemento a considerar al pensar en utilizar a estas bacterias en un procesos de biorremediación. Podríamos visualizar un escenario en el cual las bacterias degradadoras de PCBs migrarían hacia zonas contaminadas con PCBs y en estas zonas secretarían proteínas de interacción sustrato-bacteria y con ello facilitar la biorremediación. El estudio de estas interacciones y la selección de bacterias móviles y quimiotácticas hacia PCBs son dos temas de gran importancia en el proceso de biorremediación (Figura 27).

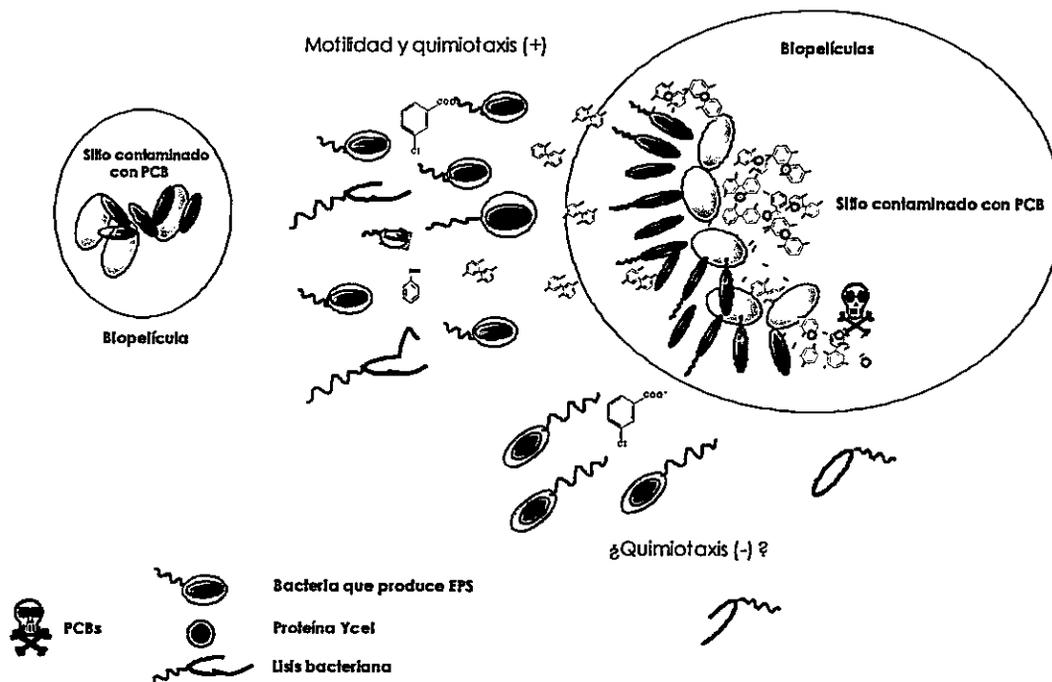


Figura 27. Posibles funciones de la quimiotaxis y de los biosurfactantes (proteicos o de carácter polisacárido) en la interacción de las bacterias degradadoras con los PCBs (Adaptado de Chávez, y col., 2006).

5. CONCLUSIONES.

1. Los ensayos de movilidad mostraron que la bacteria *Pseudomonas* sp. B4 es más móvil que la bacteria modelo *B. xenovorans* LB400.
2. *Pseudomonas* sp. B4 presentó quimiotaxis hacia bifenilo, congéneres y un intermediario de la degradación de bifenilo; el ácido benzoico.
3. El intermediario de la degradación de 3-clorobifenilo; el 3-clorobenzoato, es tóxico para la bacteria *Pseudomonas* sp. B4.
4. Se observó un posible EPS que es sintetizado por *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* LB400. Este EPS contiene los azúcares glucosa y galactosa en *B. xenovorans* LB400 y glucosa, galactosa y manosa en *Pseudomonas* sp. B4.
5. Los componentes del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas* sp. B4 y *B. xenovorans* crecidas en las tres condiciones de cultivo, carecen de actividad emulsificante hacia compuestos hidrofóbicos.
6. Por análisis *in silico* del proteoma de la *B. xenovorans* LB400, se obtuvo que cerca de un 13,4 % es putativamente secretado por los sistemas de secreción de membrana interna y por los sistemas no clásicos de secreción.
7. Por análisis de comparación de secuencias se encontró un posible ortólogo de la proteína AInA de *A. radioresistens* K53 codificado en el genoma de *B. xenovorans* LB400. Esta proteína no contiene todos los módulos necesarios para la emulsificación que están presentes en AInA.
8. Por análisis de geles bidimensionales y espectrometría de masas aislamos 14 proteínas mayoritarias desde los sobrenadantes de cultivo de las células de *B. xenovorans* LB400 crecidas en los tres medios de estudio. El análisis de la secuencias aminoacídicas de estas proteínas mostró que 8 de ellas presentaron señales de secreción.

9. El análisis de la expresión diferencial mostró que las proteínas que se encuentran inducidas en bifenilo y en ácido benzoico respecto a las que se encuentran en glucosa son tres enzimas del locus *bph*, dos proteínas periplásmicas de unión a ligando, una enzima que involucrada en la degradación de ácido benzoico, una proteína hipotética y una flavodoxina.

10. La proteína hipotética pertenece a la superfamilia de las YceI. Esta proteína presenta una masa molecular de 21 kDa, y un punto isoeléctrico de 7,3. Además, presentó un péptido señal de tipo sec el que teóricamente presentaría 22 residuos, generando una proteína madura de 18,8 kDa con un punto isoeléctrico de 6,3. La estructura tridimensional de la proteína YceI sugiere que estaría involucrada en el transporte o en almacenaje de compuestos de carácter hidrofóbico como bifenilo, PCBs y/o intermediarios.

6. REFERENCIAS.

- Agullo, L., Cámara, B., Martínez, P. Latorre V. y Seeger, M. 2007. Response to (chloro)biphenyls of the polychlorobiphenyl-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins also induced by heat shock and oxidative stress. FEMS Microbiol. Lett. 267:167-175.
- Alexander, R. P. y Zhulin. I. B. 2007. Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 2885-2890.
- Altschul, S., Gish, W., Millar, W., Myers, E. y Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Al-Tahhan, R., A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. y Maier, R. M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 66:3262-3268.
- Andrade, S. L., Patridge, E. V., Ferry, J. G. y Einsle, O., 2007. Crystal structure of the NADH:quinone oxidoreductase WrbA from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 189:9101-9107.
- Antelmann, H., Tjalsma, H., Voigt, B., Ohlmeier, S., Bron, S., van Dijk, J. M. y Hecker, M. 2001. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. Genome Res. 11:1484-1502.
- Bach, H., Berdichevsky, Y. y Gutnick, D. 2003. An exocellular protein from oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. Appl. Environ. Microbiol. 69:2608-2615.
- Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausbøll, A. y Brunak S. 2004. Non-classical protein secretion in bacteria. BMC Microbiol. 150:1005-1014.
- Benndorf D, Davidson I, Babel W. 2004. Regulation of catabolic enzymes during long-term exposure of *Delftia acidovorans* MC1 to chlorophenoxy herbicides. Microbiology. 150:1005-1014
- Bekerman, R., Segal, G., Ron, E. Z. y Rosenberg, E. 2005. The AlnB protein of the bioemulsan alasan is a peroxiredoxin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:536-541.
- Beyersdorf-Radeck, B., Riedel, K., Karlson, U., Bachmann, T. T., y Schmid, R. D. 1998. Screening of xenobiotic compounds degrading microorganisms using biosensor techniques. Microbiol. Res. 153:239-245.
- Billingsley, K. A., Backus, S. M. y Ward, O. P. 1999. Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* LB400. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:255-260.
- Bopp, L. H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. J. Ind. Microbiol. 1:23-29.

- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bugg, T. D. H. y Winfield, C. 1998. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Nat. Prod. Rep.* 15:513-530.
- Bylund, J., Burgess, L. A., Cescutti, P., Ernst, R. K. y Speert, D. P. 2006. Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 281: 2526-2532.
- Camara, B., Herrera, C., Gonzalez, M., Couve, E., Hofer, B. y Seeger, M. 2004. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Environ. Microbiol.* 6:842-850.
- Caldwell, R. B. y Lattemann, C. T. 2004. Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:610-612.
- Chavez, F. P. Lünsdorf, H. y Jerez, C. A. 2004. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3064-3072.
- Chavez, F. P. Gordillo, F. y Jerez, C. A. 2006. Adaptive responses and cellular behavior of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnol. Adv.* 24:309-320.
- Colores, G. M., Macur, R. E., Ward, D. M. y Inskeep, W. P. 2000. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2959-2964.
- Denef, V. J., Patrauchan, M. A., Florizone, C., Park, J., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Tiedje, J. M. y Eltis, L. D. 2005. Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J. Bacteriol.* 187:7996-8005.
- Desai, J. D. y Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:47-64.
- Ferrer, M., Golyshin, P. y Timmis, K. N. 2003. Novel maltotriose esters enhance biodegradation of Aroclor 1242 by *Burkholderia cepacia* LB400. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:637-643.
- Flower, D. L. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318:1-14.
- Friedman, L. y Kolter, R. 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* 186:4457-4465.

- Furukawa, K., Suenaga, H. y Goto, M. 2004. Biphenyl dioxygenases: functional versatilities and directed evolution. *J. Bacteriol.* 186:5189-5196.
- Gibson D. T. y Parales R. E. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:236-243.
- Golyshin, P. N., Fredrickson, H. L., Giuliano, L., Rothmel, R., Timmis, K. N. y Yakimov, M. M. 1999. Effect of novel biosurfactants on biodegradation of polychlorinated biphenyls by pure and mixed bacterial cultures. *New. Microbiol.* 22:257-267.
- Gonzales, R. M., Godoy, A. P. Alamos, M., Bassat A. B. y Ramos, J. L. 2001. Physiological characterization of *Pseudomonas putida* DOT-T1E tolerance to *p*-hydroxybenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4338-4341.
- Gordillo, F. Chavez, F. P. and Jerez, C. A. 2007. Motility and chemotaxis of *Pseudomonas* sp. B4 towards polychlorobiphenyls and chlorobenzoates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60:322-328.
- Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen III, J. F., Tiedje, J. y Bañadme, P. 2004. Classification of the PCB- and biphenyl degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Inte. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1677-1681.
- Govan, J. R. W. y Deretic, V. 1996. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60:539-574.
- Grimm, A. C. y Harwood, C. S. 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4111-4115.
- Grimm, A. C. y Harwood, C. S. 1999. NahY, a Catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *J. Bacteriol.* 181:3310-3316.
- Handa, N., Terada, T., Doi-Katayama, Y., Hirota, H., Tame, J. R., Park, S. Y., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., Yokoyama, S. 2005. Crystal structure of a novel polyisoprenoid-binding protein from *Thermus thermophilus* HB8. *Protein Sci.* 14:1004-1010.
- Harth, G. y Horwitz, M. A. 1999. Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. A model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 274: 4281-4292.
- Harwood, C. S., Rivelli, M. y Ornston, L. N. 1984. Aromatic acids are chemoattractants for *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 160:622-628.
- Harwood, C. S., Parales, R. E. y Dispensa, M. 1990. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward chlorinated benzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:263-287.
- Harwood, C. S., Nichols, N. N., Kim, M-K., Ditty, J. L. y Parales, R. E. 1994. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* 176:6479-6488.

- Hassette, D. J. Scheweizer, H. P. y Onman, D. E. *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* Mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *J. Bacteriol.* 177: 6330–6337.
- Hawkins, A. C. y Harwood, C. S. 2002. Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:968-972.
- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Anzai, H., Nakajima, M., y Harayama, S. 2000. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5073-5077.
- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Urai, M., Itoh, C., Anzai, H., Nakajima, M., y Harayama, S. 2002. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. 68:2337-2343.
- Kaczynski, Z., Karapetyan, G., Evidente, A., Iacobellis, N. S. y Holst, O. 2006. The structure of a putative exopolysaccharide of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola*. *Carbohydr. Res.* 341:285-288.
- Kaplan, N., Zosim, Z., y Rosenberg, E. 1987. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:440-446.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G. y Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2004. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics.* 4: 3177–3186.
- Kim, N., Weeks, D. L. Shin, J. M. Scott, D. R. Young, M. K. y Sachs, G. 2002. Proteins released by *Helicobacter pylori*. in vitro. *J. Bacteriol.* 184:6155–6162.
- Kostakioti, M., Newman, C. L., Thanassi, D. G. y Stathopoulos, C. 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* 187:4306-4314.
- Lacour, S., y Landini, P. 2004. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bacteriol.* 186:7186-7195
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Law, A. M. y Aitken, M. D. 2003. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5968-5973.
- Lelong, C., Aguiluz, K., Luche, S., Kuhn, L., Garin, J., y Rabilloud, T. 2007. The Crl-RpoS regulon of *Escherichia coli*. *Mol. Cell Proteomics.* 6:648-659.
- Marx, R. B. y Aitken, M. D. 2000. Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogenous aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* 34:3379-3383.
- Mazumder, R., Phelps, T. J., Krieg, N. R. y Benoit, R. E. 1999. Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. *J. Microbiol. Meth.* 37:255-263.

- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut.* 133:183-198.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z. y Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3240-3244.
- Neu, T. R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interreaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60:151-166.
- Nielsen, A. T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K. B y Molin, S. 2000 Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ. Microbiol.* 2:59-68.
- Ng, T. K. y Hu, W. S. 1989. Adherence of emulsan-producing *Acinetobacter calcoaceticus* to 21 hydrophobic liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 480-485.
- Ohtsubo, Y., Kudo, T., Tsudo, M., y Nagata, Y. 2004. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62:250-258.
- O'Farrell P. Z., Goodman, H. M., y O'Farrell, P. H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell.* 12:1133-1141.
- Pallen, M. J., Chaudhuri, R. R., y Henderson, I. R. 2003. Genomic analysis of secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:519-527.
- Pandey, G. y Jain, R. 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:5789-5795.
- Parales, R. E. y Harwood, C. S. 2002. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:266-273.
- Parnell, J. J. Park, J. Denef, V., Tsoi, T. Hashsham, S. Quensen III, J. y Tiedje, J. M. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6607-6614.
- Pessione, E., Giuffrida, M. G., Prunotto, L., Barello, C., Mazzoli, R., Fortunato, D., Conti, A., y Giunta, C. Membrane proteome of *Acinetobacter radioresistens* S13 during aromatic exposure. 2003. *Proteomics.* 3: 1070-1076.
- Philp, J. C., Bamforth, S. M., Singleton, I. y Atlas, R. M. 2005. En: Atlas, R. M. y Philp, J. (ed) *Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup.* p. 1-48. 1st ed. ASM Press, Washington, D. C.
- Pieper, D. H. y Reineke, W. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:262-270.
- Pieper, D. H. 2005. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:170-191.

- Pines, O., Bayer, E. A. y Gutnick, D. L. 1983. Localization of emulsan-like polymers associated with the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 154: 893-905.
- PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 1999. Guidelines for the identification of PCBs and materials containing PCBs.
- Potrawfke, T., Löhnert, T. H. Timmis, K., y Wittich, R. M. 1998. Mineralization of low-chlorinated biphenyls by *Burkholderia* sp. strain LB400 and by two-membered consortium upon directed interspecies transfer of chlorocatechol pathway genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:440-446.
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M. T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M. I., Rojas, A., Teran, W., y Segura, A. 2002. Mechanism of solvent tolerance in gram-negative bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 56:743-768.
- Rashid, M. H. y Kornberg, A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 97:4885-4890.
- Riedel, K., Carranza, P., Gehrig, P., Potthast, F., y Eberl, L. 2006. Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: setting up a 2-DE reference map. Proteomics. 6:207-216.
- Roberts., I. S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 50:285-315.
- Robinson, K. G., Ghosh, M. y Shi, Z., 1996. Mineralization enhancement of non-aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactant. Wat. Sci. Technol. 34:303-309.
- Ron, E., Z. y Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. Environ. Microbiol. 3:229-236.
- Ron, E., Z. y Rosenberg, E. 2002. Biosurfactant and oil bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 13:249-252.
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., y Gutnick, D. L. 1979a. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. 37:402-408.
- Rosenberg, E., Perry, A., Gibson, D. T., y Gutnick, D. L. 1979b. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. 37:409-413.
- Rosenberg, E., y Ron, E. Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. 52:154-162.
- Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D. J. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol. 10(6):644-648.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold spring Harbor, N. Y.

- Sharma, N. K. Pandey, J. Gupta, N. y Jain, R. K. 2007. Growth and physiological response of *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 toward higher concentrations of *o*-nitrobenzoate ad *p*-hydroxybenzoate. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:65-70.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., y Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.
- Sikkema, J. de Bont., A. M. J. y Poolman, B. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201-222.
- Singh, A., Van Hamme, J. D., y Ward, O. P. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. 25:99-121.
- Stancik, L., M., Stancik, D. M., Schmidt, B., Barnhart, D. M. Yoncheva, Y. N. y Slonczewski, J. L. 2002. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:4246-4258.
- Stelmack, P., Gray, M. R. y Pickard, M. A. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:163-168.
- Stock, J. B. y Surette, M. G. 1996. Chemotaxis. En: Neidhardt, F. C. Curtis III R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter M. y Umberger, H. E. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. p. 1103-1129. 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J. Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., Kuipers, O. P., Bron, S., y Hecker, M., van Dijk, J. M. 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:207-233.
- Toren, A., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z., y Rosenberg, E. 2001. Emulsifying activities of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1102-1106.
- Toren, A., Orr, E., Paitan, Y., Ron, E., Z. y Rosenberg, E. 2002a. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. *J. Bacteriol.* 184:165-170.
- Toren, A., Ron, E. Z., Bekerman, R., y Rosenberg, E. 2002b. Solubilization of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bioemulsifier AlnA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:580-584.
- Toren, A., Segal G., Ron, E. Z. y Rosenberg, E. 2002c. Structure–function studies of the recombinant protein bioemulsifier AlnA. *Environmental Microbiology.* 4:257–261.
- Walzer, G., Rosenberg, E. y Ron, E. Z. 2002. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. *Environ. Microbiol.* 5:257–261.
- Watt, S. A. Wilke, A., Patschkowski, T., y Niehaus, K. 2005. Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* B100. *Proteomics.* 5:153-167.

Yang, W., Ni, L. y Somerville R. L. 1993. A stationary-phase protein of *Escherichia coli* that affects the mode of association between the trp repressor protein and operator-bearing DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 90:5796-5800.

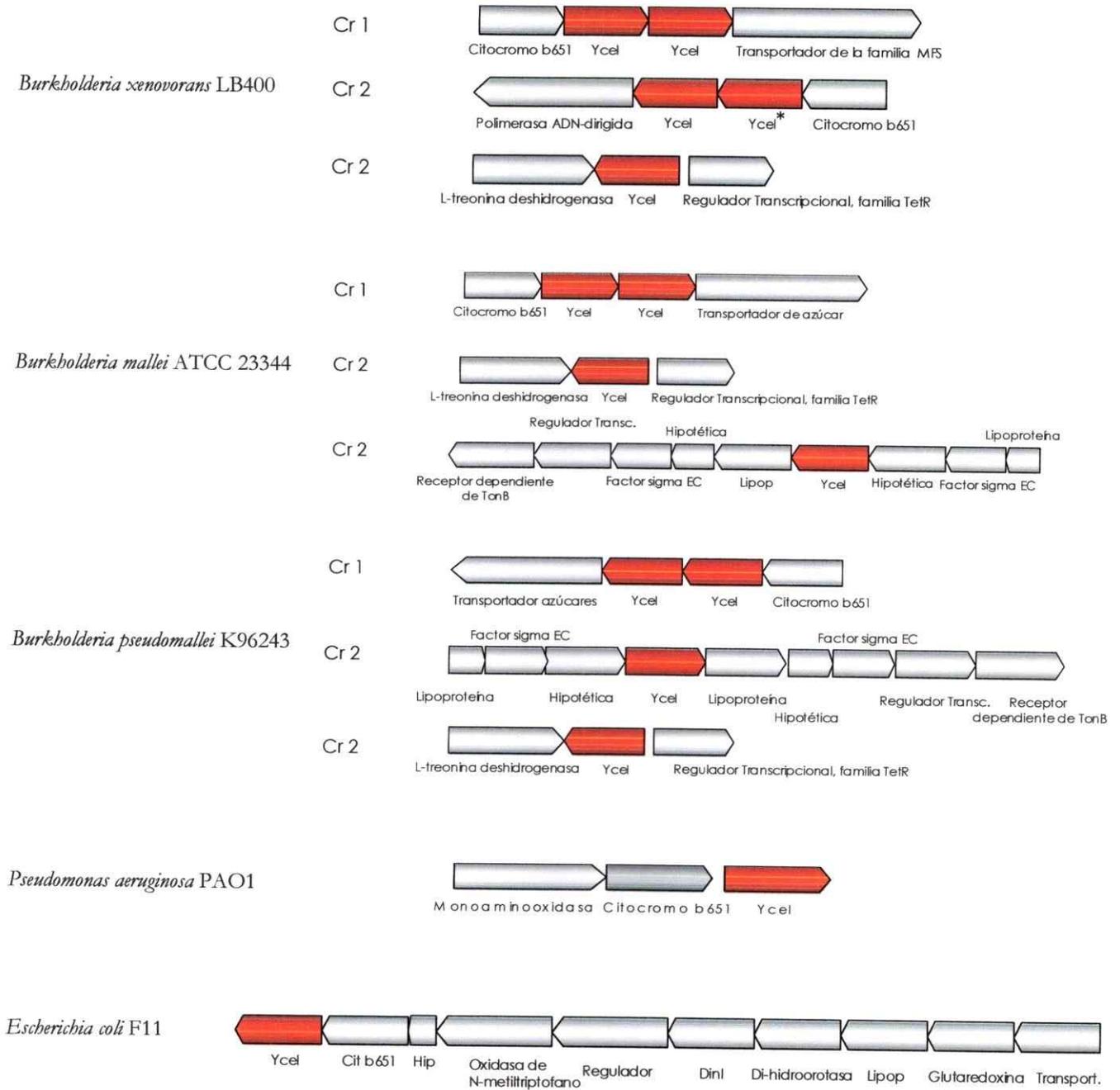
Yu, C. S, Lin, C. J., y Hwang, J. K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. 2004. Protein Science. 13:1402-1406.

Zinser, E. R., Schneider, D., Blot, M., y Kolter, R. 2003. Bacterial evolution through the selective loss of beneficial genes. Trade-offs in expression involving two loci. Genetics. 164:1271-1277.

Zuckerberg, A., Diver, A., Peeri, Z., Gutnick, D. L, y Rosenberg, E. 1979. Appl. Environ. Microbiol. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. 37:414-420.

ANEXO I

Contextos genéticos de la proteína YceI en *B. xenovorans* LB400 y en otras bacterias Gram-negativas



*: Proteína secuenciada desde los sobrenadantes de cultivo. Cr: cromosoma.

Lista de posibles proteínas secretadas por *B. xenovorans* LB400

GEN	CATEGORIA	pI	MM	ANOTACION
Bxe_A0019	<SIGNALP>	8.6	43545	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0023	<SIGNALP>	8.9	41217	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0024	<SIGNALP>	8.4	40546	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0043	<SIGNALP>	7.8	29154	Ciclohexanil deshidratasa
Bxe_A0050	<SIGNALP>	8.9	40392	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0055	<SIGNALP>	8.8	41693	Proteína hipotética
Bxe_A0058	<LIPOP>	6.9	12546	Lipoproteína
Bxe_A0061	<SECRETOMEP>	6.2	29772	Proteína de la familia de citocromo c
Bxe_A0067	<TAIP>	11.9	23817	Transposasa IS4
Bxe_A0088	<SIGNALP>	8.2	18884	Proteína hipotética
Bxe_A0092	<SIGNALP>	8.7	35742	Proteína hipotética
Bxe_A0102	<SIGNALP>	3.9	49184	Proteína flagelar asociada al hook; FliD
Bxe_A0103	<SECRETOMEP>	4.3	38103	Flagelina
Bxe_A0109	<SIGNALP>	8.9	10900	Proteína hipotética
Bxe_A0127	<SIGNALP>	10.1	18094	Proteína hipotética
Bxe_A0128	<LIPOP>	4.7	43034	Proteína hipotética
Bxe_A0132	<SECRETOMEP>	6.2	68874	Regulador de la biosíntesis del flagelo; FliH
Bxe_A0134	<SIGNALP>	9.2	35693	Factor sigma de la biosíntesis flagelar
Bxe_A0138	<SECRETOMEP>	6.1	11700	Factor Anti-Sigma-28; FliM
Bxe_A0139	<SECRETOMEP>	10.9	50211	Proteína del cuerpo basal flagelar (anillo P)
Bxe_A0140	<SECRETOMEP>	5.0	16952	Proteína del cuerpo basal flagelar; FlgB
Bxe_A0141	<SIGNALP>	5.1	14490	Proteína del cuerpo basal flagelar; FlgC
Bxe_A0142	<SECRETOMEP>	3.8	23711	Proteína "capping" del flagelo
Bxe_A0144	<SIGNALP>	4.2	26074	Proteína del cuerpo basal flagelar; FlgF
Bxe_A0145	<SIGNALP>	4.5	27507	Proteína del cuerpo basal flagelar; FlgG
Bxe_A0146	<SIGNALP>	9.2	24772	Proteína del cuerpo basal flagelar (anillo L)
Bxe_A0147	<SIGNALP>	9.6	40918	Proteína del cuerpo basal flagelar (anillo P)
Bxe_A0148	<SIGNALP>	9.2	34604	Hidrolasa del peptidoglicano
Bxe_A0150	<SIGNALP>	4.2	66631	Proteína del cuerpo basal flagelar; FlgK
Bxe_A0159	<SIGNALP>	6.1	17833	Proteína del cuerpo basal flagelar; FliL
Bxe_A0161	<SIGNALP>	4.7	46654	Proteína del control de la longitud del hook
Bxe_A0171	<SIGNALP>	4.9	12795	Proteína de la biosíntesis del flagelo; FliH
Bxe_A0181	<SIGNALP>	7.5	60770	Transportador ABC de dipeptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0198	<LIPOP>	8.4	72766	Transglucosilasa
Bxe_A0226	<SIGNALP>	5.9	28670	Proteína hipotética
Bxe_A0234	<SIGNALP>	9.2	11149	Proteína hipotética
Bxe_A0239	<SIGNALP>	8.7	10028	Proteína periplásmica de unión a mercurio
Bxe_A0242	<LIPOP>	7.1	18004	Proteína hipotética
Bxe_A0260	<LIPOP>	10.2	11709	Proteína hipotética
Bxe_A0262	<SIGNALP>	9.0	22402	Proteína hipotética
Bxe_A0263	<LIPOP>	5.7	23514	Lipoproteína
Bxe_A0273	<SIGNALP>	9.1	28885	Porina de membrana externa, familia OmpW
Bxe_A0274	<LIPOP>	4.7	42622	Lipoproteína
Bxe_A0275	<LIPOP>	5.0	47334	Lipoproteína
Bxe_A0278	<SECRETOMEP>	6.1	19967	Flavoproteína. NADPH oxiquinona reductasa

Bxe_A0279	<SIGNALP>	8.4	21067	Proteína de la familia PBP
Bxe_A0297	<SIGNALP>	8.5	44617	Lipasa acilhidrolasa
Bxe_A0346	<SIGNALP>	9.1	22646	Citocromo c, clase I
Bxe_A0352	<LIPOP>	8.0	10850	Lipoproteína
Bxe_A0358	<SIGNALP>	5.8	59073	Fimbria del tipo 4, tipo PilQ
Bxe_A0363	<SIGNALP>	7.8	25733	Protina de membrana externa, familia OmpW
Bxe_A0372	<SIGNALP>	6.6	45822	Histidina quinasa
Bxe_A0375	<SIGNALP>	8	6669	Lipoproteína
Bxe_A0376	<SIGNALP>	8.4	25278	Proteína hipotética
Bxe_A0377	<LIPOP>	7.8	22781	Proteína del cuerpo basal flagelar del anillo L
Bxe_A0379	<SIGNALP>	9.1	23017	Proteína hipotética
Bxe_A0380	<SIGNALP>	6.2	16923	Proteína hipotética
Bxe_A0384	<SIGNALP>	8.5	9504	Proteína que transfiere azufre involucrada en la biosíntesis de tiamina
Bxe_A0389	<SIGNALP>	7.9	18546	Proteína involucrada en la tolerancia a tolueno tipo-Tig2C
Bxe_A0390	<SIGNALP>	5.9	36069	Lipoproteína de membrana, VacJ
Bxe_A0391	<SIGNALP>	9.5	24143	Transportador ABC involucrado en resistencia a solventes orgánicos, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0412	<SIGNALP>	5.6	42930	Sertina proteasa
Bxe_A0444	<SIGNALP>	9.4	10450	Proteína hipotética
Bxe_A0448	<SIGNALP>	8.9	47920	Transporte ABC de glicérol-3-fosfato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0449	<LIPOP>	8.3	34651	Glicerofosfol diester fosfodiesterasa, UgrQ
Bxe_A0453	<LIPOP>	8.7	25920	Proteína de intercambio tiol-disulfuro, DsbC
Bxe_A0456	<SIGNALP>	7.3	30199	Glicosilasa de uracilo
Bxe_A0465	<LIPOP>	8.9	39954	Transglucosilasa A unida a membrana de mucéina lítica
Bxe_A0475	<SIGNALP>	8.9	40223	Proteína de membrana externa (poina)
Bxe_A0479	<SIGNALP>	10.0	12778	Proteína de la división celular, FtsL
Bxe_A0489	<SIGNALP>	6.5	28251	Proteína de membrana de la división celular, FtsQ
Bxe_A0508	<SECRETOMEP>	10.8	9122	Proteína ribosomal L27
Bxe_A0511	<LIPOP>	5.6	20196	Lipoproteína
Bxe_A0525	<SIGNALP>	12.1	19748	Proteína histona HI-like
Bxe_A0526	<LIPOP>	9.1	15613	Lipoproteína de membrana externa, SlyB-like
Bxe_A0528	<SECRETOMEP>	5.3	17219	Tirol peroxidasa, Tpx
Bxe_A0534	<SIGNALP>	8.6	18864	Tetredoxina
Bxe_A0540	<SIGNALP>	9.9	27552	Glicosil transferasa, familia 51
Bxe_A0543	<SIGNALP>	6.3	36600	2-desidro-3-desoxigalactonato quinasa, DgoK-like
Bxe_A0546	<SIGNALP>	8.7	35061	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0549	<SIGNALP>	5.4	28375	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, FabG-like
Bxe_A0558	<SIGNALP>	11.9	12519	Proteína hipotética
Bxe_A0559	<SIGNALP>	9.8	15279	Ribonucleasa guanil-específica
Bxe_A0563	<TAIP>	11.8	23819	Transposasa, IS4
Bxe_A0572	<SECRETOMEP>	9.3	29618	Lipoproteína de membrana externa
Bxe_A0586	<SIGNALP>	4.8	454663	Proteína de superficie anclada a membrana, hemaglutinina
Bxe_A0587	<SECRETOMEP>	9.1	28618	Proteína de membrana externa, familia OmpA
Bxe_A0597	<SIGNALP>	8.9	32506	Transportador ABC de glutamato/aspartato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0640	<LIPOP>	8.7	13347	Proteína exportada
Bxe_A0650	<SIGNALP>	7.1	46617	Possible citocromo c
Bxe_A0651	<SIGNALP>	8.8	26286	Citocromo c periplásmico
Bxe_A0652	<SIGNALP>	7.6	13063	Proteína de resistencia a cobre, CopC

Bxe_A0654	<SIGNALP>	10.4	8632	Proteína hipotética
Bxe_A0661	<SIGNALP>	4.6	70739	Proteína hipotética
Bxe_A0663	<TATP>	5.5	76773	Fosfolipasa C
Bxe_A0664	<SIGNALP>	8.0	11744	Proteína hipotética
Bxe_A0680	<SIGNALP>	6.4	63885	Proteína hipotética
Bxe_A0696	<LIPOP>	6.3	42590	Lipasa / esterasa
Bxe_A0698	<SIGNALP>	7.9	55764	Peptidasa S13, D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa C
Bxe_A0701	<SIGNALP>	6.2	51588	Setina proteasa
Bxe_A0702	<SIGNALP>	9.6	17365	Proteína hipotética
Bxe_A0708	<LIPOP>	9.2	42373	Proteína de fusión de membrana, sistema de flujo RND
Bxe_A0710	<LIPOP>	5.1	55490	Lipoproteína de membrana externa, sistema de flujo RND
Bxe_A0717	<SIGNALP>	8.9	34672	Transportador ABC de Mn ²⁺ /Zn ²⁺ , proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0720	<SIGNALP>	8.7	47719	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0726	<SIGNALP>	9.2	19577	Proteína hipotética
Bxe_A0759	<SIGNALP>	11.7	9812	Proteína ribosomal S20
Bxe_A0769	<SECRETOMEP>	6.2	21445	Superoxido dismutasa
Bxe_A0773	<LIPOP>	8.3	18365	Proteína hipotética
Bxe_A0774	<TATP>	5.1	59092	Proteína hipotética
Bxe_A0785	<SIGNALP>	7.0	16902	Proteína hipotética
Bxe_A0794	<SIGNALP>	8.7	18231	Proteína hipotética
Bxe_A0795	<SIGNALP>	10.5	6013	Proteína hipotética
Bxe_A0821	<LIPOP>	6.2	41347	Proteína hipotética conservada
Bxe_A0832	<SIGNALP>	7.4	28598	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0836	<SIGNALP>	8.9	57099	Subunidad menor del ribosoma, pseudouridina sintasa, Rsu
Bxe_A0857	<TATP>	9.4	21373	Transportador ABC de péptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A0879	<LIPOP>	5.1	29857	Proteína hipotética
Bxe_A0881	<SECRETOMEP>	5.0	11559	Proteína hipotética
Bxe_A0883	<SIGNALP>	10.0	22285	Proteína hipotética
Bxe_A0889	<SECRETOMEP>	9.4	40968	Proteína hipotética
Bxe_A0910	<SIGNALP>	8.7	39952	Proteína hipotética
Bxe_A0912	<SIGNALP>	4.7	9321	Proteína hipotética
Bxe_A0915	<SIGNALP>	8.6	21161	Proteína de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A0924	<LIPOP>	9.3	25339	Proteína hipotética
Bxe_A0935	<SIGNALP>	9.6	24241	Lipoproteína de membrana
Bxe_A0939	<SIGNALP>	7.8	25112	Proteína hipotética
Bxe_A0943	<SIGNALP>	8.4	15829	Deshidrogenasa de cadena corta
Bxe_A0955	<SIGNALP>	7.3	26239	Exonucleasa, subunidad ATPasica
Bxe_A0960	<SIGNALP>	6.0	13994	Lipoproteína exportada
Bxe_A0968	<SIGNALP>	8.3	9224	Regulador transcripcional de la familia ArsR
Bxe_A0969	<SIGNALP>	7.9	12779	Proteína hipotética
Bxe_A0973	<SIGNALP>	9.3	23149	Lipoproteína
Bxe_A0975	<SIGNALP>	9.4	21593	Proteína de la membrana externa de la familia OmpA/MotB
Bxe_A0989	<SIGNALP>	10	12079	Proteína hipotética
Bxe_A0991	<SIGNALP>	7.8	44388	Transglucosilasa de mureína
Bxe_A0997	<SIGNALP>	9.3	28403	Transportador ABC de metionina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1007	<SECRETOMEP>	7.5	25729	Proteína que procesa el rRNA 16S
Bxe_A1023	<SIGNALP>	9.2	26968	Proteína hipotética

Bxe_A1024	<SIGNALP>	8.6	26056	Peptidasa
Bxe_A1025	<SIGNALP>	6.1	45273	Proteína hipotética
Bxe_A1026	<SIGNALP>	8.8	21018	Proteína hipotética
Bxe_A1027	<SIGNALP>	10.0	17426	Proteína hipotética
Bxe_A1028	<SIGNALP>	4.8	16679	Proteína hipotética
Bxe_A1032	<SIGNALP>	7.3	93842	Proteína de membrana rica en prolina
Bxe_A1034	<LIPOP>	8.2	4341	Proteína hipotética
Bxe_A1043	<SIGNALP>	9.6	15585	Proteína hipotética
Bxe_A1044	<SIGNALP>	9.7	9072	Proteína hipotética
Bxe_A1050	<SIGNALP>	8.9	16542	Proteína hipotética
Bxe_A1056	<SIGNALP>	5.7	53263	Proteína hipotética
Bxe_A1080	<SIGNALP>	8.9	38675	Proteína reguladora sigma E, MucB/RseB
Bxe_A1081	<SIGNALP>	6.8	53028	Proteína hipotética
Bxe_A1110	<SIGNALP>	6.3	13708	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1116	<SIGNALP>	7.1	36458	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1122	<SIGNALP>	9.6	53851	Proteína transposasa
Bxe_A1128	<SIGNALP>	9.3	34374	Transportador ABC de triacoxilato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1155	<SIGNALP>	5.5	55169	Sistema de flujo MFS, porina de membrana externa
Bxe_A1157	<LIPOP>	9.4	35978	Proteína de la superfamilia de los facilitadores mayores, proteína de fusión de membrana
Bxe_A1161	<SIGNALP>	7.0	37344	Proteína hipotética
Bxe_A1179	<SIGNALP>	7.0	49135	Proteína hipotética
Bxe_A1180	<SIGNALP>	6.6	34503	Proteína hipotética
Bxe_A1181	<SIGNALP>	8.2	16044	Proteína hipotética
Bxe_A1185	<SIGNALP>	8.2	16079	Proteína hipotética
Bxe_A1186	<SIGNALP>	5.3	49772	Proteína hipotética
Bxe_A1187	<SIGNALP>	6.0	33547	Proteína hipotética
Bxe_A1192	<SIGNALP>	8.7	13854	Proteína hipotética
Bxe_A1196	<SIGNALP>	9.3	19054	Proteína hipotética
Bxe_A1197	<SIGNALP>	10.1	21135	Proteína hipotética
Bxe_A1198	<SIGNALP>	9.0	26771	Proteína hipotética
Bxe_A1215	<SIGNALP>	6.0	30136	Proteína hipotética
Bxe_A1235	<SIGNALP>	6.9	27103	Proteína hipotética
Bxe_A1239	<SIGNALP>	6.9	15916	Proteína hipotética
Bxe_A1240	<SIGNALP>	6.7	24228	Proteína del sistema electrónico de transporte SCO1/SenC
Bxe_A1254	<SIGNALP>	9.6	61543	Transglucosilasa de mucéina unida a membrana
Bxe_A1266	<SIGNALP>	8.5	35856	Transportador ABC de fosfato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1291	<SIGNALP>	11.2	10247	Lipoproteína hipotética conservada
Bxe_A1295	<SIGNALP>	7.6	10734	Lipoproteína hipotética conservada
Bxe_A1296	<TAIP>	10.3	24891	LysM/peptidasa que une peptidoglicano
Bxe_A1301	<LIPOP>	6.2	55853	Fosfatasa ácida
Bxe_A1302	<LIPOP>	6.4	49042	Peroxidasa
Bxe_A1304	<SIGNALP>	9.4	13720	Proteína hipotética
Bxe_A1308	<SIGNALP>	6.0	62652	Gamma-glutamyltransferasa 1
Bxe_A1326	<SIGNALP>	9.0	37414	Proteína LoIC del catabolismo de ino-inositol
Bxe_A1329	<SIGNALP>	8.8	37412	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1346	<LIPOP>	5.7	53885	Sistema de flujo de ácidos aromáticos, lipoproteína de membrana externa
Bxe_A1373	<SIGNALP>	12.2	7315	Proteína ribosomal L35

Bxe_A1379	8.8	<SIGNALP>	33088	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1380	7	<SECRETOMER>	17631	Oxigenasa
Bxe_A1385	4.3	<LIPOP>	76347	Nucleasa extracelular
Bxe_A1398	8.9	<TATP>	9789	Proteína hipotética
Bxe_A1400	6.7	<SIGNALP>	25341	Proteína hipotética
Bxe_A1401	8	<SIGNALP>	58107	2-ceto-gluconato deshidrogenasa
Bxe_A1409	7.6	<SIGNALP>	37579	Proteína hipotética
Bxe_A1415	6	<LIPOP>	77396	Fosfolipasa C no-hemolítica
Bxe_A1416	3.8	<LIPOP>	8836	Proteína hipotética
Bxe_A1432	8.2	<LIPOP>	28007	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1436	6.6	<SIGNALP>	31460	Proteína hipotética
Bxe_A1437	9.1	<SIGNALP>	11505	Proteína hipotética
Bxe_A1442	5.1	<SIGNALP>	15962	Proteína hipotética
Bxe_A1444	6.4	<SIGNALP>	44688	Lipoproteína exportada
Bxe_A1448	9.2	<SIGNALP>	6462	Lipoproteína B osmóticamente inducible
Bxe_A1453	4.8	<SIGNALP>	26815	Posible lipoproteína
Bxe_A1455	9.1	<SIGNALP>	6352	Proteína hipotética
Bxe_A1468	8.7	<SIGNALP>	38384	Transportador ABC de poliamina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1471	6.4	<SIGNALP>	39502	Porina de membrana externa
Bxe_A1475	8.0	<SIGNALP>	37385	Transportador TRAP de dicarboxilato, subunidad periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1478	6.2	<SIGNALP>	30103	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1489	6.1	<SIGNALP>	25181	Deshidrogenasa de cadena corta
Bxe_A1490	9.0	<SIGNALP>	40565	Lipoproteína de membrana
Bxe_A1492	9.2	<SIGNALP>	24264	Proteína hipotética
Bxe_A1513	9.0	<SIGNALP>	159062	Helicasa HrpA dependiente de ATP
Bxe_A1516	9	<SIGNALP>	36872	Proteína hipotética
Bxe_A1528	9.4	<SIGNALP>	17321	Proteína hipotética
Bxe_A1537	9.7	<SIGNALP>	34044	Proteína hipotética
Bxe_A1545	9.8	<SIGNALP>	41667	D-alanina carboxipeptidasa
Bxe_A1549	8.8	<SIGNALP>	18235	Proteína hipotética
Bxe_A1560	9.6	<SIGNALP>	24617	Proteína hipotética
Bxe_A1565	5.6	<SIGNALP>	40315	Proteína hipotética
Bxe_A1575	6.3	<SIGNALP>	13541	Posible lipoproteína
Bxe_A1586	5.8	<LIPOP>	41534	Lipoproteína
Bxe_A1597	6.7	<LIPOP>	40788	Proteína accesoria de la transcripción, TEX
Bxe_A1602	6.4	<SIGNALP>	32357	Modulador de la actividad proteásica FtsH, HflC
Bxe_A1610	7.8	<SIGNALP>	34250	Lipoproteína hipotética conservada
Bxe_A1616	8.8	<SIGNALP>	49685	Proteína hipotética
Bxe_A1624	9.0	<SIGNALP>	20460	Peptidilprolil isomerasa
Bxe_A1634	9.3	<SIGNALP>	37964	Proteína de la familia NLP/P60
Bxe_A1640	8.8	<SIGNALP>	23855	Posible fosfolipasa
Bxe_A1641	9.7	<LIPOP>	32936	Proteína hipotética
Bxe_A1652	10.4	<SIGNALP>	56319	Proteína de la familia NLP/P60
Bxe_A1674	5.1	<SIGNALP>	132561	Ielicasa de ARN dependiente de ATP
Bxe_A1678	11.1	<LIPOP>	71180	Proteína de la segregación del cromosoma SMC
Bxe_A1681	12.1	<SIGNALP>	13795	Pseudouridina sintasa, Rasu
Bxe_A1690	8.0	<SIGNALP>	84898	Proteína hipotética
				Antígeno de membrana externa

Bxe_A1691	<SIGNALP>	8.6	19271	Proteína de membrana externa (OmpH-like)
Bxe_A1716	<SIGNALP>	5.6	42091	Proteína periplásmica de unión a fosfolípido
Bxe_A1717	<SIGNALP>	9.4	37108	Porina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A1724	<LIPOP>	8.3	25296	Proteína hipotética
Bxe_A1734	<SIGNALP>	6.1	46943	Sensor periplásmico histidina quinasa
Bxe_A1736	<SIGNALP>	10.1	11136	Transposasa
Bxe_A1742	<LIPOP>	5.8	42089	Proteína de fusión de membrana, sistema de eflujo RND
Bxe_A1746	<SIGNALP>	10.4	10660	Proteína hipotética
Bxe_A1752	<SIGNALP>	4.7	20827	Proteína hipotética
Bxe_A1758	<SIGNALP>	5.2	25295	Proteína del sistema de secreción tipo IV, proteína VirB5/TraF
Bxe_A1760	<SIGNALP>	5.7	31283	Proteína del sistema de secreción tipo IV, proteína VirB9
Bxe_A1772	<SIGNALP>	6.4	66445	Posible esterasa
Bxe_A1773	<SIGNALP>	10.4	20061	Proteína hipotética
Bxe_A1809	<SIGNALP>	10.9	12337	Sensor periplásmico histidina quinasa
Bxe_A1814	<LIPOP>	8.3	49591	Proteína hipotética
Bxe_A1818	<TAIP>	11.2	10104	Proteína hipotética
Bxe_A1819	<SIGNALP>	6.2	38959	Proteína hipotética
Bxe_A1838	<SECRETOMEP>	9.2	18101	Sensor periplásmico histidina quinasa
Bxe_A1842	<SIGNALP>	6.8	12167	Proteína hipotética
Bxe_A1891	<SIGNALP>	9.1	16905	Porina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A1893	<SIGNALP>	10.7	10632	Posible lipoproteína
Bxe_A1894	<LIPOP>	5.6	21350	Proteína exportada con péptido señal
Bxe_A1902	<LIPOP>	8.7	22525	Proteína hipotética
Bxe_A1905	<SECRETOMEP>	4.6	21972	Lipoproteína de membrana externa, lipocalina del tipo B1c
Bxe_A1915	<SECRETOMEP>	11.2	12330	Proteína hipotética
Bxe_A1941	<TAIP>	8.2	39407	Proteína hipotética
Bxe_A1946	<SIGNALP>	8.8	23329	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1950	<SIGNALP>	9.0	37249	Porina de membrana externa, familia OmpW
Bxe_A1951	<SIGNALP>	6.3	42033	Transportador ABC de poliamina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A1960	<SIGNALP>	9.1	26637	Transportador ABC de poliamina, subunidad ATPasa
Bxe_A1962	<SIGNALP>	10.0	32991	Proteína hipotética
Bxe_A1963	<SIGNALP>	5.7	84531	Lauroil aciltransferasa, biosíntesis de lípido A
Bxe_A1966	<LIPOP>	6.0	51905	Proteína que contiene un repetido YD
Bxe_A1973	<SIGNALP>	10.3	11990	Lipoproteína de membrana externa, sistema de eflujo RND
Bxe_A1989	<TAIP>	9.6	18175	Proteína hipotética
Bxe_A1995	<LIPOP>	9.0	17062	Proteína hipotética
Bxe_A1997	<SIGNALP>	9.3	34174	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A2012	<SIGNALP>	9.0	37248	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A2013	<SIGNALP>	5.9	40309	Subunidad mayor de la oxidoreductasa, Rieske (2Fe-2S)
Bxe_A2017	<SIGNALP>	5.9	87313	Proteína hipotética
Bxe_A2025	<SIGNALP>	9.4	7353	Proteína hipotética
Bxe_A2034	<SIGNALP>	6.9	44702	Proteína del sistema de secreción tipo IV, proteína VirJ
Bxe_A2044	<SIGNALP>	9.1	41211	Porina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A2047	<SIGNALP>	9.2	34795	Proteína hipotética
Bxe_A2056	<SIGNALP>	7.1	8336	Proteína hipotética
Bxe_A2058	<SIGNALP>	6.3	14026	Proteína con péptido señal

Bxe_A2068	8.6	45599	<LIPOP>	Glicosil transferasa
Bxe_A2082	6.1	16587	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2083	5.2	31497	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2084	9.3	13939	<SIGNALP>	Proteína de resistencia a cation, CopC-like
Bxe_A2090	9.0	18080	<LIPOP>	Lipoproteína de membrana externa
Bxe_A2099	7.4	25196	<SIGNALP>	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, TsaC-like
Bxe_A2126	6.8	24349	<LIPOP>	Lipoproteína
Bxe_A2129	10.2	44238	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2130	9.8	15039	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2132	8.1	62292	<SIGNALP>	Arilsulfatasa
Bxe_A2133	8.1	38777	<LIPOP>	Fosfatasa acida no específica, NapD-like
Bxe_A2134	6.9	41750	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2154	6.0	56141	<LIPOP>	Precursor de fosfolipasa D
Bxe_A2160	5.5	57058	<SIGNALP>	Proteína hipotética conservada
Bxe_A2166	8.6	38930	<SIGNALP>	Posible sulfito oxidasa
Bxe_A2167	6.1	18317	<LIPOP>	Sulfito oxidasa, subunidad citocromo c, SoxD
Bxe_A2170	9.3	43463	<LIPOP>	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteín periplásmica de unión a ligando
Bxe_A2179	9.3	8335	<TATP>	Proteína hipotética
Bxe_A2187	8.4	49898	<SIGNALP>	Alcohol deshidrogenasa citocromo c, citocromo c553
Bxe_A2191	7.9	44793	<SIGNALP>	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A2199	7.2	12475	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2205	7.3	29364	<SIGNALP>	Proteína lipotética
Bxe_A2206	7.4	29514	<LIPOP>	Proteína hipotética
Bxe_A2207	9.5	12348	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2230	7.2	79944	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2233	8.8	26374	<SIGNALP>	Proteína lipotética
Bxe_A2235	9.6	20310	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2243	8.7	30342	<SIGNALP>	Proteína hipotética conservada
Bxe_A2253	8.7	37438	<TATP>	Posible lipoproteína
Bxe_A2258	11.8	23819	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2264	9.4	8810	<SIGNALP>	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A2272	5.2	41156	<LIPOP>	Lipoproteína
Bxe_A2276	6.4	35209	<SIGNALP>	Proteína extracelular de unión a soluto, familia 1
Bxe_A2280	8.8	35456	<SIGNALP>	Transposasa, IS4
Bxe_A2284	9.9	13176	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2289	9.4	28295	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2290	8.8	26111	<LIPOP>	Proteína hipotética
Bxe_A2304	9.0	29851	<TATP>	Peptidasa de señal I
Bxe_A2306	5.6	7314	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2324	9.1	13156	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2334	7.8	40788	<SIGNALP>	Proteína hipotética
Bxe_A2351	10.3	40566	<LIPOP>	Proteínas de shock frío
Bxe_A2352	5.5	31189	<SIGNALP>	Lipoproteína/metaloenolpeptidasa
Bxe_A2357	4.9	25704	<TATP>	L-isospartato (D-aspartate) O-metiltransferasa
Bxe_A2372	4.7	20956	<SIGNALP>	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A2379	6.4	31731	<SIGNALP>	Proteína de uptake de ADN, tipo ComEA Proteína hipotética

Bxe_A2392	<SIGNALP>	7.7	38415	Proteína hipotética
Bxe_A2393	<TAIP>	7.3	35843	Lipoproteína de membrana
Bxe_A2401	<SIGNALP>	7.1	14841	Proteína hipotética
Bxe_A2412	<LIPOP>	9.4	26220	Proteína hipotética
Bxe_A2413	<SIGNALP>	5.7	12009	Proteína hipotética conservada
Bxe_A2425	<SECRETOMEPE>	8.5	29240	Proteína hipotética
Bxe_A2434	<SIGNALP>	7.9	48481	Proteína hipotética
Bxe_A2470	<SIGNALP>	9.6	32462	Proteína hipotética
Bxe_A2483	<TAIP>	9.7	46705	Transposasa de la familia IS4
Bxe_A2488	<SIGNALP>	9.5	43279	Proteína de ensamblaje del pilus Ftp
Bxe_A2497	<SIGNALP>	8.8	60186	Ensamblaje del pilus Ftp
Bxe_A2501	<SIGNALP>	9.1	17356	Proteína hipotética
Bxe_A2508	<SIGNALP>	9.1	56664	Proteína hipotética
Bxe_A2510	<SIGNALP>	9.5	8282	Proteína similar a hemolisina activación/secreción
Bxe_A2520	<SIGNALP>	9.2	7182	Proteína hipotética conservada
Bxe_A2562	<SIGNALP>	7.8	63534	Proteína hipotética
Bxe_A2604	<LIPOP>	7.6	22916	Proteína hipotética
Bxe_A2622	<SIGNALP>	4.9	36206	Proteína de membrana externa activador de hemolisina
Bxe_A2630	<SIGNALP>	5.0	321667	Proteína hipotética
Bxe_A2651	<SIGNALP>	8.0	22269	Proteína VirB5/TraF, sistema de secreción del tipo IV
Bxe_A2653	<LIPOP>	8.9	15698	Hemaglutinina filamentososa
Bxe_A2659	<SIGNALP>	5.4	52127	Proteína hipotética conservada
Bxe_A2675	<SIGNALP>	6.1	28359	Proteína hipotética conservada
Bxe_A2687	<TAIP>	6.7	40717	Proteína hipotética
Bxe_A2693	<SIGNALP>	6.3	55578	Fosfolipasa C
Bxe_A2717	<SIGNALP>	7.8	40475	Protina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A2739	<SIGNALP>	8.4	21123	Proteína de secreción HlyD
Bxe_A2779	<SIGNALP>	8.7	28220	Posible lipoproteína
Bxe_A2780	<TAIP>	8.9	20479	Proteína hipotética
Bxe_A2788	<SIGNALP>	6.5	40592	Peroxiredoxina
Bxe_A2789	<LIPOP>	8.5	40112	Proteína con péptido señal
Bxe_A2792	<SIGNALP>	5.7	69790	Proteína hipotética
Bxe_A2793	<LIPOP>	6.6	33655	Lipoproteína de membrana
Bxe_A2799	<SIGNALP>	6.4	40730	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A2804	<LIPOP>	9.3	19187	Proteína de membrana, rica en glicina
Bxe_A2805	<SIGNALP>	5.9	100468	Proteína de membrana, rica en glicina
Bxe_A2806	<SIGNALP>	5.9	70125	Hemolysin activation/secretion protein
Bxe_A2807	<SIGNALP>	5.5	97483	Proteína hipotética
Bxe_A2815	<SIGNALP>	8.8	42116	Proteína hipotética
Bxe_A2828	<SIGNALP>	9.4	25277	Proteína hipotética
Bxe_A2830	<SIGNALP>	7.9	19426	Lipoproteína de membrana
Bxe_A2831	<SIGNALP>	5.5	35428	Proteína hipotética
Bxe_A2841	<SIGNALP>	5.3	35567	Proteína de membrana con péptido señal
Bxe_A2842	<SIGNALP>	5.9	81015	Posible proteína de activación/secreción
Bxe_A2843	<SIGNALP>	5.6	29837	Proteína hipotética
Bxe_A2848	<SECRETOMEPE>	5.5	29158	Proteína hipotética
Bxe_A2858	<SIGNALP>	4.4	21522	Proteína polimérica de membrana, adhesina/hemaglutinina filamentososa

Bsc_A2862	<SIGNALP>	5.4	20873	Proteína hipotética
Bsc_A2864	<LIPOP>	10.5	23117	Proteína hipotética exportada
Bsc_A2871	<SIGNALP>	6.6	18252	Proteína hipotética
Bsc_A2872	<SIGNALP>	9.0	15216	Proteína hipotética
Bsc_A2879	<SIGNALP>	5.5	102752	Proteína hipotética
Bsc_A2881	<SIGNALP>	9.5	33390	Proteína hipotética
Bsc_A2883	<SIGNALP>	6.0	29931	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (rotamasa) - familia ciclofilina
Bsc_A2887	<SIGNALP>	9.1	13313	Proteína hipotética
Bsc_A2891	<SIGNALP>	6.3	19708	Sistema de secreción del tipo III, lipoproteína EscJ
Bsc_A2893	<LIPOP>	8.4	36378	Lipoproteína de membrana externa, sistema de eflujo RND
Bsc_A2894	<SIGNALP>	9.8	23279	Lipoproteína periplásmica involucrada en transporte de hierro
Bsc_A2907	<SIGNALP>	7.1	24503	Proteína sin caracterizar involucrada en transporte de Fe+2
Bsc_A2911	<SIGNALP>	8.9	20930	Posible peroxidoxina, proteína bacterioferritina
Bsc_A2917	<SIGNALP>	6.7	23062	Proteína hipotética
Bsc_A2929	<LIPOP>	8.0	20431	Lipoproteína
Bsc_A2933	<SIGNALP>	8.9	37787	Proteína hipotética
Bsc_A2938	<SIGNALP>	9.5	13331	Anhidrasa carbónica
Bsc_A2939	<SIGNALP>	8.9	18982	Proteína de membrana
Bsc_A2952	<LIPOP>	8.5	13594	Proteína hipotética
Bsc_A2968	<SIGNALP>	8.5	12967	Proteína hipotética
Bsc_A2973	<LIPOP>	6.4	13754	Proteína hipotética
Bsc_A2975	<SIGNALP>	9.2	29177	Proteína hipotética
Bsc_A2993	<SIGNALP>	5.6	52055	Proteína hipotética
Bsc_A2994	<SIGNALP>	10.8	9009	Citocromo c
Bsc_A2996	<LIPOP>	9.8	19524	Proteína hipotética
Bsc_A3014	<SIGNALP>	7.9	40189	Proteína hipotética
Bsc_A3017	<SIGNALP>	8.9	116314	Proteína hipotética
Bsc_A3019	<SIGNALP>	9.7	11583	Proteína hipotética
Bsc_A3020	<SIGNALP>	8.1	18733	Proteína hipotética
Bsc_A3021	<SIGNALP>	9.2	47354	Proteína hipotética
Bsc_A3022	<SIGNALP>	9.5	25989	Proteína hipotética
Bsc_A3024	<SIGNALP>	11.2	11148	Proteína hipotética
Bsc_A3035	<SIGNALP>	8.8	44132	Proteína de unión a NAD/FAD
Bsc_A3038	<SIGNALP>	6.9	37268	Lipoproteína carrier de membrana externa LolA
Bsc_A3039	<LIPOP>	10.5	19549	Proteína hipotética
Bsc_A3058	<SIGNALP>	9.1	40247	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bsc_A3062	<SIGNALP>	8.5	38015	Proteína hipotética
Bsc_A3069	<TATP>	10.3	26532	Proteína hipotética
Bsc_A3085	<SIGNALP>	9.4	21968	Proteína hipotética
Bsc_A3101	<SIGNALP>	8.6	32491	Proteína hipotética
Bsc_A3103	<SIGNALP>	6.0	29928	Proteína hipotética conservada
Bsc_A3115	<SIGNALP>	5.7	67236	Proteína de membrana externa y lipoproteínas asociadas al peptidoglicano
Bsc_A3116	<SIGNALP>	11.8	23819	Proteína hipotética
Bsc_A3126	<LIPOP>	8.9	41974	Proteína hipotética
Bsc_A3129	<SECRETOMER>	8.7	48695	Proteína secretada Ysc/FliF
Bsc_A3132	<SECRETOMER>	5.9	53816	Proteína hipotética
Bsc_A3140	<SECRETOMER>	7.6	15622	Poñina, tipo gram-negativa Proteína TonB

Bxe_A3142	<SECRETOMEP>	5.9	37303	Sistema de flujo RND, lipoproteína de membrana externa, NodT
Bxe_A3147	<SIGNALP>	8.8	25345	Proteína que une ácido nucleico
Bxe_A3148	<SECRETOMEP>	9.1	11478	Proteína hipotética
Bxe_A3151	<SIGNALP>	5.5	63692	Proteína periplásmica/secretada
Bxe_A3152	<LIPOP>	8.5	41437	Proteína hipotética
Bxe_A3159	<SIGNALP>	9.9	9382	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A3160	<LIPOP>	9.0	34667	Proteína hipotética
Bxe_A3178	<TAIP>	7.2	58237	Proteína hipotética
Bxe_A3182	<SIGNALP>	9.5	16054	Aminotransferasa
Bxe_A3196	<SECRETOMEP>	5.3	45978	Regulador transcripcional
Bxe_A3222	<TAIP>	9.9	15105	Lipoproteína
Bxe_A3223	<SIGNALP>	5.9	53260	Proteína hipotética
Bxe_A3226	<SIGNALP>	9.4	47108	Proteína hipotética
Bxe_A3234	<SIGNALP>	9.0	43230	Exoproteínas involucradas en utilización de hierro o adhesión
Bxe_A3250	<LIPOP>	6.3	44913	Transportador de potasio, cadena ATPasa C
Bxe_A3268	<SECRETOMEP>	9.6	20262	Receptor extracelular de unión a ligando
Bxe_A3270	<SECRETOMEP>	9.8	20163	N-acil-D-glucosamina 2-epimerasa
Bxe_A3272	<SECRETOMEP>	6.7	61893	Proteína conservada sin caracterizar
Bxe_A3276	<SECRETOMEP>	9.8	16942	Proteína hipotética
Bxe_A3285	<SECRETOMEP>	6.4	40308	Proteína hipotética
Bxe_A3302	<SIGNALP>	4.9	67789	Proteína periplásmica involucrada en exporte de polisacárido
Bxe_A3304	<SIGNALP>	10.4	11546	Proteína hipotética
Bxe_A3313	<LIPOP>	9.4	22933	Proteína precursora de citocromo c
Bxe_A3314	<SIGNALP>	5.7	15932	Lipoproteína secretada o periplásmica
Bxe_A3319	<SECRETOMEP>	10.9	19595	Proteína hipotética
Bxe_A3341	<SIGNALP>	9.6	15981	Proteína de ensamble del pilus Tfp, PILE
Bxe_A3343	<SECRETOMEP>	9.2	45579	Proteína de ensamble del pilus Tfp
Bxe_A3352	<SECRETOMEP>	6.5	18638	Proteína de transporte de biopolímero
Bxe_A3362	<LIPOP>	6.3	20596	Lipoproteína de membrana externa, sistema de flujo RND
Bxe_A3372	<SECRETOMEP>	9.2	19959	Proteína hipotética conservada
Bxe_A3375	<SIGNALP>	9.7	25609	Proteína hipotética conservada
Bxe_A3377	<SIGNALP>	10.0	28483	Proteína hipotética conservada
Bxe_A3388	<SIGNALP>	9.6	33140	Proteína hipotética conservada
Bxe_A3390	<SECRETOMEP>	7.7	40044	Proteína de transmembra aciltransferasa
Bxe_A3394	<SIGNALP>	10.8	35219	Proteína hipotética
Bxe_A3408	<SECRETOMEP>	6.1	30858	Proteína hipotética
Bxe_A3418	<TAIP>	6.2	35363	Proteína hipotética
Bxe_A3422	<SIGNALP>	6.2	49068	Proteína hipotética
Bxe_A3429	<SECRETOMEP>	5.6	86740	Proteína hipotética
Bxe_A3430	<LIPOP>	10.1	11180	Proteína hipotética
Bxe_A3433	<SIGNALP>	6.1	12772	Histidina quinasa regulador de respuesta
Bxe_A3440	<SIGNALP>	6.5	15200	Citocromo c
Bxe_A3451	<SIGNALP>	5.4	162403	Precursor de la alcohol deshidrogenasa, subunidad del citocromo C
Bxe_A3458	<SIGNALP>	9.4	27982	Porina de membrana externa de la familia OmpC
Bxe_A3460	<LIPOP>	9.1	50977	Transportador ABC de espermidina/potesina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A3470	<SIGNALP>	9.9	63351	Proteína hipotética
Bxe_A3476	<SIGNALP>	6.3	47605	Proteína hipotética

Bse_A3482	<LIPOP>	8.5	40297	Proteína precursora tipo OmpA de la familia OmpA/MotB
Bse_A3496	<SIGNALP>	5.9	19749	Proteína del tipo OsaA
Bse_A3500	<SIGNALP>	5.4	22114	Transportador ABC de Fe ³⁺ -hidroxamate/cobalamina, subunidad ATPásica
Bse_A3502	<SIGNALP>	6.8	23661	Repetido TPR
Bse_A3510	<YATP>	9.4	44284	Transposasa
Bse_A3533	<SIGNALP>	5.5	67290	Proteína hipotética
Bse_A3558	<SIGNALP>	9.2	22791	Proteína de membrana extern (CymLP)
Bse_A3582	<SIGNALP>	7.1	20622	Lipoproteína YaeC
Bse_A3600	<LIPOP>	5.4	47635	Proteína hipotética
Bse_A3605	<SIGNALP>	9.3	29160	Proteína hipotética
Bse_A3621	<SIGNALP>	8.3	22429	Proteína hipotética conservada
Bse_A3631	<SIGNALP>	9.1	22521	Mutasa de fosfoglicerato
Bse_A3635	<SIGNALP>	10.0	28688	Proteína hipotética
Bse_A3644	<SIGNALP>	7.8	30419	Protasa de procesamiento del carboxilo terminal
Bse_A3666	<SIGNALP>	8.3	57993	Proteína hipotética
Bse_A3670	<SIGNALP>	9.4	24864	Proteína activación/secreción
Bse_A3673	<SIGNALP>	6.9	39581	Transportador ABC de taurina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bse_A3679	<SIGNALP>	8.9	35807	Proteína hipotética
Bse_A3680	<LIPOP>	9.5	18573	Proteína hipotética
Bse_A3681	<SIGNALP>	6.8	21230	Proteína hipotética
Bse_A3682	<LIPOP>	5.7	33933	Proteína hipotética
Bse_A3683	<YATP>	5.7	31824	Proteína hipotética
Bse_A3691	<SIGNALP>	8.5	8263	Proteína hipotética
Bse_A3706	<SIGNALP>	10.0	26861	Proteína hipotética
Bse_A3817	<SECRETOMEP>	9.0	43229	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bse_A3821	<LIPOP>	9.8	14225	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bse_A3822	<SECRETOMEP>	9.6	20260	Proteína hipotética
Bse_A3844	<SIGNALP>	4.5	30093	Proteína hipotética
Bse_A3845	<SECRETOMEP>	9.9	20161	Proteína hipotética
Bse_A3851	<SECRETOMEP>	9.9	39624	Proteína hipotética
Bse_A3853	<SECRETOMEP>	7.9	50276	Proteína hipotética
Bse_A3859	<SIGNALP>	10.5	22516	Lipoproteína
Bse_A3865	<LIPOP>	11.8	23819	Proteína hipotética
Bse_A3871	<SIGNALP>	5.5	44731	Proteína de exporte de polisacárido
Bse_A3873	<SIGNALP>	10.1	12040	Lipoproteína de la familia A
Bse_A3875	<SIGNALP>	9.4	27303	Proteína hipotética
Bse_A3880	<LIPOP>	9.8	20955	Proteína hipotética
Bse_A3889	<LIPOP>	9.5	44330	Proteína periplásmica
Bse_A3918	<SECRETOMEP>	9.4	10960	Regulador transcripcional, proteína de la familia LacI
Bse_A3919	<SIGNALP>	6.0	19089	Proteína de transporte de biopolímero ExbD/TolR
Bse_A3920	<SECRETOMEP>	7.2	40535	Proteína TonB
Bse_A3921	<SIGNALP>	9.2	45578	Proteína periplásmica ToIB
Bse_A3922	<LIPOP>	6.8	18636	Proteína de membrana externa de la familia OmpA/MotB
Bse_A3937	<SIGNALP>	8.9	27541	Proteína de transmembrana
Bse_A3938	<SECRETOMEP>	7.4	17084	Proteína hipotética
Bse_A3960	<SECRETOMEP>	9.1	47561	Proteína hipotética
		7.4	40755	(Chaperona, DnaJ)

Bxe_A3995	<SIGNALP>	6.6	20595	Proteína hipotética
Bxe_A3996	<SIGNALP>	9.3	19957	Proteína hipotética
Bxe_A4001	<LIPOP>	9.7	25608	Proteína hipotética
Bxe_A4015	<SIGNALP>	10.0	28482	1- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfato aciltransferasa
Bxe_A4016	<SIGNALP>	9.6	33138	Proteína hipotética
Bxe_A4019	<SIGNALP>	8.0	40042	Porina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A4023	<SIGNALP>	6.4	49099	Peptidil-protili <i>cis</i> -trans isomerasa
Bxe_A4024	<SIGNALP>	5.7	86738	Proteína de tolerancia a solvente orgánico
Bxe_A4029	<SIGNALP>	10.1	11178	Proteína hipotética
Bxe_A4045	<SIGNALP>	6.4	12770	Proteína hipotética
Bxe_A4065	<SIGNALP>	6.9	15199	Proteína hipotética
Bxe_A4067	<SIGNALP>	5.4	162434	PAS/PAC proteína sensora/ quinasa de histidina
Bxe_A4074	<SIGNALP>	9.2	27980	Proteína periplásmica, citocromo c
Bxe_A4075	<SIGNALP>	8.9	50976	Precursor del citocromo c
Bxe_A4092	<SIGNALP>	6.1	24773	Proteína hipotética
Bxe_A4096	<SIGNALP>	6.6	47604	Citocromo c
Bxe_A4097	<SIGNALP>	8.7	40295	Porina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A4119	<SIGNALP>	5.3	22113	Proteína hipotética
Bxe_A4120	<SIGNALP>	7.3	23660	Proteína hipotética
Bxe_A4122	<SIGNALP>	5.2	53378	ARN polimerasa factor sigma-54
Bxe_A4128	<SIGNALP>	8.3	40410	Posible glicosilasa de adenina
Bxe_A4130	<SIGNALP>	5.5	67289	Proteína hipotética
Bxe_A4151	<LIPOP>	9.2	22789	Lipoproteína de membrana externa, LoIB
Bxe_A4145	<SIGNALP>	7.6	20621	Proteína hipotética
Bxe_A4151	<LIPOP>	5.4	47634	Proteína hipotética
Bxe_A4158	<TAIP>	9.3	29159	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4161	<LIPOP>	8.2	22427	Proteína de transporte de electrones SCO1/SenC
Bxe_A4169	<SIGNALP>	8.9	22520	Proteína oxidasa de ensamble del citocromo c
Bxe_A4174	<SIGNALP>	10.0	28687	Proteína de competencia
Bxe_A4182	<SIGNALP>	8.5	57392	Peptidasa S41A
Bxe_A4194	<SIGNALP>	9.0	19509	Isomerasa de tiol-disulfuro y tioredoxinas
Bxe_A4201	<SIGNALP>	7.3	39579	Isomerasa de poliamina/opina/fosfonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4209	<SIGNALP>	9.0	35806	Transportador ABC de taurina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4222	<SIGNALP>	7.3	21229	Proteína hipotética
Bxe_A4223	<SIGNALP>	6.8	33932	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4226	<SIGNALP>	5.8	31823	Proteína de unión a biotina
Bxe_A4228	<SIGNALP>	8.9	8261	Proteína hipotética
Bxe_A4246	<SIGNALP>	10.0	26880	Proteína hipotética
Bxe_A4247	<SIGNALP>	8.3	23520	Proteína de intercambio tiol-disulfuro
Bxe_A4250	<SIGNALP>	8.3	57794	Transportador ABC de péptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4260	<SIGNALP>	5.6	45374	Proteína hipotética
Bxe_A4267	<SIGNALP>	8.6	37037	Transportador ABC de sulfato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4275	<SIGNALP>	6.2	35623	Hidrolasa
Bxe_A4279	<SIGNALP>	8.4	38603	Porina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A4280	<SIGNALP>	10.3	15539	Proteína hipotética
Bxe_A4296	<TAIP>	11.9	23817	Transposasa, IS4
Bxe_A4308	<LIPOP>	5.4	44762	Proteína hipotética

Bxe_A4310	<SIGNALP>	10.1	12039	Citocromo c, clase I
Bxe_A4311	<LIPOP>	9.4	27302	Proteína periplásmica de unión a fosfolípido
Bxe_A4315	<LIPOP>	9.8	20954	Lipoproteína
Bxe_A4325	<LIPOP>	9.4	44328	Proteína de membrana relacionada con la hemaglutinina
Bxe_A4327	<SECRETOMEP>	8.8	42270	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4333	<TAATP>	9.3	10959	Proteína hierro-zinc de alto potencial
Bxe_A4336	<SIGNALP>	6.3	19088	Proteína hipotética
Bxe_A4339	<SIGNALP>	7.5	40534	Regulador transcripcional de la familia LacI
Bxe_A4340	<SIGNALP>	8.8	36295	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4344	<SIGNALP>	12.3	10165	Proteína hipotética
Bxe_A4359	<SIGNALP>	6.0	69492	Proteína hipotética
Bxe_A4364	<LIPOP>	5.6	54104	Lipoproteína de membrana externa, sistema de flujo RND
Bxe_A4378	<SIGNALP>	11.6	13267	Proteína hipotética
Bxe_A4401	<SECRETOMEP>	7.1	82386	Cell division protein FisI/penicillin-binding protein 2
Bxe_A4403	<SIGNALP>	8.1	25552	Proteína hipotética
Bxe_A4411	<SIGNALP>	7.5	22702	Proteína hipotética
Bxe_A4415	<SIGNALP>	7.5	34344	Methyl-tRNA formyltransferasa
Bxe_A4427	<SECRETOMEP>	8.0	12490	Proteína hipotética
Bxe_A4429	<SECRETOMEP>	5.3	79562	Elemento Rbs, Proteína Vgr
Bxe_A4434	<SIGNALP>	8.8	27915	Transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_A4450	<SIGNALP>	10.4	12051	Proteína hipotética
Bxe_A4457	<TAATP>	11.9	23817	Transposasa
Bxe_A4465	<SIGNALP>	9.7	8518	Proteína hipotética
Bxe_A4471	<SIGNALP>	8.0	10888	Proteína hipotética
Bxe_A4478	<SIGNALP>	7.2	12294	Proteína hipotética
Bxe_A4489	<SIGNALP>	5.3	54872	Lipoproteína de membrana externa, sistema de flujo RND
Bxe_A4490	<SIGNALP>	10.7	27613	Proteína N de la vía de secreción general
Bxe_A4498	<SIGNALP>	9.8	14657	Proteína de la vía secreción general
Bxe_A4502	<SIGNALP>	9.7	16555	Proteína hipotética
Bxe_A4508	<SIGNALP>	10.1	9867	Proteína hipotética
Bxe_A4523	<SIGNALP>	8.0	40787	Porina de membrana externa, familia OmpC
Bxe_A4531	<SIGNALP>	12.3	11409	Proteína hipotética
Bxe_A4551	<SIGNALP>	12.6	6977	Proteína hipotética
Bxe_A4555	<SIGNALP>	11.8	8992	Proteína hipotética
Bxe_B0002	<SIGNALP>	6.6	10304	Proteína hipotética
Bxe_B0014	<LIPOP>	4.9	34766	Lipoproteína, familia YacJ
Bxe_B0016	<SIGNALP>	9.4	21797	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0028	<SIGNALP>	9.3	21858	Transglucosilasa de mucina
Bxe_B0030	<SIGNALP>	10.4	19035	Proteína hipotética
Bxe_B0031	<SIGNALP>	10.1	12435	Proteína hipotética
Bxe_B0047	<LIPOP>	6.5	28466	Proteína hipotética
Bxe_B0061	<SIGNALP>	5.4	39866	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0062	<SIGNALP>	5.7	55613	Transportador ABC de níquel, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0071	<SIGNALP>	8.5	39953	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0073	<SIGNALP>	5.7	31107	Reductasa de -hidroxi-3-oxopropionato
Bxe_B0080	<TAATP>	8.6	48636	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0091	<SIGNALP>	8.2	9526	Proteína hipotética

Bxe_B0142	<SIGNALP>	11.5	13774	Proteína hipotética
Bxe_B0152	<SIGNALP>	4.5	71765	Hemaglutinina filamentosa
Bxe_B0153	<SIGNALP>	6.7	64781	Proteína activación/secreción
Bxe_B0154	<SIGNALP>	9.2	33452	Peptidil protil cis-trans isomerasa
Bxe_B0172	<SIGNALP>	6.2	37799	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0187	<SIGNALP>	9.5	11884	Proteína que contiene la repetición YD
Bxe_B0188	<SIGNALP>	5.5	126504	Proteína que contiene la repetición YD
Bxe_B0197	<LIPOP>	8.6	22935	Lipoproteína de membrana externa
Bxe_B0208	<SIGNALP>	6.8	27449	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0211	<TATP>	5.8	78144	Fosfolipasa C, no hemolítica
Bxe_B0214	<SIGNALP>	5.7	105431	Proteína hipotética
Bxe_B0215	<SIGNALP>	5.2	59052	Glucosa-6-fosfato-1,-deshidrogenasa
Bxe_B0217	<SIGNALP>	6.6	36485	Oxidoreductasa
Bxe_B0218	<SIGNALP>	5.7	79673	Receptor de sideróforo TonB-dependiente
Bxe_B0223	<TATP>	9.0	10923	Proteína de alto potencial de hierro azúfre
Bxe_B0230	<LIPOP>	4.9	65523	Proteína hipotética
Bxe_B0266	<SIGNALP>	5.9	24996	Deshidrogenasa de cadena corta
Bxe_B0306	<SIGNALP>	6.4	61744	Alcohol deshidrogenasa
Bxe_B0307	<SIGNALP>	9.3	42996	Posible citocromo C
Bxe_B0341	<SIGNALP>	8.1	12168	Lipoproteína
Bxe_B0342	<SIGNALP>	5.6	81732	Proteína de membrana externa
Bxe_B0343	<SIGNALP>	6.5	26706	Proteína chaperona HspD
Bxe_B0344	<SIGNALP>	4.5	17584	Proteína hipotética
Bxe_B0346	<LIPOP>	4.6	51283	Peroxisasas
Bxe_B0347	<LIPOP>	7.0	24697	Proteína hipotética
Bxe_B0365	<TATP>	9.3	57401	Transportador ABC de péptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0370	<SIGNALP>	8.7	41328	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0374	<SIGNALP>	5.9	40226	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0380	<SIGNALP>	5.9	59922	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0383	<SIGNALP>	10.3	11749	Sintetasa de acil-CoA
Bxe_B0388	<SIGNALP>	5.6	39792	Proteína que une fosfolípido
Bxe_B0393	<SIGNALP>	6.1	41909	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0395	<SIGNALP>	9.2	11682	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0397	<SIGNALP>	5.9	54355	Proteína hipotética conservada
Bxe_B0415	<SIGNALP>	5.5	40704	Hidrolasa de Acetil-CoA
Bxe_B0420	<SIGNALP>	8.8	44385	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_B0438	<TATP>	9.6	37513	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0448	<SECRETOMEP>	8.4	9593	Transportador TRAP de dicarboxilato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0449	<SECRETOMEP>	6.5	9654	Proteína hipotética
Bxe_B0454	<SIGNALP>	8.4	34889	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B0455	<SIGNALP>	7.8	30937	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, subunidad ATPasica
Bxe_B0464	<SECRETOMEP>	8.4	9577	Proteína hipotética
Bxe_B0465	<SECRETOMEP>	6.5	9627	Proteína hipotética
Bxe_B0466	<SECRETOMEP>	5.9	76455	Quinasa de serina/treonina
Bxe_B0467	<SIGNALP>	6.9	70070	Proteína hipotética conservada
Bxe_B0469	<SIGNALP>	8.0	15559	Proteína hipotética
Bxe_B0470	<SECRETOMEP>	6.2	9929	Proteína hipotética

Bxc_B0471	<SIGNALP>	6.0	53324	Proteína de membrana externa, tolC
Bxc_B0478	<SECRETOMEP>	10.1	19546	Proteína hipotética
Bxc_B0487	<SIGNALP>	6.5	8619	Proteína hipotética
Bxc_B0489	<SIGNALP>	8.1	10759	Proteína hipotética
Bxc_B0495	<SIGNALP>	7.8	35891	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0497	<SIGNALP>	5.4	50576	Proteína sensora histidina quinasa
Bxc_B0511	<SIGNALP>	10.8	9064	Proteína hipotética
Bxc_B0513	<SIGNALP>	6.2	82609	Proteína hipotética
Bxc_B0516	<LIPOP>	9.6	50722	Lipoproteína
Bxc_B0528	<SIGNALP>	5.7	31383	Proteína hipotética
Bxc_B0531	<SIGNALP>	5.4	79827	Receptor de selenio TonB-dependiente
Bxc_B0535	<LIPOP>	4.9	43599	Proteína hipotética
Bxc_B0536	<SIGNALP>	6.9	16820	Proteína hipotética
Bxc_B0541	<LIPOP>	5.7	24757	Proteína hipotética
Bxc_B0545	<SIGNALP>	7.1	36839	Proteína hipotética
Bxc_B0552	<SIGNALP>	6.8	54473	Proteína de membrana externa (poona)
Bxc_B0558	<YATP>	9.5	34907	Proteína hipotética
Bxc_B0559	<SIGNALP>	9.1	15408	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0567	<SIGNALP>	6.2	15768	Proteína hipotética
Bxc_B0573	<YATP>	9.2	34020	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0578	<SIGNALP>	9.4	13367	Proteína hipotética
Bxc_B0579	<LIPOP>	6.9	61332	Metaloproteasa
Bxc_B0588	<SIGNALP>	8.4	11034	Proteína hipotética
Bxc_B0590	<SIGNALP>	8.3	43622	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0600	<SIGNALP>	8.7	30292	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0617	<SIGNALP>	10.2	29662	Regulador transcripcional, familia AraC
Bxc_B0620	<SIGNALP>	5.8	39667	Proteína de membrana externa (poona)
Bxc_B0622	<YATP>	5.5	69330	Fosfatasa alcalina exportada
Bxc_B0629	<SIGNALP>	7.0	62517	Gamma-glutamyltransferasa 1
Bxc_B0664	<SIGNALP>	9.1	43466	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0678	<SIGNALP>	8.8	35820	Regulador transcripcional, familia LysR
Bxc_B0694	<SIGNALP>	5.1	14463	Proteína hipotética
Bxc_B0704	<SIGNALP>	9.4	39188	Transportador ABC de taurina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0705	<SIGNALP>	6.0	31881	Deshidrogenasa de 3-hidroxisobutirato
Bxc_B0706	<SIGNALP>	9.6	47610	Proteína de resistencia a metal pesado
Bxc_B0710	<YATP>	8.0	51540	Sistema de flujo de metal pesado, proteína de fusión de membrana
Bxc_B0711	<SIGNALP>	8.2	9667	Proteína hipotética
Bxc_B0717	<SIGNALP>	5.8	10411	Proteína hipotética
Bxc_B0721	<LIPOP>	9.4	26065	Proteína hipotética
Bxc_B0722	<SIGNALP>	6.6	15486	Proteína hipotética
Bxc_B0733	<LIPOP>	4.6	42633	Proteína hipotética
Bxc_B0738	<SIGNALP>	5.9	47326	Proteína de membrana externa, tolC
Bxc_B0745	<LIPOP>	5.7	50957	Lipoproteína de membrana externa, sistema de flujo RND
Bxc_B0757	<SIGNALP>	8.8	37555	Transportador ABC de poliamina/opina/fofonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0762	<SIGNALP>	8.5	60190	Transportador ABC de oligopeptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0768	<SIGNALP>	10.6	15551	Proteína de unión a ADN
	<SIGNALP>	6.2	40884	Proteína de membrana externa (poona)

Bxc_B0772	<TATP>	9.8	19800	Lipoproteína
Bxc_B0787	<SIGNALP>	5.8	21124	Proteína hipotética
Bxc_B0794	<SIGNALP>	7.7	81457	Receptor de sítiofóro TonB-dependiente
Bxc_B0802	<SIGNALP>	6.9	26974	Proteína hipotética
Bxc_B0810	<SIGNALP>	5.6	11770	Proteína hipotética
Bxc_B0812	<SIGNALP>	9.2	40263	Proteína de membrana externa (postr)
Bxc_B0814	<LPOP>	6.4	54574	Proteína sensora hisidina quinasa
Bxc_B0817	<SIGNALP>	6.5	26787	Reductasa de sulfóxido de metionina
Bxc_B0819	<SIGNALP>	10.3	10088	Proteína hipotética
Bxc_B0820	<SIGNALP>	5.9	79301	Sintaxina
Bxc_B0821	<SIGNALP>	8.1	28541	Proteína hipotética
Bxc_B0828	<SIGNALP>	8.8	34315	Transportador ABC de glicina betaina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0830	<SIGNALP>	5.7	11170	Proteína hipotética
Bxc_B0838	<SIGNALP>	8.4	35677	Transportador ABC de fosfonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0845	<SIGNALP>	5.5	38848	Permeasa de nucleósidos de purina
Bxc_B0846	<SIGNALP>	9.9	10513	Proteína hipotética
Bxc_B0849	<SIGNALP>	7.8	44547	Transportador de eflijo, familia RND, proteína de fusión de membrana
Bxc_B0851	<LPOP>	5.4	57033	Lipoproteína de membrana externa, sistema de eflijo RND
Bxc_B0852	<SIGNALP>	9.3	30579	NlpA lipoproteína
Bxc_B0881	<LPOP>	8.9	11896	Proteína hipotética
Bxc_B0894	<SIGNALP>	9.2	34360	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0897	<SIGNALP>	7.0	26060	Proteína hipotética
Bxc_B0900	<SIGNALP>	5.5	84195	Receptor de sítiofóro TonB-dependiente
Bxc_B0901	<SIGNALP>	5.6	11815	Proteína hipotética conservada
Bxc_B0905	<SIGNALP>	5.4	68077	Proteína de la familia SNP-30/CGRI
Bxc_B0909	<SIGNALP>	6.6	87140	Deshidrogenasa de cadena corta
Bxc_B0910	<SIGNALP>	8.7	14356	Proteína hipotética
Bxc_B0917	<SIGNALP>	8.7	21273	Proteína hipotética
Bxc_B0936	<SIGNALP>	5.2	55464	Proteína hipotética
Bxc_B0940	<SIGNALP>	5.8	40879	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B0955	<SIGNALP>	9.5	16409	Regulador transcripcional, familia GntR
Bxc_B0997	<SIGNALP>	8.6	41773	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1019	<SIGNALP>	5.6	10913	Proteína hipotética
Bxc_B1022	<SIGNALP>	10.1	26666	Acltransferasa de fosfolípido/glicerol
Bxc_B1023	<TATP>	9.0	38882	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1038	<SIGNALP>	9.0	35126	Transportador ABC de ramnosa, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1039	<SIGNALP>	9.3	11672	Proteína hipotética
Bxc_B1041	<SIGNALP>	9.1	38322	Proteína de membrana externa (postr)
Bxc_B1044	<SIGNALP>	9.2	39863	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1047	<SIGNALP>	5.7	41449	Transportador ABC de nitrato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1064	<SIGNALP>	8.7	31483	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1080	<SIGNALP>	10.1	9225	Proteína hipotética
Bxc_B1106	<SIGNALP>	6.1	42684	Regulador transcripcional
Bxc_B1113	<TATP>	8.7	36373	Proteína hipotética
Bxc_B1114	<SIGNALP>	8.9	40742	Proteína de membrana externa (postr)
Bxc_B1117	<SIGNALP>	9.2	36972	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1124	<SIGNALP>	9.2	42466	Proteína de membrana externa (postr)

Bxc_B1137	<SIGNALP>	6.3	13901	Proteína hipotética
Bxc_B1144	<SIGNALP>	9.3	10440	Proteína hipotética
Bxc_B1153	<SIGNALP>	6.3	165386	Proteína asociada a DEAD/II
Bxc_B1159	<TATP>	12.0	14538	Proteína hipotética
Bxc_B1161	<SIGNALP>	10.0	14459	Proteína hipotética
Bxc_B1165	<SIGNALP>	8.8	19491	Proteína secretada
Bxc_B1170	<SIGNALP>	9.4	11542	Proteína que une fosfolípido
Bxc_B1171	<TATP>	11.7	14963	Proteína hipotética
Bxc_B1174	<SIGNALP>	5.7	61549	Carboxipeptidasa C
Bxc_B1190	<SIGNALP>	8.7	31805	Proteína de unión a tungstato/molibdato
Bxc_B1191	<LPOP>	6.1	31532	Proteína hipotética
Bxc_B1214	<SIGNALP>	9.7	32545	Proteína de la familia MfVa
Bxc_B1228	<SIGNALP>	8.8	40786	Proteína de membrana externa (poína)
Bxc_B1231	<SIGNALP>	5.7	52178	Lipoproteína de membrana externa, sistema de efujo RND
Bxc_B1232	<SIGNALP>	8.2	83758	Proteína hipotética
Bxc_B1254	<SIGNALP>	9.0	42534	Proteína de membrana externa (poína)
Bxc_B1255	<SIGNALP>	6.7	10449	Proteína hipotética
Bxc_B1257	<SIGNALP>	8.4	25319	Anhidrasa carbónica
Bxc_B1266	<TATP>	9.9	35228	Aldo-ceto reductasa
Bxc_B1272	<TATP>	9.5	12495	Proteína hipotética
Bxc_B1321	<SIGNALP>	9.4	14303	Bomba de efujo MFS, lipoproteína de membrana externa
Bxc_B1325	<LPOP>	5.4	58235	Proteína hipotética
Bxc_B1331	<SIGNALP>	10.5	9673	Proteína hipotética
Bxc_B1338	<SIGNALP>	9.1	18011	Proteína hipotética
Bxc_B1340	<SIGNALP>	10.6	10787	Proteína hipotética
Bxc_B1355	<LPOP>	8.9	20731	Proteína de la familia lipocalina
Bxc_B1368	<TATP>	8.9	38980	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1377	<SIGNALP>	8.5	34716	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/carbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1391	<LPOP>	5.5	50836	Lipoproteína de membrana externa, sistema de efujo RND
Bxc_B1394	<SIGNALP>	5.4	9412	Proteína hipotética
Bxc_B1401	<SIGNALP>	5.0	32890	Ribonuclease
Bxc_B1403	<SIGNALP>	8.3	35472	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1407	<SIGNALP>	6.6	35896	Proteína hipotética
Bxc_B1413	<SIGNALP>	8.7	39908	Proteína de membrana externa (poína)
Bxc_B1425	<SIGNALP>	6.1	15221	Proteína hipotética
Bxc_B1480	<SIGNALP>	8.0	26231	Transportador ABC de molibdeno, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1495	<SECRETOME>	8.8	58180	Transportador ABC de péptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1496	<TATP>	9.6	33835	Transportador ABC de péptido, subunidad de membrana interna
Bxc_B1503	<SIGNALP>	8.8	38568	Transportador ABC ₂ , proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1528	<SIGNALP>	7.9	12409	Proteína hipotética
Bxc_B1534	<SIGNALP>	6.0	15187	Possible citocromo C6
Bxc_B1540	<SIGNALP>	8.9	43203	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1548	<SIGNALP>	9.1	29276	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1551	<SIGNALP>	7.9	30286	MfVa lipoproteína
Bxc_B1557	<SIGNALP>	9.7	8938	Proteína hipotética
Bxc_B1561	<SIGNALP>	8.9	32071	Transportador ABC de D-metionina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1565	<TATP>	8.7	58606	Transportador ABC de péptido, proteína periplásmica de unión a ligando

Bxc_B1571	<SIGNALP>	6.1	41081	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B1572	<SIGNALP>	8.3	34078	Transportador ABC de colina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1576	<SIGNALP>	7.8	30757	Transportador ABC de glicina betaina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1582	<SIGNALP>	6.1	75453	Oxidoreductasa, unión a FAD/FMN
Bxc_B1593	<SIGNALP>	9.0	41791	Beta-lactamasa
Bxc_B1612	<TATP>	11.0	13715	Proteína hipotética
Bxc_B1613	<SIGNALP>	8.9	33782	Transportador ABC de colina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1622	<SIGNALP>	10.0	10559	Proteína hipotética
Bxc_B1624	<SIGNALP>	10.0	12003	Proteína que une fosfolípido
Bxc_B1625	<TATP>	8.0	39942	Proteína hipotética
Bxc_B1626	<SIGNALP>	9.5	54696	Proteína hipotética
Bxc_B1630	<SIGNALP>	11.4	12611	Proteína hipotética
Bxc_B1642	<SIGNALP>	6.4	42635	Proteína hipotética
Bxc_B1654	<SIGNALP>	6.5	49761	AntiH
Bxc_B1660	<TATP>	9.3	51417	Proteína hipotética
Bxc_B1663	<LIPOP>	9.6	26964	Proteína de unión a peptidoglicano
Bxc_B1668	<SIGNALP>	6.4	39018	Peptidasa M23B
Bxc_B1669	<SIGNALP>	6.0	9197	Catalasa
Bxc_B1677	<SIGNALP>	5.6	11742	Proteína asociada a transporte
Bxc_B1679	<SIGNALP>	11.5	11683	Proteína hipotética
Bxc_B1682	<TATP>	9.2	39129	Transportador ABC de espenmidina/putrescina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1685	<SIGNALP>	9.2	38239	Transportador ABC de espenmidina/putrescina, subunidad A1TPásica
Bxc_B1686	<SIGNALP>	8.9	29321	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1689	<SIGNALP>	7.1	49598	Citocromo c, clase I
Bxc_B1694	<LIPOP>	10.1	32681	Peptidasas de peptidoglicano
Bxc_B1695	<SIGNALP>	10.7	9215	Proteína hipotética
Bxc_B1699	<SIGNALP>	5.8	41257	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B1701	<SIGNALP>	6.5	32364	Esterasa/lipasa/tioesterasa
Bxc_B1711	<TATP>	8.2	46145	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1718	<SIGNALP>	9.1	55006	Proteína hipotética
Bxc_B1724	<SIGNALP>	9.9	9793	Proteína hipotética
Bxc_B1750	<SIGNALP>	9.2	21612	Proteína hipotética
Bxc_B1772	<SIGNALP>	9.0	19192	Proteína hipotética
Bxc_B1781	<SIGNALP>	8.5	39177	Proteína hipotética
Bxc_B1786	<SIGNALP>	10.2	11914	Proteína tipo TRAP, componente periplásmico
Bxc_B1795	<SIGNALP>	9.3	41216	Proteína hipotética
Bxc_B1798	<SIGNALP>	8.4	36274	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B1819	<SIGNALP>	8.8	29697	Transportador TRAP de dicarboxilato, subunidad DcrP
Bxc_B1829	<SIGNALP>	9.1	30634	Proteína extracelular de unión a ligando, familia I
Bxc_B1832	<TATP>	4.9	50938	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B1833	<TATP>	5.6	40051	Porina de carbohidrato
Bxc_B1835	<SIGNALP>	5.9	36096	Proteína hipotética
Bxc_B1856	<SIGNALP>	9.3	17899	Transportador ABC de 2-aminoetilfosfonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1861	<SIGNALP>	7.7	7136	Proteína hipotética
Bxc_B1875	<SIGNALP>	8.9	38694	Proteína de estabilidad del plásmido
Bxc_B1879	<LIPOP>	10.5	10203	Proteína hipotética
Bxc_B1898	<SIGNALP>	9.3	35176	Proteína sin caracterizar

Bxc_B1904	<SIGNALP>	9.0	34590	Proteína hipotética
Bxc_B1907	<TATP>	9.4	35094	Proteína hipotética
Bxc_B1936	<SIGNALP>	7.9	39609	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B1940	<SIGNALP>	5.4	32416	Possible aminoalcoholasa
Bxc_B1954	<SIGNALP>	6.9	31930	Proteína hipotética
Bxc_B1958	<SIGNALP>	6.0	39648	Proteína hipotética
Bxc_B1961	<TATP>	9.2	56769	Transportador ABC de péptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B1962	<SIGNALP>	8.5	40337	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B1975	<SECRETOMER>	9.0	8105	Proteína hipotética
Bxc_B1984	<SIGNALP>	9.5	19761	Regulador transcripcional dependiente de ATP, tipo MalT
Bxc_B1988	<TATP>	9.6	35654	Proteína hipotética
Bxc_B1991	<SIGNALP>	5.6	12290	Proteína hipotética
Bxc_B1993	<SIGNALP>	5.7	59821	Proteína de la familia carboxipeptidasas
Bxc_B1994	<SECRETOMER>	5.5	53012	Cumamolisinina
Bxc_B2002	<SIGNALP>	12.0	9927	Proteína hipotética
Bxc_B2008	<SIGNALP>	7.8	45945	Sistema de eflijo RND, proteína de fusión de membrana
Bxc_B2011	<SIGNALP>	4.8	52542	Lipoproteína de membrana externa, sistema de eflijo RND
Bxc_B2042	<SIGNALP>	7.7	42260	Endo-1,4-D-glucanasa
Bxc_B2043	<SIGNALP>	7.5	188692	Celulasa sintasa
Bxc_B2044	<SIGNALP>	8.2	45320	Proteína hipotética
Bxc_B2050	<SIGNALP>	9.2	27071	Transportador ABC _C , proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2059	<SIGNALP>	9.7	11237	Proteína hipotética
Bxc_B2065	<SIGNALP>	9.1	20225	Proteína de la familia YceI
Bxc_B2066	<SIGNALP>	7.1	21003	Proteína hipotética
Bxc_B2070	<LIPOP>	5.0	53280	Lipoproteína de membrana externa, sistema de eflijo RND
Bxc_B2089	<LIPOP>	4.6	84345	Proteína relacionada con hemagglutina
Bxc_B2093	<SIGNALP>	9.9	14108	Proteína hipotética
Bxc_B2109	<SIGNALP>	5.9	30766	Proteína de membrana externa
Bxc_B2121	<LIPOP>	6.0	52349	Proteína de membrana externa
Bxc_B2123	<SIGNALP>	10.1	10296	Proteína hipotética
Bxc_B2131	<SIGNALP>	9.1	40605	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B2136	<TATP>	9.3	34141	Transportador tripartito de triarabosilato, familia TTT, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2138	<SIGNALP>	8.8	34001	Proteína hipotética
Bxc_B2144	<TATP>	7.7	34618	Transportador tripartito de triarabosilato, familia TTT, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2154	<TATP>	8.9	33774	Transportador tripartito de triarabosilato, familia TTT, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2159	<SIGNALP>	8.8	34415	Proteína hipotética
Bxc_B2160	<SIGNALP>	6.9	63793	D-lactato deshidrogenasa
Bxc_B2162	<SIGNALP>	5.7	26897	Proteína hipotética
Bxc_B2165	<SIGNALP>	9.0	20176	Proteína hipotética
Bxc_B2188	<SIGNALP>	7.8	8715	Proteína hipotética
Bxc_B2189	<SIGNALP>	8.6	28226	Transportador de aminoácido cationico, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2191	<SIGNALP>	9.1	29238	Lipoproteína, familia YaeC
Bxc_B2192	<SIGNALP>	9.1	40174	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_B2196	<SIGNALP>	6.6	36640	Esiterasa/lipasa/boesterasa
Bxc_B2200	<TATP>	9.2	38450	Proteína hipotética
Bxc_B2205	<SIGNALP>	9.5	26122	Peptidasa M23B
Bxc_B2208	<SIGNALP>	6.6	27504	Proteína hipotética

Brc_B2209	<SIGNALP>	8.1	10804
Brc_B2217	<TAIP>	9.4	36819
Brc_B2223	<LIPOP>	7.2	72305
Brc_B2245	<SIGNALP>	9.8	24012
Brc_B2249	<SIGNALP>	8.9	29814
Brc_B2257	<SIGNALP>	5.3	40481
Brc_B2271	<SIGNALP>	5.2	121124
Brc_B2279	<SIGNALP>	7.6	59844
Brc_B2293	<SIGNALP>	5.3	12530
Brc_B2294	<TAIP>	6.8	47385
Brc_B2295	<LIPOP>	5.4	51442
Brc_B2296	<SIGNALP>	6.0	11309
Brc_B2297	<SIGNALP>	6.3	15435
Brc_B2299	<SIGNALP>	7.0	14184
Brc_B2305	<SIGNALP>	8.9	11613
Brc_B2322	<SIGNALP>	6.5	21153
Brc_B2339	<SIGNALP>	6.3	38053
Brc_B2349	<SIGNALP>	8.9	35142
Brc_B2352	<SIGNALP>	8.7	35160
Brc_B2361	<SIGNALP>	9.1	36621
Brc_B2364	<SIGNALP>	7.1	41715
Brc_B2373	<SIGNALP>	9.1	15485
Brc_B2374	<SIGNALP>	5.9	60801
Brc_B2378	<TAIP>	6.0	35264
Brc_B2383	<SIGNALP>	6.6	54457
Brc_B2384	<SIGNALP>	6.7	34246
Brc_B2392	<SIGNALP>	6.4	41777
Brc_B2394	<SIGNALP>	11.8	11908
Brc_B2400	<SIGNALP>	8.8	40583
Brc_B2404	<SECRETOMER>	11.6	8331
Brc_B2406	<SIGNALP>	8.9	37899
Brc_B2411	<SIGNALP>	6.0	42327
Brc_B2413	<SIGNALP>	8.0	22895
Brc_B2414	<SIGNALP>	8.8	22690
Brc_B2415	<SIGNALP>	6.1	62455
Brc_B2416	<SIGNALP>	6.7	34660
Brc_B2417	<SIGNALP>	6.2	22655
Brc_B2424	<SECRETOMER>	6.4	25281
Brc_B2425	<SIGNALP>	6.3	33634
Brc_B2426	<SIGNALP>	9.5	15272
Brc_B2427	<SIGNALP>	6.5	65560
Brc_B2432	<SIGNALP>	7.6	43178
Brc_B2437	<SIGNALP>	6.8	14425
Brc_B2473	<SIGNALP>	5.1	84241
Brc_B2474	<SIGNALP>	6.3	38930
Brc_B2475	<SECRETOMER>	8.0	23306
Brc_B2483	<LIPOP>	5.5	63991

Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína de exporte de polisacárido
Proteína Yada
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Oxidasa de malicobase
Proteína de elujo de membrana externa
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína de función desconocida
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína de la familia HlyD
Transportador ABC de sulfonatos alifáticos, proteína periplásmica de unión a ligando
Sistema de transporte de sulfonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Proteína de membrana externa (porina)
Proteína de membrana externa (porina)
Proteína con dominio PRC-barrel
Proteína TPP
Metallo beta-lactamasa
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína de membrana externa (porina)
Proteína hipotética
Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Oxidoreductasa dependiente de flavina
Anquinina
Ciclotorno c, clase I
pirrolo-quinolina quinona
Proteína del tipo Mxal,
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Proteína extracelular de unión a ligando, familia 1
Proteína tipo metanol deshidrogenasa
pirrolo-quinolina quinona
Proteína hipotética
Proteína hipotética
Receptor de sítiofosfo TonB-dependiente
Repetido W/D-40
Proteína tipo TonB
Proteína hipotética

Bxc_B2504	<SIGNALP>	8.4	47100	Citocromo c, clase I
Bxc_B2508	<SIGNALP>	9.0	33338	Proteína sin caracterizar
Bxc_B2510	<SECRETOMEF>	9.2	12390	Proteína hipotética
Bxc_B2511	<SIGNALP>	9.2	41200	Proteína de membrana externa (poirina)
Bxc_B2512	<SECRETOMEF>	7.0	34448	Proteína de membrana externa (poirina)
Bxc_B2524	<SIGNALP>	9.1	38842	Proteína de membrana externa (poirina)
Bxc_B2554	<TAITP>	9.5	23545	Formato deshidrogenasa-O ₂ subunidad mayor
Bxc_B2558	<SIGNALP>	10.0	4635	Proteína hipotética
Bxc_B2566	<SIGNALP>	8.9	42770	Transportador ABC de aminoácido ramificado proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2571	<SIGNALP>	7.8	29136	Proteína hipotética
Bxc_B2573	<SIGNALP>	6.3	171889	Proteína hipotética
Bxc_B2574	<SIGNALP>	8.1	28151	Proteína hipotética
Bxc_B2576	<SIGNALP>	7.1	43026	Regulador transcripcional, familia GntR
Bxc_B2590	<SIGNALP>	8.6	46995	Proteína hipotética
Bxc_B2591	<SIGNALP>	6.4	51797	Proteína hipotética
Bxc_B2593	<SIGNALP>	6.5	50482	Proteína hipotética
Bxc_B2598	<SIGNALP>	5.8	86309	Proteína hipotética
Bxc_B2602	<SIGNALP>	8.0	20867	Mutasa de fosfoglicato/histofoglicato
Bxc_B2606	<TAITP>	6.6	30099	Proteína hipotética
Bxc_B2607	<SIGNALP>	8.4	38493	Proteína de membrana externa (poirina)
Bxc_B2615	<SIGNALP>	5.8	53406	Regulador transcripcional, familia Fis
Bxc_B2617	<TAITP>	6.5	80447	Isoquinolina 1-oxidoreductasa, beta subunit
Bxc_B2621	<SIGNALP>	8.6	36505	Transportador ABC de D-xilosa, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2625	<SIGNALP>	6.1	10123	Proteína hipotética
Bxc_B2634	<SIGNALP>	6.1	39215	Alcanosulfonato monooxigenasa
Bxc_B2636	<TAITP>	7.9	36713	Transportador ABC de sulfonatos alifáticos, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2658	<SIGNALP>	9.0	30355	Proteína extracelular de unión a ligando, familia 1
Bxc_B2670	<SIGNALP>	6.4	23512	Oxidoreductasa
Bxc_B2681	<SIGNALP>	6.7	17128	Proteína hipotética
Bxc_B2684	<SIGNALP>	9.9	11506	Proteína hipotética
Bxc_B2685	<SIGNALP>	5.3	49956	Proteína hipotética
Bxc_B2686	<SIGNALP>	7.7	101766	Proteína SalI
Bxc_B2698	<SIGNALP>	8.1	9549	Proteína hipotética
Bxc_B2711	<TAITP>	11.8	23819	Transposasa, IS4
Bxc_B2713	<LIPOP>	4.8	69229	Proteína hipotética
Bxc_B2719	<SIGNALP>	9.6	11797	Proteína que une fosfolípido
Bxc_B2720	<SIGNALP>	6.3	41272	Proteína de membrana externa (poirina)
Bxc_B2743	<LIPOP>	4.6	34672	Proteína hipotética
Bxc_B2746	<LIPOP>	6.7	46427	L-sorbosea deshidrogenasa
Bxc_B2747	<SIGNALP>	9.1	40180	Proteína de membrana externa (poirina)
Bxc_B2754	<SIGNALP>	10.9	9305	Proteína hipotética
Bxc_B2756	<SIGNALP>	7.8	11872	Proteína hipotética
Bxc_B2762	<SIGNALP>	5.7	36275	Transportador ABC de fosfato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2766	<SIGNALP>	8.6	36112	Transportador ABC de fosfato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_B2769	<SIGNALP>	7.7	29890	Proteína hipotética
Bxc_B2783	<SIGNALP>	7.0	27426	Proteína de unión a nucleótido
Bxc_B2786	<SIGNALP>	9.2	39506	Proteína de membrana externa (poirina)

Bxe_B2794	<LIPOP>	5.3	22356	Proteína hipotética
Bxe_B2795	<SIGNALP>	6.3	85386	Proteína hipotética
Bxe_B2803	<SIGNALP>	7.2	38021	Regulador transcripcional, familia GnrR
Bxe_B2808	<SIGNALP>	8.2	42499	Proteína de elujo de auxina
Bxe_B2839	<SIGNALP>	6.7	14076	Proteína hipotética
Bxe_B2848	<SIGNALP>	8.8	26857	Transportador ABC de molibdeno, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B2855	<SIGNALP>	10.3	22036	Proteína hipotética
Bxe_B2884	<SIGNALP>	4.7	87933	Proteína hipotética
Bxe_B2901	<SIGNALP>	9.5	18048	Proteína hipotética
Bxe_B2907	<LIPOP>	6.3	40240	Proteína de membrana externa, familia OmpA/MoB
Bxe_B2914	<SIGNALP>	5.5	8086	Proteína hipotética
Bxe_B2915	<LIPOP>	5.7	53501	Proteína hipotética
Bxe_B2917	<SIGNALP>	6.1	25583	Proteína hipotética
Bxe_B2919	<SIGNALP>	6.6	38718	Proteína del ensamblaje del pili
Bxe_B2920	<SIGNALP>	6.5	61780	Secretina
Bxe_B2929	<LIPOP>	9.2	38639	
Bxe_B2932	<SIGNALP>	8.5	38050	Proteína de membrana externa, familia OmpA/MoB
Bxe_B2936	<LIPOP>	9.0	48904	Transportador ABC de espermiaza/putrescina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B2945	<SIGNALP>	7.2	11189	Proteína de función desconocida
Bxe_B2964	<SIGNALP>	8.6	36692	Proteína hipotética
Bxe_B2969	<SIGNALP>	4.9	34668	Transportador ABC de azúcar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B2971	<SIGNALP>	7.8	26265	Proteína fimbrial
Bxe_B2972	<SIGNALP>	4.5	18484	Chaperona del ensamblaje de la familia
Bxe_B2988	<SIGNALP>	9.9	10602	Proteína fimbrial
Bxe_B2994	<SIGNALP>	8.4	33137	Proteína hipotética
Bxe_B3016	<LIPOP>	9.0	18818	Transportador ABC de glicina betaina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_B3019	<SIGNALP>	6.2	23882	Proteína hipotética
Bxe_B3031	<SIGNALP>	6.9	35239	Proteína de la familia YceI
Bxe_C0008	<SIGNALP>	6.9	38508	Transportador ABC de sulfonatos alifáticos, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0020	<LIPOP>	7.3	34408	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_C0027	<SIGNALP>	8.2	21857	Proteína hipotética
Bxe_C0041	<SECRETOMER>	6.0	88256	Receptor de seleniofosfo TonB-dependiente
Bxe_C0043	<SIGNALP>	6.2	62211	ATP sintasa F1, subunidad alfa
Bxe_C0054	<SECRETOMER>	9.2	14122	Proteína hipotética
Bxe_C0065	<SIGNALP>	8.4	29327	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0083	<SIGNALP>	9.4	50246	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0087	<SIGNALP>	8.2	35510	Transportador ABC de taurina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0090	<LIPOP>	9.7	42396	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0095	<SIGNALP>	9.2	43257	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0100	<SIGNALP>	8.3	43306	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0105	<LIPOP>	9.1	34859	Transportador ABC de sulfonatos alifáticos, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0106	<SIGNALP>	9.3	40961	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_C0107	<SIGNALP>	8.2	33932	Proteína periplásmica de unión a sistema, FliY
Bxe_C0117	<SIGNALP>	8.3	36939	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0124	<SECRETOMER>	6.6	74137	Desulfurasa de cisteína, subfamilia SWS
Bxe_C0127	<SIGNALP>	9.1	29485	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando

Bxc_C0134	<SIGNALP>	8.5	40397	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0139	<SECRETOMEP>	9.8	9781	Proteína hipotética
Bxc_C0140	<TATP>	8.6	58509	Transportador ABC de peptido/opina/niquel, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0144	<SIGNALP>	9.1	31317	Transportador ABC de D-amonioma, lipoproteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0146	<SIGNALP>	8.8	59712	Transportador ABC de peptido/opina/niquel, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0151	<TATP>	9.7	45712	Posible sulfito oxidasa
Bxc_C0152	<IPOP>	8.2	20181	Citocromo c, clase I
Bxc_C0154	<SIGNALP>	9.5	38011	Transportador ABC de sulfonato/nitrato/taurina, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0157	<SIGNALP>	7.0	29655	Lipoproteína de unión a D-amonioma, MetQ
Bxc_C0159	<SIGNALP>	7.7	35662	Transportador ABC de sulfonatos alifáticos, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0161	<SIGNALP>	7.6	58982	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0171	<SIGNALP>	8.4	50048	Citocromo c, clase I
Bxc_C0175	<SIGNALP>	6.4	57492	NADH-ubiquinona oxidoreductasa
Bxc_C0189	<SIGNALP>	6.8	32214	Proteína hipotética
Bxc_C0191	<SIGNALP>	6.4	53548	Proteína hipotética
Bxc_C0197	<SIGNALP>	7.0	58650	Transportador ABC de peptido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0201	<SIGNALP>	6.6	127075	Quitinasa
Bxc_C0209	<SECRETOMEP>	11.5	26356	Proteína hipotética
Bxc_C0218	<SIGNALP>	7.0	41327	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0219	<SIGNALP>	7.4	39264	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0229	<TATP>	6.9	26741	Proteína hipotética
Bxc_C0231	<SIGNALP>	8.0	83320	Receptor de sideróforo TonB-dependiente
Bxc_C0232	<SIGNALP>	5.5	49271	YnfJ
Bxc_C0240	<SIGNALP>	7.7	13850	Citocromo c, clase I
Bxc_C0257	<SIGNALP>	9.3	19193	Proteína hipotética
Bxc_C0272	<SIGNALP>	9.0	40860	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0274	<SIGNALP>	6.3	36283	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0299	<SIGNALP>	7.5	41112	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0328	<SIGNALP>	6.6	39996	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0334	<SIGNALP>	8.1	12174	Proteína hipotética
Bxc_C0346	<SIGNALP>	6.9	21042	Proteína hipotética
Bxc_C0350	<SIGNALP>	8.5	39296	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0367	<TATP>	9.2	92597	Nitrato reductasa
Bxc_C0368	<SIGNALP>	8.5	17538	Precursor del citocromo c
Bxc_C0375	<SIGNALP>	6.9	19804	Proteína de intercambio de sulfuro, DsbE
Bxc_C0385	<SIGNALP>	9.1	42306	Proteína hipotética
Bxc_C0388	<SIGNALP>	8.2	33613	Proteína extracelular de unión a ligando, familia 3
Bxc_C0393	<TATP>	5.5	89959	Receptor de sideróforo TonB-dependiente
Bxc_C0397	<SIGNALP>	9.3	33784	Receptor de sideróforo TonB-dependiente
Bxc_C0399	<SIGNALP>	5.2	86900	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0404	<SIGNALP>	9.3	44676	Destidrogenasa de D-aminoácidos, subunidad menor
Bxc_C0411	<SIGNALP>	7.3	11075	Proteína hipotética
Bxc_C0423	<SIGNALP>	7.4	33690	Proteína hipotética
Bxc_C0435	<SIGNALP>	9.3	41891	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0438	<SIGNALP>	8.6	36110	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0446	<SIGNALP>	4.9	20406	Proteína hipotética

Bxc_C0447	<SIGNALP>	8.6	22701	Proteína del sistema de secreción del tipo IV; VtrB1
Bxc_C0452	<SIGNALP>	4.7	25536	Proteína del sistema de secreción tipo IV
Bxc_C0454	<SIGNALP>	5.9	30916	Proteína de transferencia conjugada TrhG/VtrB9/CagX
Bxc_C0481	<SIGNALP>	8.7	18660	Proteína hipotética
Bxc_C0486	<LIPOP>	6.7	24959	Proteína hipotética
Bxc_C0497	<SIGNALP>	6.5	41115	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0512	<SECRETOMEPP>	5.4	36242	Proteína hipotética
Bxc_C0514	<SIGNALP>	8.6	43283	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0557	<SIGNALP>	10.1	17576	Lipoproteína
Bxc_C0561	<SIGNALP>	7.7	42825	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0570	<SIGNALP>	5.7	39151	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0593	<SIGNALP>	10.3	30311	Regulador transcripcional, familia TetR
Bxc_C0613	<SIGNALP>	7.8	33246	Regulador transcripcional, familia LysR
Bxc_C0641	<SIGNALP>	8.9	27939	Proteína hipotética
Bxc_C0646	<SIGNALP>	8.5	37892	Proteína hipotética
Bxc_C0647	<SIGNALP>	6.2	51076	Proteína hipotética
Bxc_C0648	<SIGNALP>	6.7	61042	Proteína hipotética
Bxc_C0654	<SIGNALP>	10.8	10705	Proteína hipotética
Bxc_C0664	<SIGNALP>	6.6	59950	Putativa piruvato descarboxilasa
Bxc_C0667	<SIGNALP>	6.0	41127	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0694	<SIGNALP>	10.1	10103	Proteína hipotética
Bxc_C0698	<SIGNALP>	6.9	36973	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0705	<SIGNALP>	6.5	27248	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
Bxc_C0710	<SIGNALP>	9.6	53850	Possible intergenas
Bxc_C0723	<SIGNALP>	7.8	79756	Receptor de sideróforo TonB-dependiente
Bxc_C0730	<SIGNALP>	8.1	39077	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0736	<SIGNALP>	8.9	39076	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0773	<SIGNALP>	6.8	54988	Aldehído deshidrogenasa (NAD+)
Bxc_C0776	<SIGNALP>	8.7	28585	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0786	<TAATP>	8.5	56997	Transportador ABC de peptido/opina/niquel, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0789	<SIGNALP>	7.9	71042	Transportador ABC de peptido/opina/nickel, componente ATPasa
Bxc_C0799	<TAATP>	9.1	36206	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0804	<SIGNALP>	9.0	39022	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0813	<SIGNALP>	8.9	25363	Oxidoreductasa, deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
Bxc_C0818	<SIGNALP>	4.1	52968	Proteína hipotética
Bxc_C0829	<SIGNALP>	9.3	38264	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0835	<SIGNALP>	7.2	23382	Enoíl-CoA hidratasa/isomerasa
Bxc_C0843	<SIGNALP>	5.4	39801	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0849	<SIGNALP>	6.9	41294	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0861	<SIGNALP>	8.1	42812	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C0872	<SIGNALP>	10.6	8915	Proteína hipotética
Bxc_C0880	<SIGNALP>	5.8	39684	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0891	<SIGNALP>	6.8	59825	Benzol-CoA oxigenasa componente B
Bxc_C0907	<SIGNALP>	11.8	9938	Proteína hipotética
Bxc_C0910	<SIGNALP>	6.0	37797	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0916	<SIGNALP>	8.2	38987	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C0926	<SIGNALP>	9.0	40521	Proteína de membrana externa (porina)

Bxe_C0929	<TATP>	9.4	34333	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0935	<SIGNALP>	8.0	40361	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_C0949	<SIGNALP>	9.2	43023	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0983	<TATP>	8.7	36606	Transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C0985	<SIGNALP>	6.7	39157	Monooxigenasa de alanosulfonato (monooxigenasa de sulfonatos alifáticos FMNH ₂)
Bxe_C1003	<SIGNALP>	8.8	40570	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C1010	<SIGNALP>	11.3	12557	Proteína hipotética
Bxe_C1012	<SIGNALP>	7.6	40662	Porina de membrana de externa, familia OmpC
Bxe_C1023	<SIGNALP>	5.8	32073	Hidrolasa de pliegue alfa/beta
Bxe_C1024	<SIGNALP>	8.4	34951	Proteína hipotética
Bxe_C1030	<SIGNALP>	8.1	42575	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_C1044	<SIGNALP>	11.8	6726	Proteína/dioxygenasa de resistencia glicosilasa/bicromicina
Bxe_C1047	<SIGNALP>	7.2	35839	Putative lipase/esterase
Bxe_C1049	<SIGNALP>	5.3	84170	Receptor de selenioforo TonB-dependiente
Bxe_C1054	<SIGNALP>	8.9	24467	Proteína TonB
Bxe_C1057	<SIGNALP>	9.0	42671	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_C1069	<SIGNALP>	9.1	45915	Possible fosfolipasa
Bxe_C1073	<SIGNALP>	9.2	23294	Proteína hipotética
Bxe_C1074	<SECRETOMER>	10.5	29782	Proteína hipotética
Bxe_C1088	<SECRETOMER>	5.4	37463	Possible proteína de membrana externa involucrada en exporte de polisacárido
Bxe_C1102	<SIGNALP>	8.7	23461	Proteína hipotética
Bxe_C1103	<LPOP>	4.1	22919	Proteína hipotética
Bxe_C1104	<SIGNALP>	6.3	85264	Proteína hipotética
Bxe_C1112	<SIGNALP>	9.1	36664	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C1115	<SIGNALP>	9.1	40829	Proteína de membrana externa (porina)
Bxe_C1116	<TATP>	9.1	36468	Transportador ABC, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C1127	<SIGNALP>	9.4	72435	Filamentous haemagglutina
Bxe_C1129	<SIGNALP>	9.3	31126	Proteína extracelular de unión a ligando, familia 3
Bxe_C1141	<SIGNALP>	6.4	41025	Proteína de secreción HlyD
Bxe_C1142	<SIGNALP>	5.6	52381	Sistema de secreción HlyD
Bxe_C1145	<SIGNALP>	6.2	47360	Sistema de efujo RNID, lipoproteína de membrana externa, familia NodT
Bxe_C1149	<SIGNALP>	4.3	18260	Sistema de secreción del tipo I
Bxe_C1150	<SIGNALP>	8.5	39366	Proteína de la fimbria
Bxe_C1151	<SIGNALP>	8.9	97401	Proteína fimbrial del tipo-1, subunidad A
Bxe_C1153	<SIGNALP>	5.6	18629	Proteína de membrana externa de biogénesis de la fimbria
Bxe_C1162	<SIGNALP>	5.4	32366	Proteína fimbrial
Bxe_C1169	<SIGNALP>	8.1	26910	Transportador ABC de aminoácido polar, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxe_C1181	<SIGNALP>	9.3	37280	Proteína hipotética
Bxe_C1185	<SECRETOMER>	9.5	19294	Proteína extracelular de unión a ligando, familia 1
Bxe_C1203	<SIGNALP>	8.0	14012	Proteína de membrana externa (porina), familia OmpW
Bxe_C1210	<SECRETOMER>	5.3	11418	Proteína hipotética
Bxe_C1215	<SIGNALP>	9.4	9636	Transportoson modulador protein
Bxe_C1220	<SIGNALP>	11.8	10807	Proteína periplásmica de unión a mercurio
Bxe_C1225	<SIGNALP>	6.9	51670	Proteína hipotética
Bxe_C1227	<SIGNALP>	6.7	12314	Proteína hipotética
Bxe_C1230	<SIGNALP>	9.4	33846	Regulador transcripcional, familia LysR
Bxe_C1231	<SIGNALP>	6.6	41618	Proteína de membrana externa (porina)

Bxc_C1232	<SIGNALP>	8.9	42313	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C1244	<SIGNALP>	10.0	11249	Proteína hipotética
Bxc_C1245	<SECRETOMEP>	4.5	61576	Monooxigenasa
Bxc_C1250	<SIGNALP>	5.9	39279	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C1255	<SIGNALP>	8.8	44663	Transportador ABC de aminoácido ramificado, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C1258	<SECRETOMEP>	8.1	44355	Proteína hipotética
Bxc_C1259	<LIPOP>	8.2	16825	Antígeno de superficie de 17 kDa
Bxc_C1262	<LIPOP>	5.7	49981	Proteína hipotética
Bxc_C1270	<SIGNALP>	8.6	35382	Transportador ABC de zafeta, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C1276	<SECRETOMEP>	5.0	104183	Autotransportador de membrana externa
Bxc_C1279	<SECRETOMEP>	9.2	10281	Proteína hipotética
Bxc_C1290	<SIGNALP>	4.9	59796	Ferulid esterasa
Bxc_C1294	<LIPOP>	4.6	27107	Proteína hipotética
Bxc_C1295	<SIGNALP>	8.8	29230	Proteína extracelular de unión a ligando, familia 3
Bxc_C1298	<LIPOP>	5.0	63698	Proteína hipotética
Bxc_C1310	<SIGNALP>	8.4	41230	Proteína hipotética
Bxc_C1313	<SIGNALP>	5.4	41999	Proteína de membrana externa (porina)
Bxc_C1316	<SIGNALP>	8.3	30312	Proteína extracelular de unión a ligando, familia 3
Bxc_C1321	<SIGNALP>	8.5	33364	Regulador transcripcional, familia LysR
Bxc_C1322	<SIGNALP>	11.9	18469	Proteína hipotética
Bxc_C1330	<SIGNALP>	9.2	29995	Transportador ABC de aminoácido, proteína periplásmica de unión a ligando
Bxc_C1337	<SIGNALP>	6.1	82327	Oxidasa de multicobre
Bxc_C1348	<SIGNALP>	7.9	32957	Proteína periplásmica de unión/regulador transcripcional LacI
Bxc_C1374	<LIPOP>	7.2	16354	Proteína hipotética
Bxc_C1382	<SIGNALP>	5.5	27515	Proteína hipotética
Bxc_C1392	<LIPOP>	7.3	35930	Manoproteína