

UCh-FC
Biotecnología
V-289
C-Λ

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“Caracterización fenotípica a gran escala de cepas de
Escherichia coli deficientes en el metabolismo de los
polifosfatos inorgánicos”**

Seminario de Título
entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniera en Biotecnología Molecular



Macarena Angélica Varas Poblete

Julio, 2016

Santiago, Chile

Director Seminario de Título: Dr. Francisco P. Chávez Espinosa

Codirector Seminario de Título: Dr. Ricardo Cabrera Paucar



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

Macarena Angélica Varas Poblete

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Francisco Chávez Espinosa, sobre una línea horizontal.

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Co-Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Ricardo Cabrera Paucar, sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Nicolás Guiliani
Presidente

Firma manuscrita en azul del Dr. Nicolás Guiliani, sobre una línea horizontal.

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Evaluador

Firma manuscrita en azul del Dr. Marcelo Baeza Cancino, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, julio de 2016



Nací, crecí y cursé toda mi educación escolar en Vallenar, Tercera región, rodeada de mi familia y hermosos referentes naturales como el valle del Huasco, las infinitas playas y el desierto florido. Durante la enseñanza media ya participaba en las Olimpiadas científicas representando a mi colegio y me gustaba el mundo del laboratorio. Siempre conté con el apoyo de mis padres para continuar con mis estudios superiores y el 2006, emigré a Santiago con el fin de ingresar a la Universidad de Chile, sin dudas ha sido la mejor decisión que he tomado en mi vida. Luego de pasar por Bachillerato y enamorarme del Campus Juan Gómez Millas, decidí continuar mis estudios en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. La carrera siempre me pareció fascinante y disfruté mucho de la vida del estudiante de pregrado, conocí a muchas personas, grandes amigos, compañeros, profesores y también al amor de mi vida.. En 2009, me encanté con el mundo de la Microbiología y desde ese año, he dedicado mis días a investigar ese mundo tan pequeño pero a la vez enorme que se esconde sin que podamos verlo a simple vista. En el Laboratorio conocí a buenos amigos y expertos tutores que me enseñaron a desenvolverme en el mundo de la Ciencia. Luego, y por razones que siempre son difíciles de explicar, terminé los ramos, inscribí mi seminario de Título e ingresé inmediatamente al Doctorado en Microbiología. El resto de la historia es fácil de deducir, el doctorado succionó todas mis energías y es por eso que hoy, 5 años después, culmina esta historia que se ha extendido por muchos años. Me siento feliz por cerrar el ciclo, por lograr el título profesional y por llevar 10 años haciendo ciencia.

A mis padres por su larga espera,
A Marmota por su amor incondicional y apoyo infinito.

AGRADECIMIENTOS

Por esta tesis añejada 5 años en roble tengo que agradecer a todos aquellos que me han acompañado durante estos años. Primero, a todos los integrantes del antaño laboratorio del Dr. Carlos Jerez, esa fue mi primera casa, donde aprendí mucho sobre las tertulias científicas y la crítica al trabajo propio. Como no recordar todas los buenos momentos que viví con Chichi, Javi, Ceci, Cristo, Claudio, Paltías, Coto, Don Juan, y el Fran, que siendo mi jefe, me brindó toda su confianza y me dio alas desde el primer día.

También agradezco a Ricardo, por acogerme en su laboratorio, darme su apoyo y siempre creer en mí. Al Daddy, el Amarillo, la Jessy y Matsuda por su amistad y conocimiento en el Laboratorio de Bioquímica.

A Marmota, por ser el mejor, por todos los momentos, las conversaciones científicas y por todo el amor que me entrega desde hace 7 años.

A Vale, Nelo, Papablo, Herny, Piña, Clio, Cathy, Bea, Ariel, Matías, Rulo, Talo, Juanjo, mis compañeros y amigos, que aunque ya no nos vemos tanto por el rumbo que han tomado nuestras vidas científicas o anti-científicas fueron muy importante en esta etapa.

A todos aquellos que pensaron que este día llegaría... mis amigos de la vida, la Naty y el Mabri.

A las chicas de SysMicrolab, Nico, Pai, Coni, Habibi, Chiki y a los chicos, Panchito y Alonso. Ustedes llegaron después a mi vida pero día a día aportan a mi crecimiento como científico... Espérense, la tesis del Doc. va para ustedes.

PUBLICACIONES GENERADAS A PARTIR DE ESTE ESTUDIO

Publicaciones en revistas científicas.

Varas MA, Valdivieso C, Mauriaca C, Ortíz-Severín J, Paradela A, Poblete-Castro I, Cabrera R, Chávez FP. (2016) Multi-level biology analyses of *Escherichia coli* polyphosphate metabolism mutants reveal metabolic adaptation and regulatory role in bacterial resistance. (*Manuscrito en proceso de revisión para su publicación Biochimica et Biophysica Acta*)

Presentaciones a congresos.

Macarena Varas, Cecilia Mauriaca, Carlos A. Jerez, Francisco P. Chávez (2010) Estudios del metabolismo de los polifosfatos en *Escherichia coli* mediante microarreglos fenotípicos: Una aproximación mediante la biología de sistemas. XXXII Congreso Sociedad De Microbiología De Chile. Universidad Católica del Norte, Antofagasta, Chile. **Premio Mejor comunicación oral**

Macarena Varas, Nelson León, Javiera Álvarez, Ricardo Cabrera, Francisco P. Chávez (2012) Physiological characterization of *Escherichia coli* strains deficient in the metabolism of inorganic polyphosphate. XXI Alam Congreso Latinoamericano De Microbiología, Santos, Brasil.

Macarena Varas, Javiera Ortiz-Severín, Francisco P. Chávez (2012) Phenotypic comparison of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains deficient in PPK enzymes (polyphosphate kinase XXI Alam Congreso Latinoamericano De Microbiología, Santos, Brasil.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción	1
1.1. El polifosfato	1
1.2 Metabolismo del polifosfato.	1
1.3 Funciones del poliP	4
1.4 PoliP en <i>Escherichia coli</i>	7
1.5. Aproximaciones a gran escala para el estudio del metabolismo de los polifosfatos inorgánicos	7
1.5.1. Microarreglos de ADN	9
1.5.2. Proteómica cuantitativa	10
1.5.3. Microarreglos fenotípicos.....	11
1.6. Objetivo general	14
1.7. Objetivos específicos	14
2. Materiales y Métodos	15
2.1. Materiales	15
2.1.1. Cepas bacterianas	15
2.1.2. Medios de cultivo	15
2.2. Métodos	16
2.2.1. Curvas de crecimiento en matraz	16
2.2.2. Curvas de crecimiento en sistema de biorreactor	16
2.2.2.1. Diseño y montaje experimental	16
2.2.2.2. Monitoreo del consumo de oxígeno.....	17
2.2.3. Microarreglos fenotípicos.....	19
3. Resultados	20

3.1 Curvas de crecimiento en matraz utilizando diferentes medios de cultivo.....	20
3.1.1. Curvas de crecimiento en medio nutritivo Luria Bertani (LB)	20
3.1.2. Curvas de crecimiento en medio mínimo M9-glucosa.....	22
3.2. Curvas de crecimiento en biorreactor con sistema por lote en medio mínimo M9-glucosa	24
3.3. Cambios fenotípicos a gran escala evaluados mediante microarreglos fenotípicos.	26
4. Discusión	36
4.1 Curvas de crecimiento y parámetros cinéticos de crecimiento	36
4.2. Cambios fenotípicos a gran escala evaluados mediante microarreglos fenotípicos.	39
5. Conclusiones	42
6. Anexos	43
7. Bibliografía	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El polifosfato inorgánico. A. Molécula del polímero formado por orotfosfato. B. Ecuación de las actividades enzimáticas de PPK en <i>E. coli</i>. C. Ecuación de la actividad enzimática de PPX en en <i>E. coli</i>	2
Figura 2: Combinación de estudios a gran escala para establecer nuevas hipótesis biológicas en el estudio de los polifosfatos inorgánicos.	8
Figura 3: Distribución de los ensayos en el set de 20 placas de 96 pocillos realizados en los microarreglos fenotípicos.	11
Figura 5. Curvas de crecimiento en matraz en medio nutritivo Luria Bertani.	22
Figura 6. Curva de crecimiento en matraz en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa.	23
Figura 7. Parámetros de crecimiento obtenidos a partir de cultivos en un biorreactor con sistema por lote. A. Curva de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa B. Disponibilidad de O₂ en el medio de cultivo en función del tiempo.	26
Figura 8. Representación gráfica de resultados en microarreglos fenotípicos. A. Pérdida fenotípica B. Ganancia fenotípica.	27
Figura 9. Resultados de PMs para las cepas mutantes en comparación con cepa silvestre. A. $\Delta ppk1$, B. Δppx, C. $\Delta poliP$.	28
Figura 10. Diagramas de Venn para clasificar los resultados de PMs. A. Ganancias fenotípicas, B. Pérdidas fenotípicas.....	29
Figura 11. Perfiles fenotípicos. A. Metabolismo de fuentes de Carbono B. Metabolismo de fuentes de Fósforo	31
Figura 12. Perfiles fenotípicos. A. Metabolismo de fuentes de Nitrógeno B. Metabolismo de fuentes de Fósforo.....	33
Figura 13. Perfiles fenotípicos. Sensibilidad a antibióticos de diferentes familias.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	15
Tabla 2. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en medio LB.....	22
Tabla 3. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa.	24
Tabla 4. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en biorreactor con sistema por lote en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa.	25
Tabla S1. Ganancias y pérdidas fenotípicas para la cepa mutante $\Delta ppk1$	43
Tabla S2. Ganancias y pérdidas fenotípicas para la cepa mutante Δppx	47
Tabla S3. Ganancias y pérdidas fenotípicas para la cepa mutante $\Delta poliP$	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP: Adenosin difosfato
ARN: Ácido ribonucleico
ATP: Adenosin trifosfato
C: Carbono
D.O.: Densidad óptica a 600 nanómetros
GPP: Enzima guanosina pentafosfatasa fosfohidrolasa
GTP: Guanosin trifosfato
ICPL: "Isotope-coded protein labelling"
LB: Luria Bertani
N: Nitrógeno
NADH: Nicotin adenin dinucleótido reducido
P: Fósforo
Pi: Fosfato inorgánico
PMs: Microarreglos fenotípicos
poliP: Polifosfato inorgánico
pppGpp: Guanosina pentafosfato
ppGpp: Guanosina tetrafosfato
ppk1: Gen que codifica para la enzima PPK1
PPK1: Enzima polifosfato quinasa 1
PPK2: Enzima polifosfato quinasa 2
ppx: Gen que codifica para la enzima PPX
PPX: Enzima exopolifosfatasa
rpm: Revoluciones por minuto
S: Azufre
U.A.: Unidades de absorbancia

RESUMEN

Los polifosfatos (poliP) son biopolímeros lineales que se han encontrado en todos los seres vivos y están formados por residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido. Los poliP se sintetizan a partir de ATP en una reacción catalizada por la polifosfato kinasa (PPK1) y se degradan a fosfato inorgánico (Pi) por la acción de la exopolifosfatasa (PPX). Cuando se eliminan los polifosfatos, ya sea por delección del gen *ppk* o sobreexpresión del gen *ppx*, se produce una alteración en funciones celulares importantes como la motilidad, el quórum sensing, la formación de biopelículas y la virulencia, entre otras. Sin embargo, aún se desconocen los detalles moleculares que están detrás de estas alteraciones o sobre los ajustes metabólicos que permiten la sobrevivencia de la célula ante dicha carencia. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio analizaron los cambios a nivel transcriptómico y proteómico asociados a cepas mutantes de *Escherichia coli* deficientes en las enzimas responsables del metabolismo de los polifosfatos. Con el objetivo de complementar los datos obtenidos anteriormente, nos propusimos caracterizar fenotípicamente las cepas mutantes anteriormente mencionadas a gran escala. Para esto primeramente se realizaron curvas de crecimiento en medios de cultivo nutritivo (LB) y mínimo (M9) con el fin de determinar los parámetros cinéticos de crecimiento y luego se realizaron los ensayos fenotípicos a gran escala, mediante la tecnología de microarreglos fenotípicos (Biolog). Los resultados indican que los tiempos generacionales obtenidos para las cepas en estudio fueron similares cuando se cultivaron en un medio nutritivo (LB). Sin embargo, las cepas mutantes tuvieron tiempos generacionales más extensos que la cepa silvestre cuando fueron crecidos en medio mínimo M9 suplementado con glucosa. Por su parte, en los microarreglos fenotípicos se observaron 161 ganancias y 24 pérdidas fenotípicas

para la cepa $\Delta ppk1$, 36 ganancias y 53 pérdidas fenotípicas para la cepa Δppx , y 252 ganancias y 7 pérdidas fenotípicas para la cepa $\Delta poliP$. Estos cambios se relacionaron con el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, así como a la sensibilidad frente a compuestos químicos tales como antibióticos de diferentes familias. Los cambios fenotípicos observados en la cepa $\Delta poliP$ coinciden con los cambios obtenidos para la cepa mutante $\Delta ppk1$, lo que sugiere una mayor contribución del gen *ppk1* al fenotipo de la cepa doble mutante. Estos resultados se correlacionaron con los estudios anteriores de genómica funcional y proteómica cuantitativa. Los resultados de esta investigación permitieron corroborar que los poliP regulan procesos celulares relacionados con el metabolismo central y su deficiencia en la célula provocan un aumento en la sensibilidad a diferentes antibióticos.

ABSTRACT

Polyphosphates (polyP) are linear biopolymers of orthophosphate residues bound together by phosphoanhydride bonds, which are found in all domains of life. The synthesis of polyP starting from ATP is catalyzed by the polyphosphate kinase 1 enzyme (PPK1), while they are degraded to inorganic pyrophosphate (Pi) through the action of the exopolyphosphatase enzyme (PPX). Disruption of polyP synthesis, either by deleting *ppk1* or overexpressing *ppx*, causes the alteration of main cellular functions such as motility, quorum sensing, biofilm formation and virulence. However, the molecular details behind those metabolic alterations and how the cell overcomes the impact of those changes remains poorly understood. Our previous studies have analyzed the global transcriptomic and proteomic changes associated to mutants deficient in the enzymes responsible of polyP metabolism. With the aim of complementing those analyses, we performed a global phenotypic characterization of the mutant strains mentioned above. Growth curves were constructed in both complete (LB) and minimal (M9) media and kinetics parameters were determined. Also, a large-scale phenotypic profiling was performed using phenotypic microarray technology (Biolog). Results indicated that the growth parameters were similar for all the strains in complete medium (LB), but differed in minimal medium (M9), where all mutant strains showed higher values than the wild type. Additionally, 161 phenotypic gains and 24 phenotypic losses were observed for $\Delta ppk1$, 36 gains and 53 losses for Δppx , and 252 gains and 7 losses for $\Delta poliP$. These changes were related to carbon, nitrogen, phosphorous and sulfur metabolism, and also with the sensitivity to different chemical compounds such as antibiotics from different families. Phenotypic changes observed in the $\Delta poliP$ strain were similar to those observed for $\Delta ppk1$ strain, suggesting a major contribution of the absent of *ppk1* in the

phenotype of the double mutant. These results correlated with those obtained previously through global functional genomics and quantitative proteomics analyses. Additionally, we confirmed that polyP participates in central metabolic processes, and its deficiency cause an increase in the sensitivity of the bacterial cells to different antibiotics.

1. Introducción

1.1. El polifosfato

El polifosfato inorgánico (poliP) es un polímero lineal formado por centenas de residuos de ortofosfato que se encuentran unidos mediante los enlaces fosfoanhídrido (Kornberg, 1995) (**Figura 1A**). Este polímero está ampliamente distribuido en todos los reinos de la vida: bacterias, arqueas, hongos, protozoos, plantas y animales (Kornberg y cols., 1999). La enzima PPK1 encargada de su síntesis, está presente en muchos organismos procariontes, mientras que sólo se ha encontrado un gen ortólogo en el organismo eucarionte simple *Dictyostelium discoideum* (Rao y cols., 2009), que comparte un 30% de identidad y 51% de similitud con la enzima PPK1 de *Escherichia coli* (*E. coli*). Sin embargo, aún se desconoce qué enzima sería la responsable de sintetizar el poliP en la mayoría de organismos eucariontes.

En los organismos procariontes, el PoliP está distribuido tanto en el citoplasma como asociado a la membrana plasmática y al periplasma. Además, algunas bacterias como *Pseudomonas* sp. B4 son capaces de acumular grandes cantidades de PoliP en formas de gránulos visibles mediante microscopía electrónica (Chávez y cols., 2006).

Los niveles de PoliP en la célula varían dependiendo de las condiciones fisiológicas y/o ambientales a las que esté expuesta la bacteria (Kornberg y cols., 1999). Por ejemplo, bajo condiciones de estrés y carencia de nutrientes, se observa un aumento en los niveles de PoliP en la célula.

1.2 Metabolismo del polifosfato.

El metabolismo del poliP en la célula es dinámico, y su nivel celular está determinado principalmente por la acción de dos enzimas: la polifosfato quinasa (PPK1)

y la exopolifosfatasa (PPX). Los genes que codifican estas dos enzimas han sido estudiados por su influencia en el metabolismo de los poliP (Akiyama y col., 1993).

La enzima PPK1 cataliza la polimerización del poliP, mediante la transferencia del fosfato terminal del ATP al poliP (Figura 1B). Esta reacción es reversible, dando lugar a la síntesis de ATP a partir de ADP y poliP, sólo cuando existe un exceso de ADP (Ahn y Kornberg, 1990). En algunas bacterias existe un parálogo de la PPK1, la polifosfato quinasa 2 (PPK2), la que en condiciones normales cumple funciones esencialmente distintas. Esta enzima se encontró en mutantes nulos del gen *ppk1* en *Pseudomonas aeruginosa*, y es la responsable de la síntesis del 20% del poliP que se encuentra en dichos mutantes que no poseen la PPK1 (Zhang y cols., 2002). La cinética de la PPK2 favorece 75 veces la reacción de síntesis del GTP a partir de los poliP; y para la síntesis de los poliP puede utilizar tanto ATP como GTP, a diferencia de la PPK1 que usa preferentemente ATP (Ishige y cols., 2002).

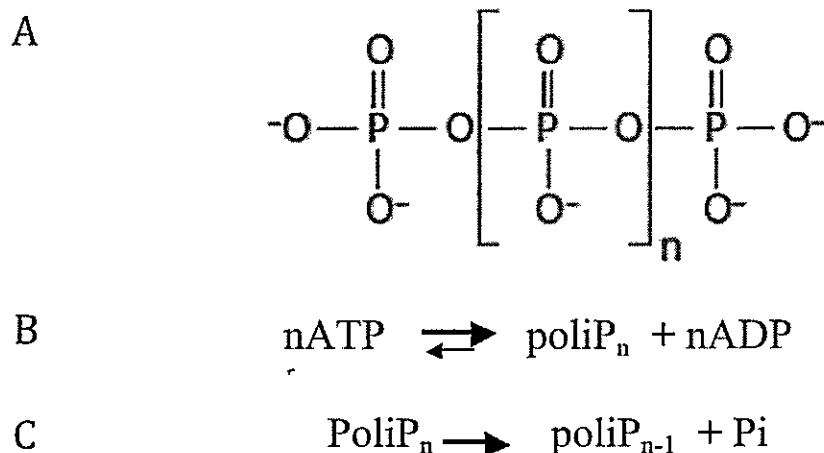


Figura 1. El polifosfato inorgánico. A. Molécula del polímero formado por orotfosfato. B. Ecuación de las actividades enzimáticas de PPK en *E. coli*. C. Ecuación de la actividad enzimática de PPX en en *E. coli*

Por otro lado, la enzima exopolifosfatasa (PPX) hidroliza los extremos de las cadenas de poliP, liberando fosfato inorgánico (Pi) (**Figura 1C**) (Kornberg y cols., 1999). También es posible encontrar otra proteína con actividad exopolifosfatasa: la guanosina pentafofosfatasa fosfohidrolasa (GPP) (Reizer y cols., 1993), que es la enzima encargada de hidrolizar guanosina pentafofosfato a guanosina tetrafofosfato (pppGpp a ppGpp) durante la respuesta a estrés nutricional (Keasling y cols., 1993). La GPP, a diferencia de la PPX, es activa sobre cadenas de poliP de hasta 40 residuos (Keasling y cols., 1993). De estas dos, la más importante respecto a la influencia que ejerce sobre los niveles de poliP es la PPX (Akiyama y col., 1993).

Los niveles del poliP pueden ser manipulados genéticamente a través de la inactivación o sobreexpresión de alguno de los genes involucrados en el metabolismo de estos compuestos (Kornberg y cols., 1999; Chávez y cols., 2009). La sobreexpresión del gen *ppk1*, mediante un plásmido de alto número de copias resulta en un aumento de los niveles de los poliP de hasta 100 veces (Kornberg y cols., 1999). Adicionalmente, es posible disminuir los niveles de los poliP en la célula mediante la sobreexpresión de la PPX. Esta estrategia es especialmente útil cuando la bacteria posee más de un gen que expresa una PPK en su genoma (como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*), o cuando el gen que codifica la enzima con actividad polifosfatoquinasa no se conoce y por lo tanto no es posible la construcción de cepas mutantes (Chávez y cols., 2009).

Los niveles de poliP en las células fluctúan enormemente según el estado celular, el medio de cultivo utilizado y la fase del crecimiento (Kornberg y cols., 1999). Esta variación generalmente se condice con los cambios en la actividad de las enzimas PPK1 y PPX. Por ejemplo, en *E. coli* los niveles más altos de actividad PPK1 se alcanzan cuando las células están en el inicio de la fase estacionaria, momento en el cual

la actividad PPX es menor (Kornberg y cols., 1999). Además de las variaciones mencionadas anteriormente, existe una variación intrínseca del nivel estacionario del poliP (concentración estable de poliP dentro de la célula) que en *E. coli* llega ser de un 20 % en idénticas condiciones de crecimiento (Van Dien y cols., 1997).

1.3 Funciones del poliP

Muchas funciones se le han adjudicado a este polímero en los microorganismos, entre las que destacan:

1) Fuente de energía para la síntesis del ATP

Las enzimas fosfotransferasas como PPK, AMP-fosfotransferasa y adenilato quinasa pueden utilizar el poliP como sustrato para la síntesis de ADP y ATP. El poliP puede ser un fosfógeno en la célula cuando sus niveles son mucho mayores que los niveles de ATP. En *E. coli*, los niveles de poliP son mayores durante una situación de estrés, lo que conduciría a la síntesis de ATP (Kornberg y cols., 1999).

2) Sustituto del ATP en las reacciones de fosforilación

El poliP se comporta como sustituto del ATP en las reacciones de fosforilación. Algunas glucoquinasas utilizan ATP y/o PoliP como donante de grupos Pi, mientras que las especies más antiguas filogenéticamente poseen una estricta preferencia por los PoliP, como en el caso de la glucoquinasa de *Microlunatus phosphovorius* (Hsieh y cols., 1993; Kornberg, 1995; Tanaka y cols., 2003).

3) Reserva de Pi

El poliP permite mantener un nivel estable de Pi en la célula, el cual es esencial para el metabolismo y crecimiento bacteriano. A través de la acción de las

enzimas exopolifosfatasas, el poliP es hidrolizado en su cadena terminal permitiendo la liberación de Pi. (Kornberg y col., 1999).

4) Quelante de cationes divalentes

Dada la condición de polianión del poliP, puede actuar como quelante de metales, participando en la detoxificación de algunos metales pesados como Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} y Cd^{+2} . Mediante la unión del poliP con estos cationes divalentes se reduce su toxicidad en la célula. Además, la entrada de los metales catiónicos a la célula estimula la actividad exopolifosfatasa (Keasling y Hupf, 1996).

5) Amortiguador intracelular frente al álcali

El alga verde halotolerante *Dunaliella* acumula grandes cantidades de poliP en las vacuolas. Cuando se presenta un estrés por pH alcalino, compuestos químicos como las aminas entran en las vacuolas y son neutralizadas por los protones liberados de la hidrólisis enzimática del poliP (Pick U. y Weiss M. 1991). Se presume que una polifosfatasa activada por aminas produce tri-poliP por mecanismos que aún no han sido determinados.

6) Regulador del desarrollo celular

En *Myxococcus xanthus*, la culminación del crecimiento vegetativo está acompañada de altos niveles de poliP y un aumento de 10 veces de la actividad poliP-AMP-fosfotransferasa. A niveles elevados, el poliP puede contribuir de diversas maneras al desarrollo de cuerpos fructíferos y esporas (Voelz y cols. 1966; Zhang y cols., 2005). Además en la ameba social *D. discoideum* (uno de los pocos organismos eucariontes que poseen un ortólogo de la PPK1 bacteriana) los poliP son esenciales para el desarrollo social y particularmente para la formación de los cuerpos fructíferos (Zhang y cols., 2007).

7) Modulador de la virulencia

El gen *ppk1* es conservado en muchas bacterias patógenas. La delección de este gen en distintos enteropatógenos provoca una reducción de la movilidad sobre agar semisólido, lo que se correlaciona con una pérdida en la capacidad para invadir y establecer una infección sistémica en las células del hospedero (Rashid y cols., 2000). Por otra parte, los factores de virulencia son generalmente expresados en fase estacionaria, etapa en la cual se ha descrito que tanto la enzima PPK1 como los poliP son necesarios para la sobrevivencia de *E. coli* en medio de cultivo (Kornberg y cols., 1999)

8) Regulador de los ajustes celulares ante condiciones de carencia y estrés

Dado que los niveles de poliP varían en respuesta a las condiciones nutricionales, éste polímero forma parte de una red de respuestas que regulan los procesos celulares y la expresión de algunos genes, al unirse con los dominios básicos de las polimerasas. En *E. coli*, la privación de aminoácidos desencadena la activación de la enzima RelA, que cataliza la síntesis de guanosina pentafofosfato (pppGpp), el cual es hidrolizado a guanosina tetrafofosfato (ppGpp) por la acción de la enzima GPP. El ppGpp es un potente mensajero secundario que dirige la respuesta al estrés, ya que reprime la expresión génica de distintos ARN y proteínas ribosomales e inhibe la hidrólisis del poliP por la enzima exopolifosfatasa. Esto a su vez provoca la acumulación de este polímero y su unión a proteínas ribosomales libres, convirtiéndose en sustrato para la proteasa Lon, que degrada las proteínas unidas al poliP y de esta forma restaura la disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de proteínas (Rao y cols., 2009).

Además, se ha observado un aumento en los niveles celulares de (p)ppGpp en condiciones deficientes de Pi, carbono y nitrógeno (Kornberg y cols., 1999).

1.4 PoliP en *Escherichia coli*

E. coli posee un operón que contiene los genes *ppk1* y *ppx* que codifican para las enzimas PPK1 y PPX, respectivamente. En el genoma se encuentra codificado el gen *ppk1* río arriba del gen *ppx*, con una distancia entre ellos de solo 7 pares de bases (Crooke y cols., 1994). En cuanto a la regulación del operón *poliP*, se postula que sería regulado por el sistema de dos componentes *PhoBR*, aunque evidencias posteriores sugieren lo contrario (Kornberg y cols., 1999).

E. coli carece de la enzima PPK2, responsable de sintetizar PoliP reversiblemente a partir de GTP y no es capaz de acumular grandes cantidades de PoliP (0,1-50 mM), aunque la carencia de este biopolímero inhabilita su sobrevivencia en la fase estacionaria de crecimiento (Kornberg y cols., 1999).

Las ventajas del uso de *E. coli* como organismo modelo para el estudio del metabolismo de los poliP se deben a su rápido crecimiento, su facilidad de manipulación genética y a la disponibilidad de su genoma secuenciado y anotado. Además, en esta bacteria han sido ampliamente estudiados muchos procesos celulares, lo que la ha convertido en uno de los modelos biológicos que más datos ha generado a nivel global (genómica, proteómica y bioinformática).

1.5. Aproximaciones a gran escala para el estudio del metabolismo de los polifosfatos inorgánicos

Debido a que los polifosfatos poseen distintas funciones y están relacionados con diversos procesos celulares, se requiere de estudios a gran escala para determinar cuáles

son los procesos celulares involucrados durante la alteración del metabolismo de los PoliP. Estos estudios a gran escala pueden realizarse tanto a nivel transcriptómico, como a nivel proteómico o fenotípico, lo que permite obtener una visión integrada de la respuesta celular. Así, es posible obtener información acerca de la transcripción, la regulación y expresión génica, la localización e interacción de las proteínas y por último los cambios fenotípicos o celulares que ocurren en cepas de *E. coli* que presentan deficiencias en el metabolismo de los poliP. Al integrar los datos obtenidos mediante todas estas técnicas a gran escala es posible establecer modelos matemáticos que permitan generar nuevas hipótesis biológicas que ayuden a la comprensión e interacción de las múltiples funciones de los poliP en la célula (**Figura 2**).

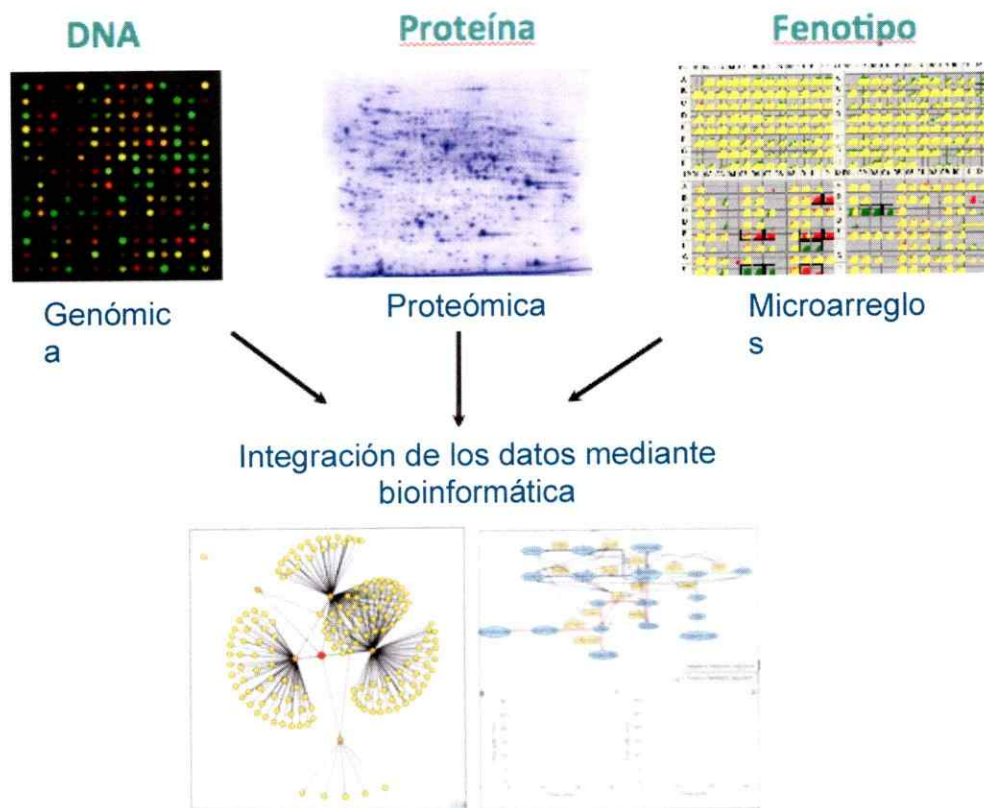


Figura 2. Combinación de estudios a gran escala para establecer nuevas hipótesis biológicas en el estudio de los polifosfatos inorgánicos.

1.5.1. Microarreglos de ADN

Para evaluar los cambios en el transcriptoma que ocurren durante la alteración en el metabolismo de los poliP, nuestro laboratorio generó tres cepas mutantes derivadas de *E. coli* K-12 que poseen diferentes deleciones en los genes involucrados en el metabolismo de los poliP. Las tres cepas mutantes obtenidas fueron dos simples mutantes $\Delta ppk1$, Δppx y la doble mutante $\Delta ppk1\text{-}ppx$ o $\Delta poliP$. La cepa silvestre y las tres cepas mutantes fueron crecidas hasta fase exponencial y se extrajo el ARN que se utilizó para sintetizar el ADNc que fue hibridado en un microarreglo que contiene 4608 oligonucleótidos de 50-mer para *E. coli* (MGWBiotech). Los genes expresados diferencialmente para cada mutante se encuentran depositados en NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) bajo el número de acceso GSE29954 (Varas, Valdivieso y cols. 2016).

Curiosamente, en las tres cepas mutantes los genes flagelares *flgG*, *fliA*, *fliS* y el gen adhesina tipo fimbria *ycbQ* fueron regulados negativamente, lo que comprueba que las cepas mutantes son deficientes en la capacidad de moverse debido a la imposibilidad de formar un flagelo funcional. Posteriormente, este resultado fue comprobado a través de microscopía electrónica de transmisión y barrido (Varas, Valdivieso y cols. 2016).

Particularmente, en la cepa mutante $\Delta ppk1$ se observó un incremento en las vías del metabolismo central como son la glicólisis, el ciclo de Krebs, la respiración y la fermentación anaeróbica. Otros procesos afectados en las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx fueron el metabolismo del mensajero secundario (p)ppGpp y los sistemas toxinas-antitoxinas tipo II. Estos dos procesos están directamente relacionados con el fenómeno

de persistencia, donde el mensajero secundario ppGpp es el regulador maestro (Maisonneuve y cols., 2013).

1.5.2. Proteómica cuantitativa

Para complementar los resultados obtenidos a través de los microarreglos de ADN, nuestro laboratorio cuantificó los cambios en el perfil proteómico de las cepas deficientes en el metabolismo de los poliP utilizando una técnica de marcaje isotópico denominada ICPL por sus siglas en inglés “isotope-coded protein labelling” (Paradela y cols., 2010).

Los resultados obtenidos permitieron corroborar los datos de los microarreglos de ADN, ya que en la cepa mutante $\Delta ppk1$ también se observó un incremento en las vías del metabolismo central como la glicólisis, el ciclo de Krebs, la fermentación anaeróbica y la respiración aeróbica y anaeróbica (Valdivieso, 2011).

Adicionalmente, se describe un comportamiento contrastante en procesos como la glicólisis y el ciclo de Krebs entre las mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx . En la mutante $\Delta ppk1$ como se describió anteriormente se observó un aumento en estos procesos documentado tanto por microarreglos de ADN como por proteómica cuantitativa, mientras que la mutante Δppx presentó una disminución en dichos procesos. Este comportamiento contrastante entre ambas cepas puede ser atribuido al regulador transcripcional ArcA, quien actúa como represor de la transcripción bajo condiciones de anaerobiosis. En la cepa mutante $\Delta ppk1$ se pudo detectar una disminución en los niveles de la proteína ArcA en comparación con la cepa silvestre, mientras que para la cepa mutante Δppx se obtuvo

niveles aumentados de esta proteína, lo que explicaría el efecto contrastante en las vías de glicólisis y ciclo de Krebs. (Valdivieso, 2011).

1.5.3. Microarreglos fenotípicos.

Para completar y corroborar los datos obtenidos con las técnicas anteriormente descritas, el uso de los microarreglos fenotípicos ofrece una mirada celular de los procesos biológicos involucrados ante la deficiencia en el metabolismo de los poliP.

Los microarreglos fenotípicos (PMs) son una tecnología reciente que permite el monitoreo y análisis simultáneo de cerca de 2000 fenotipos celulares. Estos ensayos están distribuidos en un set de 20 placas de 96 pocillos, donde la mitad de estos miden el metabolismo celular básico y respuesta a estrés, y el resto de los ensayos determina la sensibilidad química a 240 inhibidores en 4 concentraciones diferentes (**Figura 3**) (Bochner, 2001).



Figura 3. Distribución de los ensayos en el set de 20 placas de 96 pocillos realizados en los microarreglos fenotípicos.

Los ensayos son realizados en un medio de cultivo que contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano como fuentes de C, N, P, S, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, el cuál varía en composición dependiendo del metabolismo que se desea analizar. Primero, las bacterias son crecidas previamente en un medio pobre en nutrientes, lo que conlleva a un agotamiento de las reservas nutricionales. Luego, para medir el metabolismo de diferentes fuentes nutricionales presentes en las placas PM1 y PM2 (como por ejemplo carbono), se agrega a cada pocillo el medio de cultivo mínimo definido pero que no posee ninguna fuente de carbono, y posteriormente se agrega el compuesto a analizar y la suspensión bacteriana. De la misma manera se realizan los ensayos de las placas PM2, PM3, PM4, PM5, PM6, PM7 y PM8, los cuales miden el metabolismo de diferentes fuentes de nitrógeno, fosforo y azufre. (Bochner, 2001 y 2009).

Durante los ensayos el equipo OMNILOG monitorea el proceso de respiración celular mediante el uso del cromógeno violeta de tetrazolio, el cual está presente en todos los pocillos del set de placas. El sistema se basa en la reducción irreversible de este colorante, el cual se torna de color morado, lo que permite una cuantificación de la aparición de este color en cada pocillo durante el tiempo que dura el ensayo (24-48 horas).

El proceso de respiración celular es el proceso de oxidación de la materia orgánica en presencia de oxígeno que produce la liberación de CO₂, H₂O y energía. Un ejemplo de este proceso es la degradación completa de una molécula de glucosa que comprende los procesos de glicólisis, descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, ciclo de Krebs, y cadena respiratoria, lo que en conjunto liberan moléculas de CO₂, H₂O



y energía como el ATP y NADH. Los electrones que van desde el NADH hacia la cadena transportadora de electrones son los que reducen el violeta de tetrazolio para dar la coloración morada en cada pocillo con diferentes intensidades dependiendo de la capacidad del microorganismos para metabolizar y degradar dicho compuesto. Así mientras más rápido es el flujo metabólico, más rápidamente aparece el color púrpura y aumenta la tasa de respiración celular en la célula.

La ventaja de usar este mecanismo celular como indicador y no la tasa de crecimiento bacteriano son explicadas principalmente por el hecho de que muchas células son capaces de responder metabólicamente con un aumento en la tasa de respiración y no con un aumento en el crecimiento. Por otra parte, permite la cuantificación de más rutas celulares, por ejemplo, *E. coli* presenta una ruta para la enzima formato deshidrogenasa que puede ser detectada por respiración pero no por crecimiento, ya que *E.coli* es incapaz de crecer en formato como única fuente nutricional.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este seminario de título nos propusimos analizar los cambios fenotípicos que ocurren en los mutantes del metabolismo de los poliP en *E. coli* pero también hacer un análisis bioinformático integrativo de todos los datos obtenidos a nivel transcriptómico, proteómico, y los datos celulares que se obtengan mediante los microarreglos fenotípicos.

1.6. Objetivo general

Estudiar los cambios celulares globales (fenotipos) que se producen en mutantes nulos del metabolismo de los polifosfatos en *E. coli* frente a diferentes fuentes nutricionales y compuestos químicos mediante el uso de microarreglos fenotípicos.

1.7. Objetivos específicos

1. Generar curvas de crecimiento en medio nutritivo LB y medio mínimo M9 para determinar la constante de crecimiento y el tiempo generacional.
2. Desarrollar un protocolo para ensayos en biorreactor con sistema por lote para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento y el consumo de oxígeno.
3. Realizar microarreglos fenotípicos (PMs) para cada una de las cepas y su comparación con respecto a estudios moleculares a gran escala realizados previamente (transcriptómica y proteómica).

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Cepas bacterianas

En este estudio se utilizó *Escherichia coli* K-12 y tres cepas mutantes por delección derivadas de ésta (Tabla 1). Las cepas mutantes fueron obtenidas mediante un método de mutación sitio-dirigida (Wanner y Datsenko, 2000).

Tabla I. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Características	Fenotipo
K-12	ATTC®29425	Cepa control
$\Delta ppk1$	Derivada de K-12 que carece del gen <i>ppk1</i>	Cepa que no puede sintetizar poliP
Δppx	Derivada de K-12 que carece del gen <i>ppx</i>	Cepa que no puede degradar poliP
$\Delta poliP$	Derivada de K-12 que carece del operón <i>ppk1-ppx</i>	Cepa que no puede sintetizar ni degradar poliP

2.1.2. Medios de cultivo

Se utilizó el medio nutritivo de cultivo denominado Luria-Bertani (LB) que contiene 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. Las placas de medio LB sólido se prepararon sobre placas Petri con medio LB y agar al 1.5%. Además se utilizó el medio mínimo de cultivo denominado M9 que contiene M9 base, polisal, 2 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂, 0,3 μM de tiamina y 5 g/L de glucosa. La solución M9 base contiene 0,8 g/L de NH₄Cl, 0,5 g/L de NaCl, 0,6 g/L de Na₂HPO₄ y 3 g/L de KH₂PO₄. Las sales adionadas al medio contienen 1,8 mg/L de ZnSO₄, 1,2 mg/L de CuCl₂, 1,2 mg/L de MnSO₄, 1,8 mg/L de CoCl₂ y 10 mg/L de FeCl₃.

2.2. Métodos

2.2.1. Curvas de crecimiento en matraz

Se realizaron ensayos de crecimiento bacteriano en matraces utilizando medio LB y medio mínimo M9 suplementado glucosa.

En matraces de 125 mL se mezclaron 25 mL de medio LB con 50 µL de un cultivo de noche crecido en medio LB y se incubaron a 37°C con agitación (150 rpm). Durante las primeras 2 horas se midió la DO₆₀₀ cada 45 minutos y luego se midió cada 30 minutos hasta llegar a la fase estacionaria. Cuando las mediciones de DO₆₀₀ fueron superiores a 0,8 unidades de absorbancia (U.A) se realizaron diluciones de las muestras. Cada cepa se creció por triplicado.

Además, se realizaron curvas de crecimiento en matraces de 125 mL con 25 mL de medio M9 suplementado con 5 g/L de glucosa y se mezcló con 50 µL de cultivo de noche crecido en medio LB y se procedió al igual que en el procedimiento anterior.

2.2.2. Curvas de crecimiento en sistema de biorreactor

2.2.2.1. Diseño y montaje experimental

Se realizaron curvas de crecimiento en un biorreactor con sistema por lote y cada una de las cepas se ensayó por triplicado, de modo de validar el método y los resultados. Para cada experimento, se dispuso de un cultivo de noche fresco crecido en medio LB, con el cual se inoculó un matraz de 125 mL con 32 mL de medio M9 suplementado con 5 g/L de glucosa. Este volumen de pre-inóculo representa el 2% del volumen total

presente en el biorreactor. Por otra parte, en paralelo se autoclavó el filtro de aire y el biorreactor que contenía agua, M9 y las sales del medio.

Al día siguiente, se verificó el crecimiento bacteriano en el matraz y se dispuso el baño termoregulado a temperatura en 40,4°C para obtener una temperatura final dentro del biorreactor de 37°C. Posteriormente se instaló el filtro de aire estéril y las mangueras correspondientes al influjo de aire, el cual se estableció en 6 mg/L de oxígeno, y la manguera que permite el eflujo de aire fue abierta. Se agregaron los componentes faltantes al medio como CaCl₂, MgSO₄, tiamina, glucosa y antiespumante. Luego de tener el medio nutritivo, se esterilizaron con etanol los sensores de oxígeno y pH. Se calibró el sensor de pH con el oxígeno presente en el ambiente y luego se instalaron ambos sensores en el biorreactor. El sensor de pH monitorea constantemente el cambio de pH en el medio y cuando éste desciende del valor 7, agrega automáticamente gotas de NaOH 0,5 M hasta llegar nuevamente a pH 7. El mecanismo de uso del sensor de oxígeno se explica en la siguiente sección. Una vez instalados los sensores y el flujo de aire se puso el biorreactor dentro del baño termoregulado, se instaló el rotor y se aumentó progresivamente la velocidad hasta llegar a 800 rpm. Finalmente, se agregó el pre-inóculo al biorreactor, y se registró el crecimiento bacteriano mediante la medición de absorbancia a 600 nm (**Figura 4**).

2.2.2.2. Monitoreo del consumo de oxígeno

El sensor de oxígeno funciona a través de un minicontrolador que permite monitorear continuamente los cambios en la disponibilidad de oxígeno en el medio. Una vez instalado el sensor en el biorreactor, el oxígeno disponible en el medio es cercano a 6 mg/L, valor que se mantiene constante aproximadamente durante la primera hora del

experimento. Luego, la disponibilidad de oxígeno disminuye considerablemente hasta llegar a valores cercanos a 2 mg/L y posterior a esto, hay un aumento drástico en la disponibilidad de oxígeno en el medio. Todos estos cambios se pueden deber a las distintas fases del crecimiento bacteriano y serán explicadas en la sección de resultados y discusión (**Figura 4**).

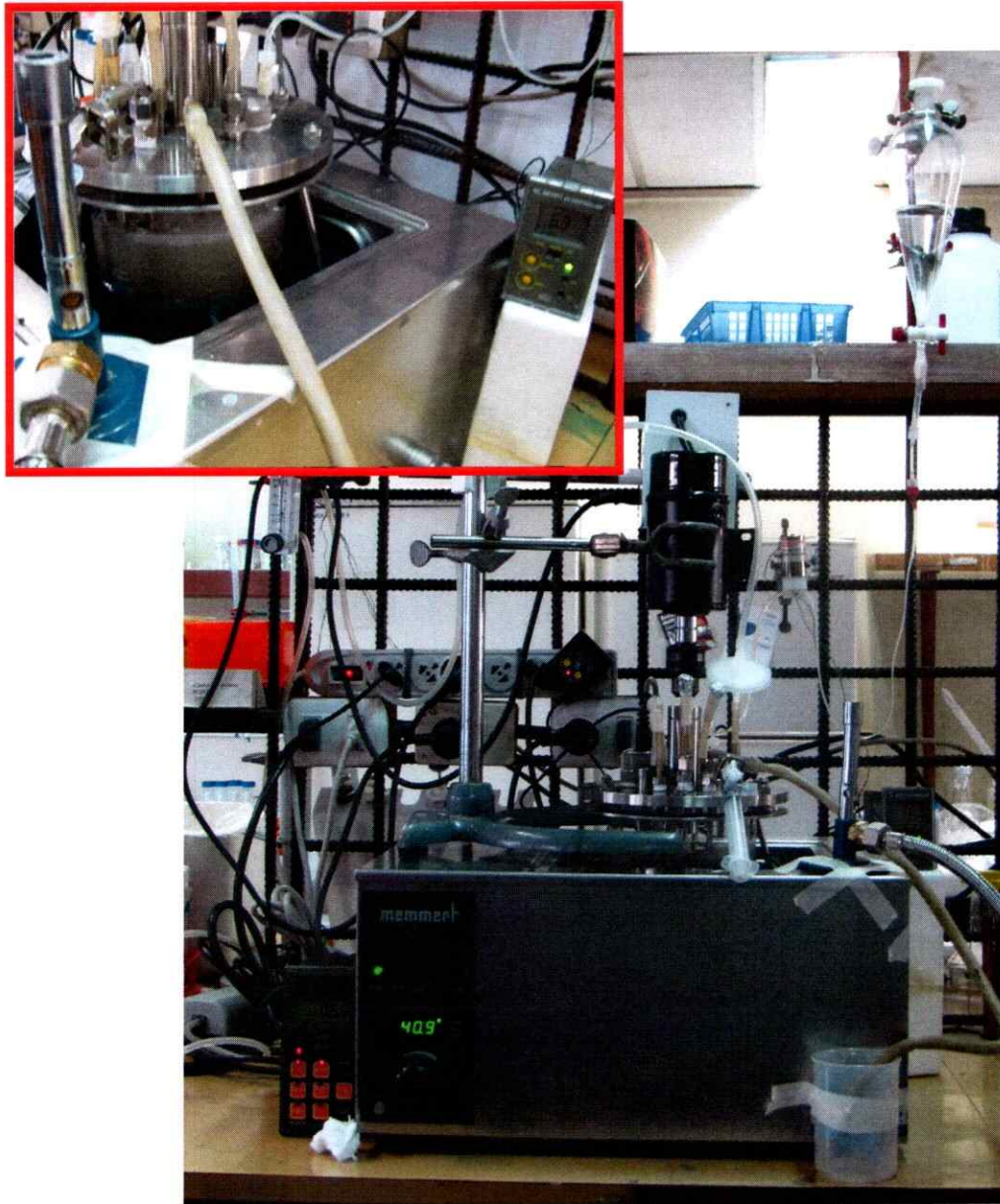


Figura 4: Montaje experimental para ensayos en biorreactor con sistema por lote.

2.2.3. Microarreglos fenotípicos

Para la caracterización fenotípica a gran escala, la cepa silvestre y las tres cepas mutantes en el metabolismo de los polifosfatos se cultivaron en un tubo con medio LB-agar inclinado y fueron analizadas mediante la tecnología de microarreglos fenotípicos (PMs) (Bochner y cols., 2001) por la compañía Biolog Inc. (California, USA). Estos ensayos comprenden más de 2000 pruebas metabólicas y de sensibilidad a compuestos tóxicos. En las pruebas metabólicas (PM1-PM8) se utilizaron diferentes fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, fuentes de azufre y fuentes de fósforo; y en las pruebas de sensibilidad a compuestos tóxicos (PM9-PM20) se utilizaron diferentes pH, osmolitos y compuestos químicos. Para las pruebas metabólicas, las células se pre-cultivaron en medio R2A agar (Reasoner y Geldreich, 1985) para depletarlas de fuentes nutricionales intrínsecas. Luego, las pruebas se realizaron en un medio mínimo definido que contiene 100 mM NaCl, 30 mM trietanolamina HCl (pH 7.1), 5,0 mM NH₄Cl, 2,0 mM NaH₂PO₄, 0,25 mM Na₂SO₄, 0,05 mM MgCl₂, 1,0 mM KCl y 0,01% de violeta de tetrazolio. Para las pruebas de sensibilidad, el medio utilizado para pre-cultivar las células fue medio LB-agar y para los ensayos se utilizó el mismo medio diluido 1:5 suplementado con 0,01% de violeta de tetrazolio. Tanto las pruebas metabólicas como las de sensibilidad se realizaron en un volumen final de 100 µL en cada pocillo, donde se agregó una fuente nutricional o un compuesto químico y se estudió su efecto sobre la reducción irreversible del violeta de tetrazolio presente en el medio, que al ser reducido cambia de incoloro a coloración púrpura. Las placas PM1-PM20 fueron incubadas a 37°C en un equipo Omnilog®, el cual monitoreó el cambio de color en las placas durante 24 horas para las

pruebas de metabólicas y 48 horas para las pruebas de sensibilidad. Los datos cinéticos fueron analizados con el software PM-Omnilog.

3. Resultados

3.1 Curvas de crecimiento en matraz utilizando diferentes medios de cultivo

Se realizaron curvas de crecimiento en dos medios de cultivo, un medio nutritivo (LB) y un medio mínimo (M9), con el fin de determinar las tasas de crecimiento para cada una de las cepas y poder comparar entre la cepa silvestre y las cepas mutantes en el metabolismo de los polifosfatos inorgánicos.

3.1.1. Curvas de crecimiento en medio nutritivo Luria Bertani (LB)

Cada matraz se inoculó con una dilución 1/500 de un cultivo de noche y se siguió el crecimiento durante aproximadamente 8 horas. Cada curva de crecimiento se realizó en triplicado biológico. Al inicio de la curva de crecimiento se observó la fase de adaptación o fase *lag*, donde las bacterias se adaptan al medio y se preparan para la división. Según las condiciones de crecimiento en el laboratorio, se consideró como fase *lag* cuando la densidad óptica (D.O.) del cultivo es menor a 0,25 unidades de absorbancia (U.A.) medida a 600 nm. Todas las cepas en estudio tuvieron una fase *lag* de similar duración (1 h, **Figura 5**). Luego, se observó la fase exponencial de crecimiento, donde cada bacteria se divide activamente por fisión binaria originando dos células hijas de igual tamaño. En el medio nutritivo LB no se observaron diferencias con respecto a la velocidad de crecimiento entre las cepas, la cual se deduce de la pendiente que se obtiene durante la fase exponencial (**Figura 5**). Para determinar cuantitativamente el tiempo generacional de cada cepa en medio LB, se seleccionaron

algunos puntos de densidad óptica que se ajustan mejor a la función de crecimiento exponencial mediante el programa de análisis de datos y estadísticas GrahPad versión 6.0. Se calcularon todos los parámetros del crecimiento exponencial: Y_0 , que es el valor de densidad óptica cuando el tiempo es cero y se expresa en U.A.; k , que es la constante de crecimiento y se expresa en h^{-1} o min^{-1} ; Tau, que es la constante de tiempo (calculada como el inverso de k); tiempo generacional, que es tiempo que demora una bacteria en dividirse (calculado del cociente $\ln(2)/k$) y se expresa en h o min. Adicionalmente se calculó el error estándar para los parámetros Y_0 y k y el índice de correlación lineal (R^2) (**Tabla 2**). No se obtuvieron diferencias significativas entre los tiempos generacionales de las cepas en estudio (**Tabla 2**). La cepa silvestre (K-12) tuvo un tiempo generacional de 51 minutos, mientras que las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx alcanzaron un tiempo generacional aproximado de 54 minutos. Para la cepa mutante $\Delta poliP$ se obtuvo un tiempo generacional aproximado de 65 minutos. Finalmente, se observó el inicio de la fase estacionaria, donde las bacterias no crecieron en el matraz debido al agotamiento de los nutrientes, la variación en el pH y/o a la acumulación de metabolitos tóxicos. Todas las cepas llegaron a fase estacionaria luego de aproximadamente 6 horas de crecimiento. La cepa silvestre alcanzó valores de densidad óptica mayores al llegar a la fase estacionaria comparada con las cepas mutantes, llegando a 3,5 U.A. mientras que las cepas mutantes alcanzan un máximo de 3 U.A. (**Figura 5**).

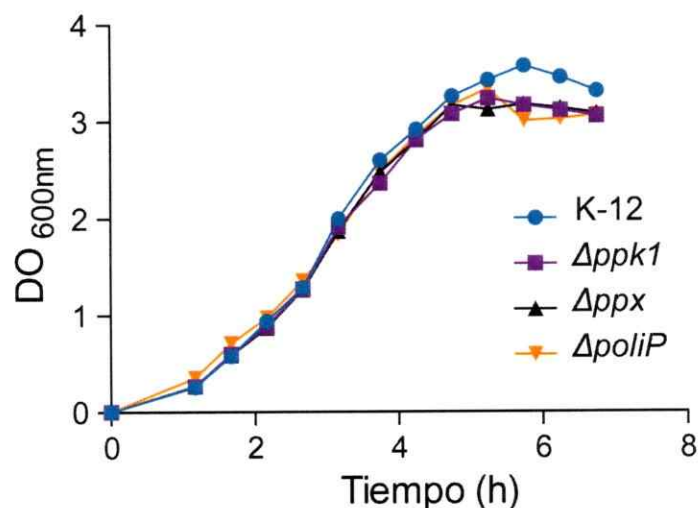


Figura 5. Curvas de crecimiento en matraz en medio nutritivo Luria Bertani.

Tabla 2. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en medio LB.

Medio nutritivo Luria Bertani	K-12	<i>Δppk1</i>	<i>Δppx</i>	<i>ΔpoliP</i>
Y0	0,156	0,163	0,163	0,246
k (h ⁻¹)	0,804	0,777	0,770	0,635
Tau (h)	1,244	1,286	1,299	1,574
Tiempo generacional (h)	0,862	0,892	0,900	1,091
Tiempo generacional (min)	51,744	53,502	54,018	65,460
	Error estándar			
Y0	0,019	0,007	0,003	0,006
k	0,043	0,014	0,006	0,009
R ²	0,996	1,000	1,000	1,000

3.1.2. Curvas de crecimiento en medio mínimo M9-glucosa

Cada matraz se inoculó con una dilución 1/500 de un cultivo de noche y se siguió el crecimiento por aproximadamente 12 h. Cada curva de crecimiento se realizó en triplicado biológico. Al inicio de la curva de crecimiento se observa la fase de adaptación o fase *lag*, la cual es más extensa que la observada en el medio nutritivo LB y alcanza aproximadamente 3 h para la cepa silvestre y 4,5 h para las cepas mutantes

(Figura 6). Inmediatamente después, se observó la fase exponencial de crecimiento, donde se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre la cepa silvestre y las cepas mutantes, pero no así entre estas últimas. Los tiempos generacionales fueron calculados mediante el programa de análisis de datos y estadística GrahPad versión 6.0 (Tabla 3). Para la cepa silvestre se obtuvo un tiempo generacional de 66 min, mientras que para las cepas mutantes $\Delta ppk1$, Δppx y $\Delta poliP$ se registraron tiempos generacionales de 94, 93 y 92 min, respectivamente (Tabla 3). Finalmente, se observó la fase estacionaria de crecimiento luego de 9 h de realiza el inóculo. La cepa silvestre alcanzó valores de D.O. cercanos a 2 U.A., mientras que las mutantes alcanzaron hasta 1,7 U.A. (Figura 6).

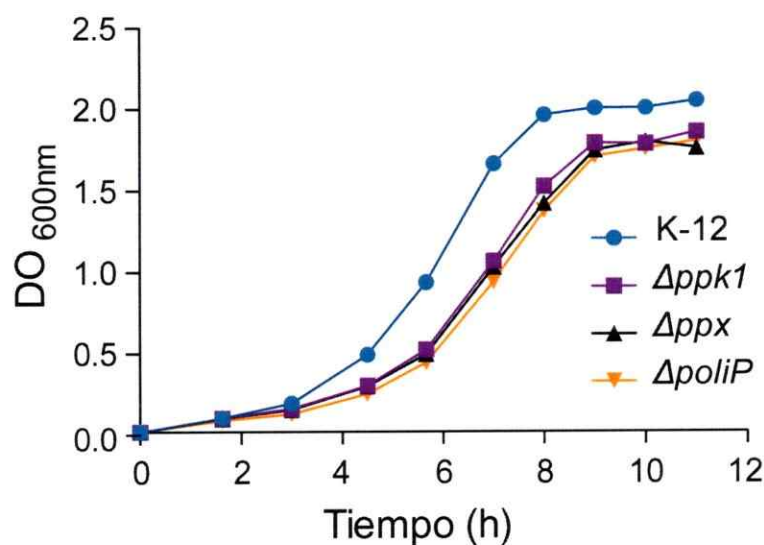


Figura 6. Curva de crecimiento en matraz en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa.

Tabla 3. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa.

Medio mínimo M9 glucosa	K-12	$\Delta ppk1$	Δppx	$\Delta poliP$
Y0	0,028	0,039	0,038	0,030
k (h ⁻¹)	0,634	0,441	0,445	0,452
Tau (h)	1,578	2,267	2,247	2,211
Tiempo generacional (h)	1,094	1,571	1,558	1,533
Tiempo generacional (min)	65,640	94,260	93,480	91,980
	Error estándar			
Y0	0,005	0,004	0,005	0,006
k	0,040	0,023	0,031	0,047
R ²	0,998	0,998	0,997	0,993

3.2. Curvas de crecimiento en biorreactor con sistema por lote en medio mínimo

M9-glucosa

Con el objetivo de estudiar los parámetros de crecimiento bacteriano bajo condiciones controladas de pH y monitoreando el consumo de oxígeno, se realizaron cultivos en un biorreactor con sistema por lote. Para ello, se inoculó el biorreactor con una dilución 1/50 de un cultivo de noche y se monitoreó por alrededor de 10 h. Todas las curvas de crecimiento se realizaron en triplicado biológico. Al comienzo de la curva de crecimiento se observó la fase *lag* de 1,5 h para la cepa silvestre y 2,5 h para las cepas mutantes (**Figura 7A**). Con respecto a la fase exponencial se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre la cepa silvestre y las cepas mutantes, pero no así entre las cepas mutantes. Al realizar los análisis estadísticos para calcular los tiempos generacionales se observó que la cepa silvestre tuvo un tiempo generacional de 57 min, mientras que las cepas mutantes $\Delta ppk1$, Δppx y $\Delta poliP$ alcanzaron tiempos generacionales de 72, 73 y 71 min, respectivamente (**Tabla 4**). Las diferencias observadas en este sistema de cultivo bacteriano utilizando medio M9-glucosa se

relacionan con las diferencias obtenidas en el mismo medio pero utilizando matraces para el cultivo bacteriano. Se pudo establecer que al controlar las variaciones que se producen en el medio (pH) y aumentar la velocidad de agitación en el cultivo, se pueden obtener mayores valores de D.O. al comparar el biorreactor con el crecimiento en matraz utilizando el mismo medio, llegando aproximadamente a 5,5 U.A. para todas las cepas. Al llegar a fase estacionaria, se observó que la cepa silvestre mantuvo sus valores de D.O. mientras que en las cepas mutantes disminuyeron considerablemente los valores obtenidos al inicio de la fase estacionaria, lo cual podría indicar un comienzo prematuro de la fase de muerte celular en las cepas mutantes. Con respecto al consumo de oxígeno, todas las cepas aumentaron su consumo de oxígeno al iniciar la fase exponencial, lo cual disminuyó la disponibilidad de oxígeno en el medio, llegando a un máximo de consumo que concuerda con el fin de esta fase y el paso a la fase estacionaria (**Figura 7B**).

Tabla 4. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento en biorreactor con sistema por lote en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa.

Bioreactor M9 glucosa	K-12	<i>Δppk1</i>	<i>Δppx</i>	<i>ΔpoliP</i>
Y0	0,089	0,075	0,113	0,083
k (h ⁻¹)	0,729	0,571	0,570	0,585
Tau (h)	1,372	1,752	1,756	1,710
Tiempo generacional (h)	0,951	1,214	1,217	1,185
Tiempo generacional (min)	57,042	72,840	73,020	71,100
	Error estándar			
Y0	0,014	0,012	0,017	0,010
k	0,034	0,027	0,027	0,020
R ²	0,993	0,989	0,991	0,995

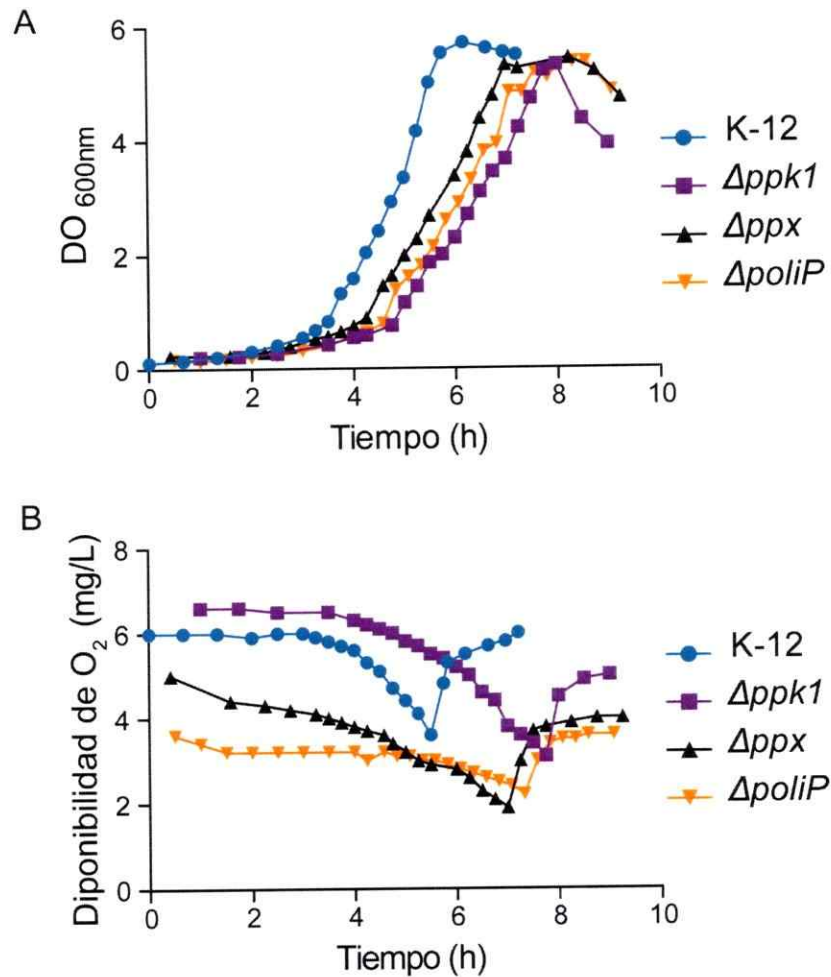


Figura 7. Parámetros de crecimiento obtenidos a partir de cultivos en un biorreactor con sistema por lote. A. Curva de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con 5 g/L de glucosa **B.** Disponibilidad de O₂ en el medio de cultivo en función del tiempo.

3.3. Cambios fenotípicos a gran escala evaluados mediante microarreglos fenotípicos.

Mediante la técnica de microarreglos fenotípicos (PMs) es posible determinar los cambios fenotípicos asociados a la alteración del metabolismo de los polifosfatos en cada cepa. Esta técnica se basa en la premisa de que una fuente nutricional es transportada y metabolizada en la célula para producir poder reductor y un flujo de

electrones capaz de reducir el violeta de tetrazolio, produciendo un color púrpura (Bochner y cols., 2009). Así mientras más rápido es el flujo metabólico, más rápidamente aparece el color púrpura, indicando un aumento en la tasa de respiración celular. Así, los datos obtenidos se pueden clasificar en dos grandes grupos que fueron denominados ganancias y pérdidas fenotípicas. Esta clasificación se basa en la comparación de cada uno de los ensayos realizados para la cepa mutante con respecto al mismo ensayo en la cepa silvestre. De esta forma, una ganancia fenotípica es determinada por una mayor tasa de respiración celular de la cepa mutante en comparación a la cepa silvestre y una pérdida fenotípica es determinada por una menor tasa de respiración celular del mutante en comparación con la cepa silvestre (**Figura 8**).

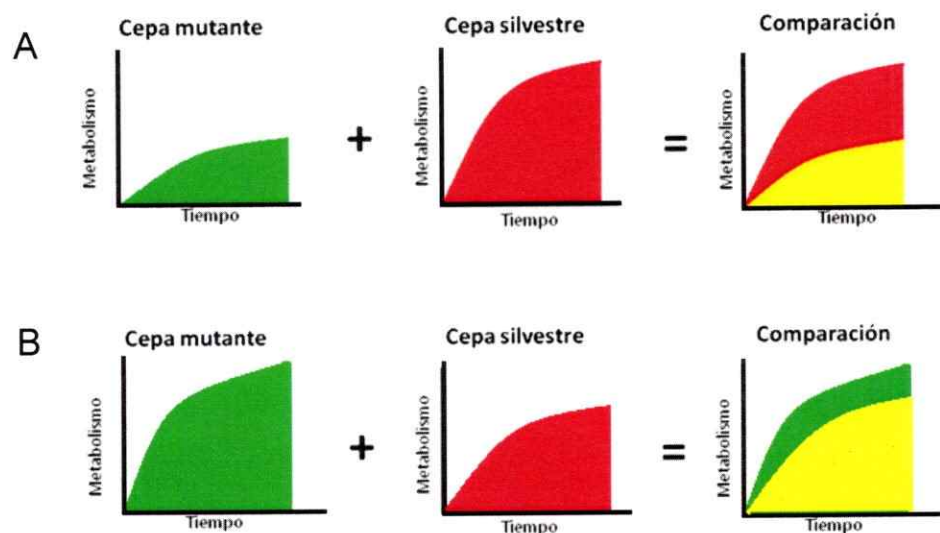


Figura 8. Representación gráfica de resultados en microarreglos fenotípicos. A. Pérdida fenotípica, B. Ganancia fenotípica.

Los resultados globales obtenidos muestran que las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$ tuvieron una mayor tasa de respiración con respecto a la cepa silvestre en las placas de 96 pocillos que fueron destinadas para el estudio de fuentes nutricionales como el

carbono, fósforo, azufre y nitrógeno (placas 1-10, **Figura 9A y 9C**). Por otra parte, la cepa Δppx no presentó mayores cambios en estos ensayos y se comportó en general como la cepa silvestre (**Figura 9B**).

Con respecto a la sensibilidad a compuestos tóxicos (placas 11-20), observamos que todas las cepas mutantes presentaron una mayor sensibilidad a diferentes compuestos (datos no mostrados).



Figura 9. Resultados de PMs para las cepas mutantes en comparación con cepa silvestre. A. $\Delta ppk1$, B. Δppx , C. $\Delta poliP$. Los recuadros demarcados indican los pocillos en los cuales hubieron cambios significativos entre la cepa mutante y la silvestre.

Al analizar los cambios fenotípicos para las cepas en estudio se obtuvieron 161 ganancias y 24 pérdidas fenotípicas para la cepa mutante $\Delta ppk1$. Para la cepa Δppx se obtuvieron 36 ganancias y 53 pérdidas fenotípicas. Por último, se obtuvieron 252 ganancias y 7 pérdidas fenotípicas para la cepa $\Delta poliP$. En base a estos resultados se realizaron diagramas de Venn para comparar estos cambios fenotípicos y poder establecer relaciones entre las cepas mutantes (**Figura 10**).

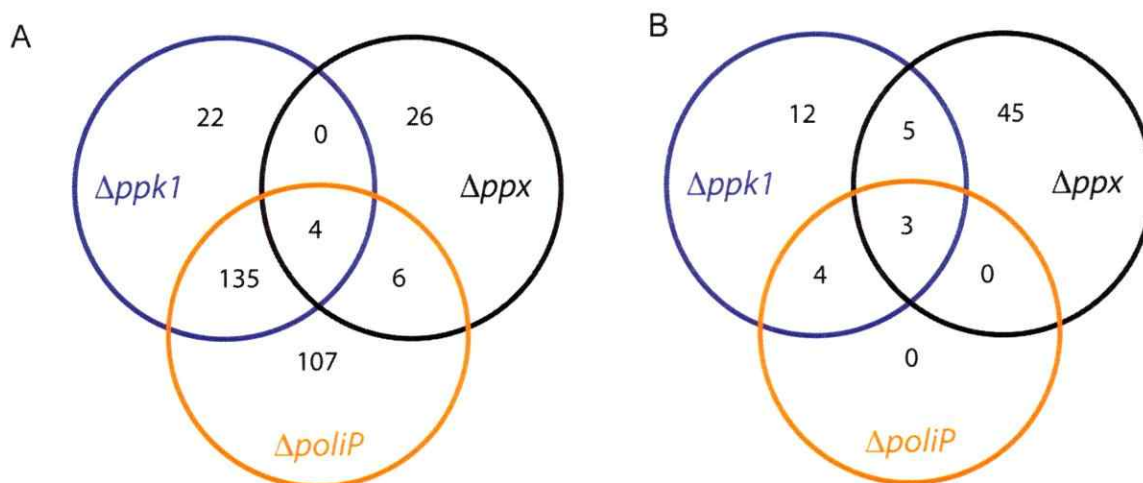


Figura 10. Diagramas de Venn para clasificar los resultados de PMs. A. Ganancias fenotípicas, **B.** Pérdidas fenotípicas.

Dentro de las ganancias fenotípicas comunes entre todas las cepas mutantes se encontraron 4 compuestos relacionados con el metabolismo de compuestos nitrogenados clasificados como dipéptidos Lys-Pro, Pro-Gln, Pro-Arg y Pro-Asn. En cuanto a las pérdidas fenotípicas comunes se encontraron 3 compuestos que están relacionados con la sensibilidad a compuestos tóxicos como son la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y dos ensayos con distintas concentraciones de 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina (**Figura 10**).

En cuanto a las ganancias fenotípicas se observó que las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$ son muy similares entre sí, con un total de 135 cambios en común. En contraste,

las cepas $\Delta ppk1$ y Δppx son diferentes en cuanto al metabolismo de los compuestos estudiados, ya que no comparten ninguna ganancia fenotípica. Entre las cepas Δppx y $\Delta poliP$ solo se observaron 6 cambios en común. Por lo tanto, al comparar las todas cepas en cuanto a las ganancias fenotípicas, la cepa doble mutante ($\Delta poliP$) se comporta como la mutante simple que no puede producir polifosfatos ($\Delta ppk1$). Con respecto a las pérdidas fenotípicas la cepa mutante Δppx fue quien presentó la mayor cantidad de pérdidas fenotípicas y nuevamente las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$ presentan un comportamiento similar y compartieron la mayoría de los cambios fenotípicos asociados a la disminución del metabolismo en solo algunos ensayos.

Posteriormente, se analizaron los resultados según la clasificación de cada ensayo y fueron divididos en metabolismo de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y/o sensibilidad a compuestos químicos. Se crearon diagramas de mapas de calor (Heatmap) que permiten visualizar los perfiles fenotípicos para cada cepa mutante (**Figura 11**).

Con respecto al perfil fenotípico obtenido para el catabolismo de fuentes de carbono, se encontraron cambios en 24 compuestos relacionados con el metabolismo central, particularmente con rutas como la glicólisis, el ciclo de Krebs y la fermentación (**Figura 11A**). Se observaron ganancias fenotípicas en el metabolismo de estos compuestos para las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$, por lo que ambas mostraron un aumento en la tasa de respiración celular para estos compuestos. Por el contrario, la cepa mutante Δppx tuvo una disminución en la tasa de respiración celular frente a estos compuestos.

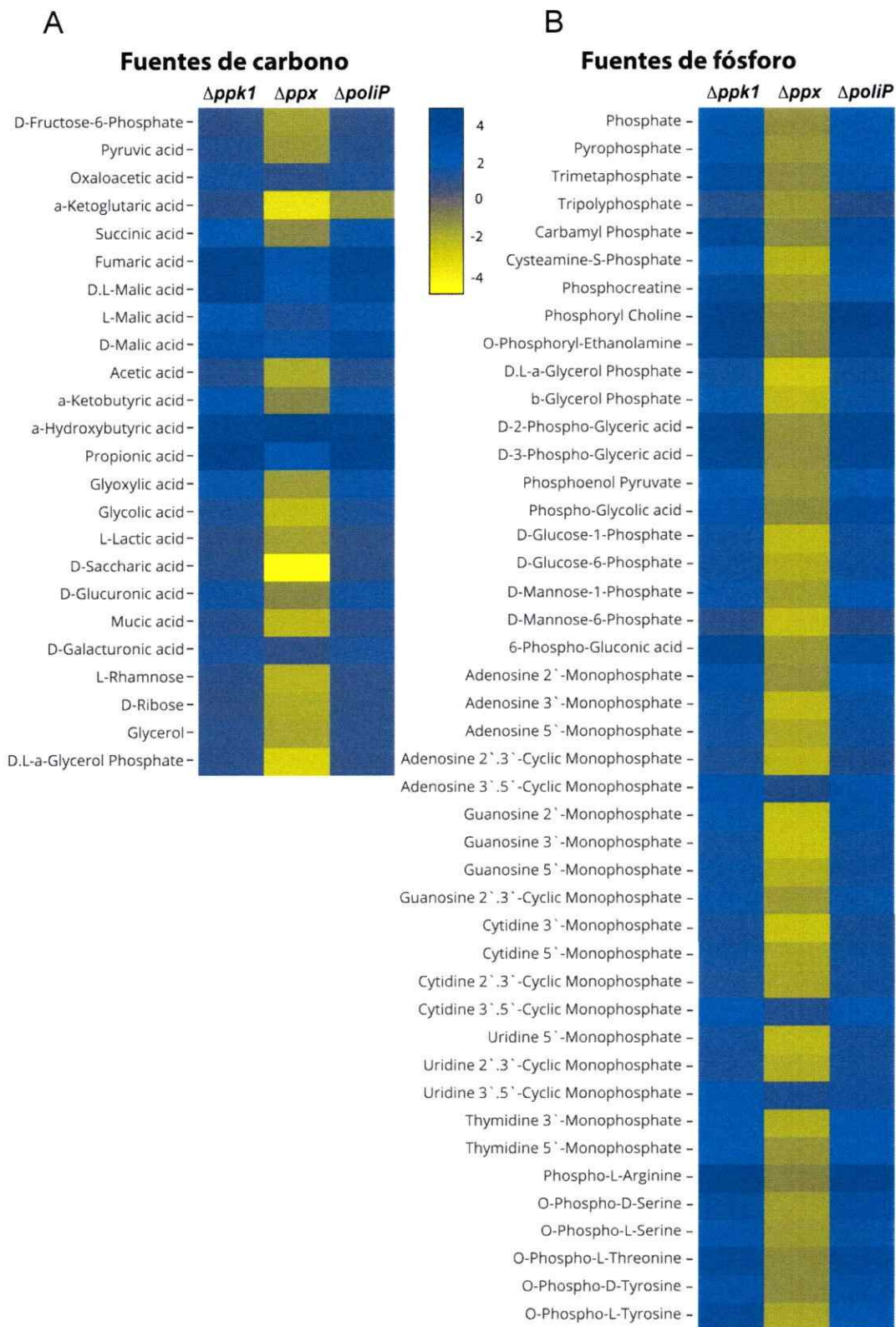


Figura 11. Perfiles fenotípicos. A. Metabolismo de fuentes de Carbono, **B.** Metabolismo de fuentes de Fósforo

Patrones similares de perfiles fenotípicos se obtuvieron para 44 compuestos relacionados con las fuentes de fósforo, dentro de los cuales se destacan procesos celulares como el metabolismo orgánico e inorgánico de fosfato, el metabolismo de ácidos nucleicos, el metabolismo de aminoácidos fosforilados, el metabolismo de azúcares fosforilados y la glicólisis. Las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$ fueron capaces de metabolizar estos compuestos mejor que la cepa silvestre con ganancias fenotípicas coincidentes entre ambas cepas, mientras tanto la cepa Δppx metabolizó estos compuestos con una tasa de respiración menor que la cepa silvestre, produciendo pérdidas fenotípicas (**Figura 11B**).

En el caso de las fuentes de nitrógeno, el mismo patrón fue observado para la cepa Δppx , la cual solo presentó pérdidas de fenotipo, y para las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$, la cuales tuvieron ganancias fenotípicas para los compuestos relacionados con la asimilación de nitrógeno, la degradación de aminoácidos, la degradación de amidas, aminas y poliaminas, la degradación de amino-azúcares y el metabolismo de ribonucleótidos de pirimidina. Por su parte, la cepa mutante Δppx presentó dificultades para la degradación de aminoácidos y amino-azúcares (**Figura 12A**).

Por último, las fuentes de azufre como sulfonatos, sulfuros, taurina y aminoácidos fueron metabolizados en mayor medida por las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$, mientras que la cepa mutante Δppx fue capaz de metabolizarlos a una igual o menor tasa que la cepa silvestre (**Figura 12B**).

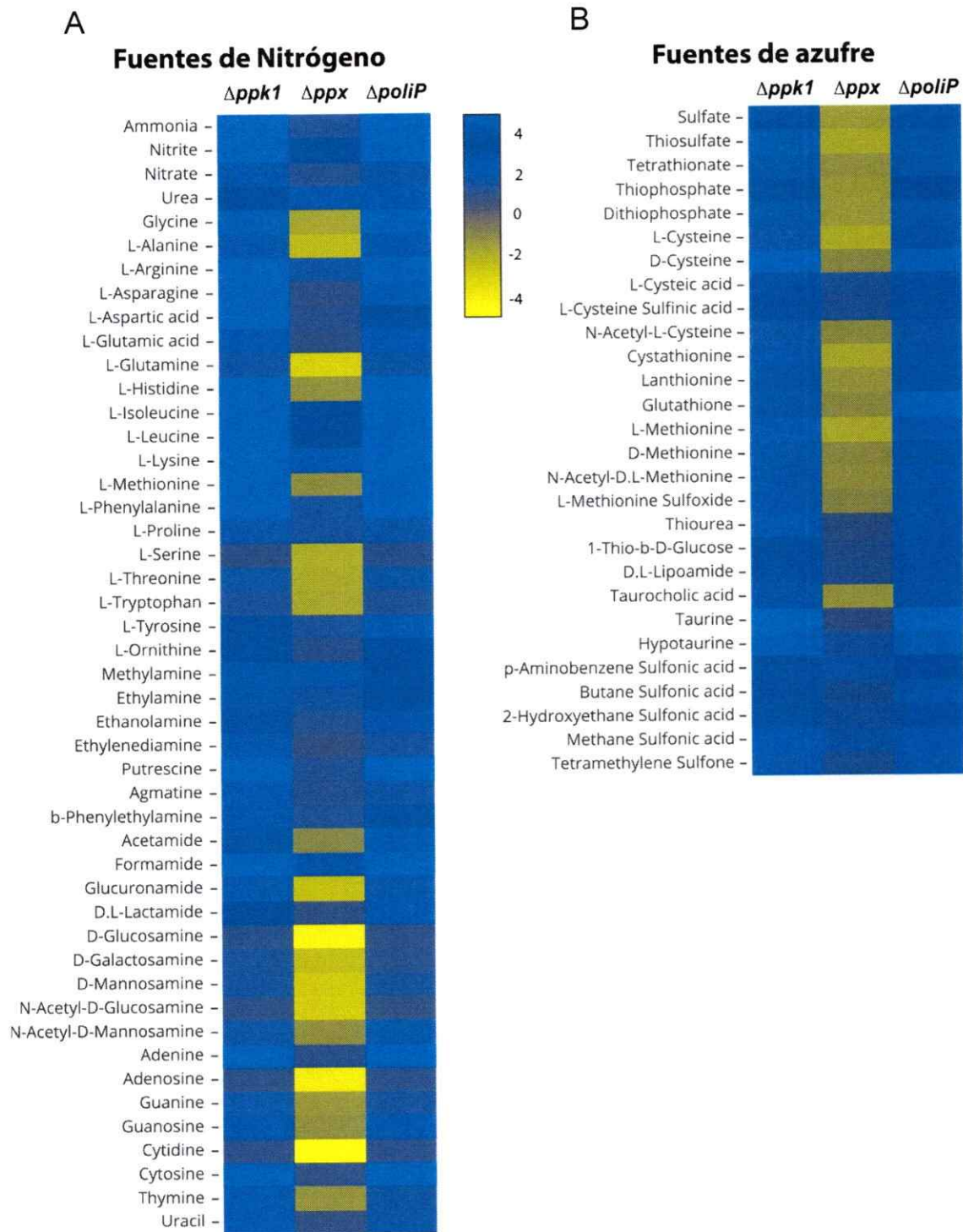


Figura 12. Perfiles fenotípicos. A. Metabolismo de fuentes de Nitrógeno, **B.** Metabolismo de fuentes de Fósforo.

Con respecto a la sensibilidad a compuestos químicos, cabe destacar que en general todas las cepas tuvieron pérdidas fenotípicas asociadas al metabolismo de compuestos tóxicos como por ejemplo 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina. De los principales cambios observados, se destacan los resultados obtenidos para los ensayos de sensibilidad a diferentes antibióticos. Todos los antibióticos probados se clasificaron en familias según su mecanismo de acción, entre los que encontramos inhibidores de la pared celular, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la síntesis de ARN, inhibidores de la síntesis de proteínas y agentes que dañan la cadena del ADN. La cepa mutante Δppx fue la cepa más sensible a los antibióticos dentro de las cepas en estudio. Las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$ presentaron una sensibilidad menor que la mutante Δppx , pero en general, los antibióticos a los cuales se genera una mayor sensibilidad cuando se altera el metabolismo de los poliP fueron aquellos la familia de los inhibidores de la pared celular como por ejemplo las cefalosporinas y penicilinas, los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas como los aminoglucósidos y los macrólidos, así como también los agentes que causan daño en el ADN como los nitrofuranos (**Figura 13**).

Sensibilidad a antibióticos

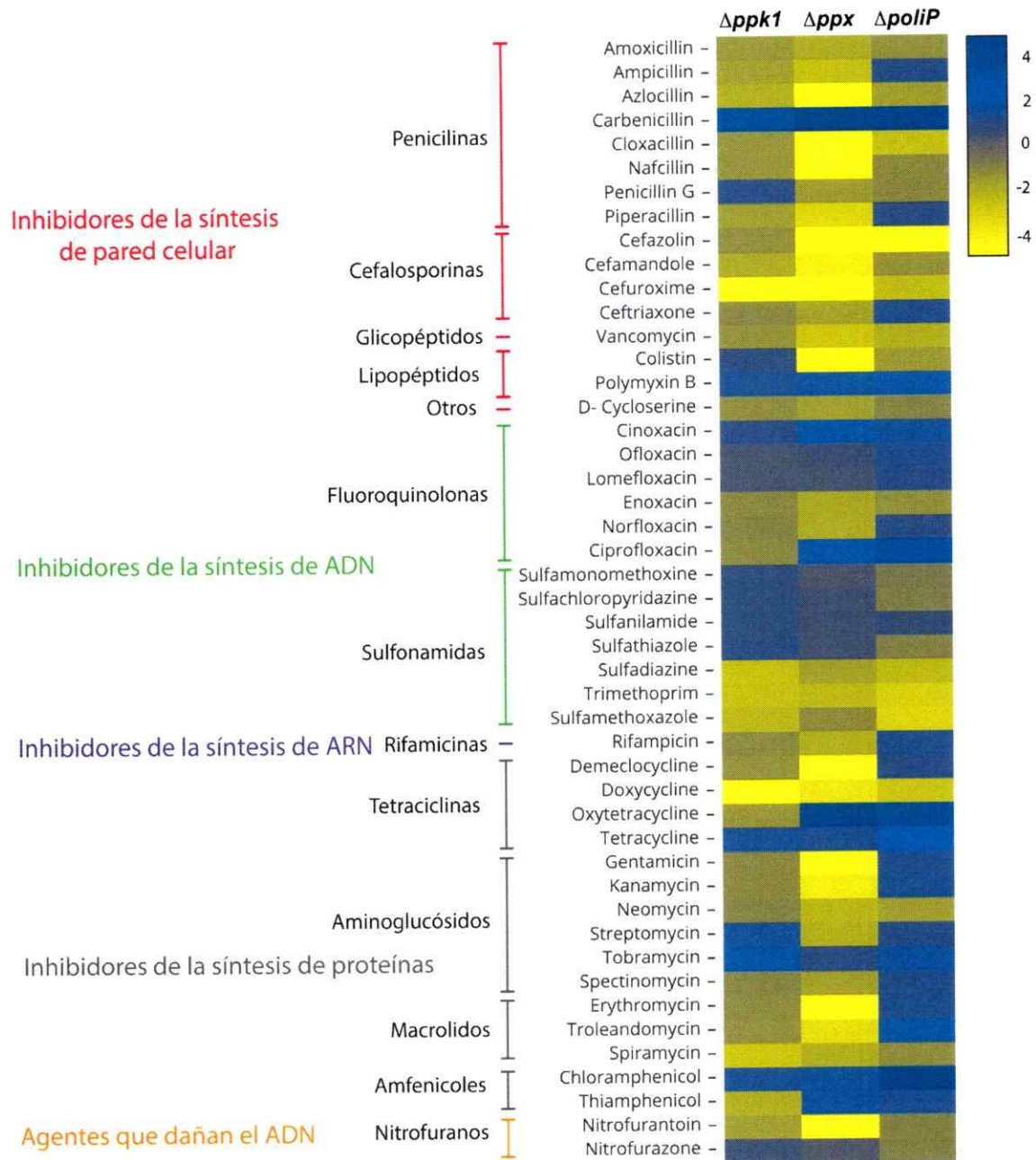


Figura 13. Perfiles fenotípicos. Sensibilidad a antibióticos de diferentes familias.

4. Discusión

Los microarreglos fenotípicos son una poderosa herramienta para analizar la respuesta celular ante numerosos cambios nutricionales y condiciones ambientales como las de estrés y presencia de compuestos tóxicos. Por esas razones ha sido ampliamente utilizada para comparar diferentes cepas mutantes con respecto a una cepa silvestre (Zhou y cols., 2003). Una premisa importante para la correcta interpretación de los resultados derivados de los cambios nutricionales a gran escala es conocer el crecimiento bacteriano en diferentes condiciones y medios de cultivo. Esto permite discriminar si los cambios son debidos al crecimiento microbiano o la tasa de respiración metabólica de la bacteria.

Para determinar las tasas de crecimiento de los mutantes del metabolismo de los poliP ($\Delta ppk1$, Δppx y $\Delta poliP$) utilizamos medios de cultivo nutritivo (LB) y mínimo definido (M9).

4.1 Curvas de crecimiento y parámetros cinéticos de crecimiento

En primer lugar se realizaron los cultivos en matraz en el medio nutritivo LB y medio mínimo M9 suplementado con glucosa para determinar la constante de crecimiento y el tiempo generacional. En general, se obtuvieron constantes de crecimiento más bajas que en medio LB para todas las cepas cuando son crecidas en medio mínimo, y por lo tanto tiempos generacionales más extensos. Esto se debe a que el medio M9 posee solo una fuente de carbono (glucosa), distintas sales y agua, siendo los componentes mínimos necesarios para la propagación de las células.

Con respecto al crecimiento bacteriano en LB, se observó que todas las cepas mostraron tiempos generacionales similares. Por lo tanto, en medio nutritivo no se

registraron diferencias en las velocidades de crecimiento de las distintas cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre. Esto es importante para la interpretación de los resultados de los microarreglos fenotípicos pues si existen cambios en el consumo de alguna fuente nutricional éstos son debidos al metabolismo bacteriano y no a un aumento del crecimiento de algún mutante con respecto al control.

Al comparar los tiempos generacionales obtenidos para cada cepa estudiada en medio M9, se observó que la cepa silvestre mostró un menor tiempo generacional que las cepas mutantes ($\Delta ppk1$, Δppx y $\Delta poliP$). La cepa silvestre alcanzó un tiempo generacional de 65 min. Este valor fue contrastado con los valores para el tiempo generacional en este mismo medio que fueron depositados en la base de datos biológicos BioNumber (Milo y cols, 2010). El primer reporte indica que el tiempo generacional es de 42 ± 12 min, lo cual difiere del valor real obtenido en este estudio. La diferencia observada se puede explicar dado que medio utilizado en este primer reporte se suplementó con tiamina y casaminoácidos (Campos y cols, 2014), los cuales son utilizados para aumentar la velocidad de crecimiento. Por otra parte, un segundo reporte depositado en la misma base de datos indica que el tiempo generacional es de 67 minutos en medio M9 (*E. coli* Genome Project – University of Wisconsin, Madison). concordando con los resultados obtenidos en este trabajo. Las cepas mutantes tuvieron una velocidad de crecimiento menor en comparación con la cepa silvestre, obteniéndose un tiempo generacional mayor. Por lo tanto, el uso de este medio permite evaluar diferencias en los parámetros cinéticos de crecimiento para las cepas deficientes en el metabolismo de los poliP.

Con respecto a los parámetros cinéticos obtenidos bajo condiciones controladas en biorreactor con sistema por lote, al igual que durante el crecimiento en matraz con medio M9, las cepas mutantes ($\Delta ppk1$, Δppx y $\Delta poliP$) tuvieron un tiempo generacional 25% más extenso que la cepa silvestre, corroborando que el medio utilizado permite diferenciar el patrón de crecimiento de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre. Cabe mencionar que a pesar de que las diferencias entre las cepas se mantuvieron, todas disminuyeron sus tiempos generacionales cuando fueron crecidas en el biorreactor. Esto se explica principalmente por la presencia del suplemento tiamina en el medio y además al monitoreo y control constante de las variaciones ocurridas en el pH del cultivo. El tiempo generacional obtenido para la cepa silvestre en el biorreactor fue de 57 min. Este resultado concuerda con el tiempo generacional de 42 ± 12 min, determinado previamente (Campos y cols., 2014).

Otro parámetro estudiado durante el crecimiento bacteriano en el biorreactor con sistema por lote fue la disponibilidad de oxígeno en el medio y por consiguiente, el consumo de oxígeno de cada cepa en estudio. La respiración aeróbica es el proceso por el cual la célula obtiene carbono, agua y energía a partir de fuentes complejas (azúcares). Este proceso celular utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones en las reacciones de oxidación que ocurren dentro de la célula y por lo tanto es importante durante el cultivo bacteriano, mantener un suministro adecuado de oxígeno que permita satisfacer los requerimientos metabólicos de los microorganismos en estudio. La velocidad de consumo de oxígeno se ve aumentada cuando la oxidación de la glucosa está ocurriendo activamente y se necesita oxígeno para la transferencia final de los electrones producidos en este proceso celular. Durante el crecimiento en el biorreactor con sistema

por lote, pudimos observar que todas las cepas presentaron una mayor tasa de consumo de oxígeno durante la fase exponencial de crecimiento, lo que concuerda con el aumento exponencial de la población y debería también correlacionarse con el mayor consumo de glucosa en medio (dato no obtenido). Durante la fase *lag* y estacionaria no se observaron variaciones en la disponibilidad de oxígeno en el medio, lo que se debería principalmente a que las células en estas etapas no se encuentran en un proceso de división constante, por lo que no metabolizan la fuente carbonada debido al proceso previo de ajustes metabólicos (fase *lag*) o al agotamiento de la dicha fuente en el medio (fase estacionaria).

4.2. Cambios fenotípicos a gran escala evaluados mediante microarreglos fenotípicos.

Teniendo en cuenta que ya contábamos con análisis a gran escala tanto transcriptómicos como proteómicos de las cepas mutantes del metabolismo de los poliP (Varas, Valdivieso y cols., 2016), decidimos corroborar y descubrir nuevos fenotipos celulares de estos mutantes mediante el uso de los microarreglos fenotípicos.

A partir de los 2000 ensayos fenotípicos realizados se observaron 161 ganancias y 24 pérdidas fenotípicas para la cepa $\Delta ppk1$, 36 ganancias y 53 pérdidas fenotípicas para la cepa Δppx y 252 ganancias y 7 pérdidas fenotípicas para la cepa $\Delta poliP$. De las ganancias fenotípicas obtenidas para cepa $\Delta ppk1$, el 85% (135) de los cambios fueron compartidos con la cepa $\Delta poliP$. Este resultado nos indica que el fenotipo de la cepa doble mutante se debe principalmente a la influencia del gen *ppk1*. La mayoría de estos cambios se relacionan con el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. En contraste con estos resultados, la cepa Δppx experimentó pérdidas

fenotípicas en 53 ensayos relacionados con el catabolismo de las diferentes fuentes nutricionales. Al comparar los cambios fenotípicos obtenidos para las cepas $\Delta ppk1$ y Δppx , pudimos observar que éstas mostraron fenotipos contrastantes para la mayoría de las fuentes nutricionales ensayadas. Con respecto a procesos celulares como la glicólisis, el ciclo de Krebs y la respiración anaeróbica, encontramos 24 fuentes de carbono relacionadas con estos procesos que fueron estudiados a través de esta técnica a gran escala y que presentan cambios de ganancia fenotípica para las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$, mientras que en la cepa Δppx tienen un efecto de pérdida de fenotipo. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos a través de transcriptómica y proteómica cuantitativa (Valdivieso, 2011) y pueden ser explicados por el efecto del regulador transcripcional ArcA sobre muchos de los genes relacionados con el metabolismo central. A través de la proteómica cuantitativa se pudo detectar que este regulador transcripcional se encuentra aumentado en la cepa Δppx , lo que conlleva a una represión de los genes del metabolismo central (glicólisis y ciclo de Krebs). Por el contrario, en la cepa $\Delta ppk1$ se detectó una disminución en los niveles de esta proteína, lo que explica una regulación positiva de los genes relacionados con dicho metabolismo.

Por otra parte, se obtuvieron perfiles de ganancias fenotípicas similares para las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$, en ensayos que evalúan el metabolismo de fuentes de fósforo, nitrógeno y azufre. Los principales procesos celulares asociados a las fuentes de fósforo fueron el metabolismo orgánico e inorgánico de fosfato, el metabolismo de ácidos nucleicos, el metabolismo de aminoácidos fosforilados, el metabolismo de azúcares fosforilados, y la glicólisis. Con respecto a las fuentes de nitrógeno, observamos que los procesos relacionados con la asimilación de nitrógeno, la degradación de aminoácidos,

la degradación de amidas, aminos y poliaminas, la degradación de amino-azúcares, y el metabolismo de ribonucleótidos de pirimidina resultaron aumentados en las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$. Finalmente, las fuentes de azufre que fueron mejor metabolizadas por las cepas mutantes antes mencionadas fueron aquellas relacionadas con el metabolismo de sulfonatos, sulfuros, taurina y aminoácidos.

Con respecto a los cambios obtenidos para la sensibilidad a diferentes compuestos químicos, pudimos detectar que la cepa Δppx fue más sensible a diferentes compuestos químicos, lo que indicaría que la imposibilidad de degradar los poliP provoca un aumento en la sensibilidad bacteriana a dichos compuestos. Específicamente, la cepa Δppx presentó una alta sensibilidad a los antibióticos pertenecientes a las familias de inhibidores de la síntesis de pared celular e inhibidores de la síntesis de proteínas. Las cepas $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$ presentaron una sensibilidad menor que la mutante Δppx a antibióticos de las familias de los inhibidores de la pared celular e inhibidores de la síntesis de proteínas, así como también a los agentes que causan daño en el ADN. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos para los mutantes $ppk1$ y $ppk2$ de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, donde también mediante el uso de microarreglos fenotípicos se demostró la sensibilidad a múltiples y variados tipos de antibióticos (Ortiz-Severín y cols., 2015). Estos resultados indican que el metabolismo de los poliP y particularmente la síntesis de los mismos es importante para los fenómenos de resistencia y persistencia en respuesta a los antibióticos.

5. Conclusiones

1. Los tiempos generacionales obtenidos para las cepas en estudio fueron similares cuando se cultivaron en un medio nutritivo (LB). Sin embargo, las cepas mutantes $\Delta ppk1$, Δppx y $\Delta poliP$ tuvieron tiempos generacionales más extensos que la cepa silvestre cuando fueron crecidos en medio mínimo M9 suplementado con glucosa.
2. Para la cepa $\Delta ppk1$ se observaron 161 ganancias y 24 pérdidas fenotípicas, 36 ganancias y 53 pérdidas fenotípicas para la cepa Δppx y 252 ganancias y 7 pérdidas fenotípicas para la cepa $\Delta poliP$.
3. Se observaron cambios fenotípicos asociados al metabolismo de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, así como también a la sensibilidad frente a compuestos químicos incluyendo diferentes familias de antibióticos.
4. Se observaron fenotipos contrastantes entre las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx con respecto al metabolismo de 24 fuentes de carbono relacionadas con el metabolismo central. Estos resultados se correlacionaron con estudios anteriores de genómica funcional y proteómica cuantitativa realizados para las mismas cepas.
5. Los cambios fenotípicos observados en la doble mutante ($\Delta poliP$) coinciden con los cambios obtenidos para la cepa mutante $\Delta ppk1$, lo que sugiere una mayor contribución del gen $ppk1$ al fenotipo de la doble mutante.
6. Se observó sensibilidad a múltiples y variados antibióticos en todas las cepas mutantes en el metabolismo de los poliP.

6. Anexos

Tabla S1. Ganancias y pérdidas fenotípicas para la cepa mutante $\Delta ppk1$.

Ganancias fenotípicas		
Compuesto	Diferencia	Modo de acción
L-Aspartic Acid	106	C-Source, amino acid
D, L-Malic Acid	103	C-Source, carboxylic acid
D-Malic Acid	101	C-Source, carboxylic acid
L-Malic Acid	101	C-Source, carboxylic acid
Propionic Acid	92	C-Source, carboxylic acid
Mono-Methylsuccinate	87	C-Source, carboxylic acid
Fumaric Acid	83	C-Source, carboxylic acid
L-Proline	81	C-Source, amino acid
L-Asparagine	150	N-Source, amino acid
L-Arginine	146	N-Source, amino acid
L-Aspartic Acid	141	N-Source, amino acid
Ammonia	138	N-Source, inorganic
Glycine	137	N-Source, amino acid
L-Phenylalanine	114	N-Source, amino acid
Cytosine	114	N-Source, other
D-Asparagine	109	N-Source, amino acid
L-Ornithine	109	N-Source, amino acid
d-Amino-N-Valeric Acid	102	N-Source, other
Putrescine	98	N-Source, other
g-Amino-N-Butyric Acid	92	N-Source, other
L-Citrulline	91	N-Source, amino acid
L-Alanine	88	N-Source, amino acid
L-Methionine	86	N-Source, amino acid
D-Valine	86	N-Source, amino acid
L-Tyrosine	84	N-Source, amino acid
L-Glutamic Acid	80	N-Source, amino acid
6-Phospho-Gluconic Acid	150	P-Source, organic
Trimetaphosphate	137	P-Source, inorganic
Adenosine 2'-Monophosphate	132	P-Source, organic
Carbamyl Phosphate	125	P-Source, organic
D-2-Phospho-Glyceric Acid	123	P-Source, organic
Phospho-L-Arginine	122	P-Source, organic
D-3-Phospho-Glyceric Acid	121	P-Source, organic
Inositol Hexaphosphate	119	P-Source, organic
O-Phospho-L-Tyrosine	118	P-Source, organic
Pyrophosphate	117	P-Source, inorganic
O-Phosphoryl-Ethanolamine	117	P-Source, organic
Phosphate	114	P-Source, inorganic
O-Phospho-L-Threonine	112	P-Source, organic

O-Phospho-D-Tyrosine	110	P-Source, organic
Thymidine 3'-Monophosphate	107	P-Source, organic
Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate	106	P-Source, organic
O-Phospho-D-Serine	105	P-Source, organic
Phosphocreatine	105	P-Source, organic
Phosphoryl Choline	104	P-Source, organic
Thymidine 5'-Monophosphate	100	P-Source, organic
O-Phospho-L-Serine	96	P-Source, organic
Cytidine 3',5'-Cyclic Monophosphate	85	P-Source, organic
Thiosulfate	115	S-Source, inorganic
D-Cysteine	115	S-Source, organic
Cys-Gly	103	S-Source, organic
Taurine	100	S-Source, organic
Sulfate	98	S-Source, inorganic
Tetrathionate	94	S-Source, inorganic
Lanthionine	94	S-Source, organic
L-Cysteine Sulfinic Acid	93	S-Source, organic
Cystathionine	91	S-Source, organic
Glutathione	90	S-Source, organic
Thiophosphate	88	S-Source, inorganic
D-Methionine	86	S-Source, organic
Dithiophosphate	84	S-Source, organic
Leu-Arg	123	N-Source, peptide
Asp-Gln	118	N-Source, peptide
Pro-Asp	115	N-Source, peptide
Gly-Glu	114	N-Source, peptide
Gly-Asp	114	N-Source, peptide
Met-Phe	113	N-Source, peptide
Ile-Asn	113	N-Source, peptide
Gln-Glu	113	N-Source, peptide
Lys-Thr	112	N-Source, peptide
Asp-Gly	112	N-Source, peptide
Gly-Ile	112	N-Source, peptide
Phe-Met	111	N-Source, peptide
Gly-Met	110	N-Source, peptide
Asp-Ala	110	N-Source, peptide
Phe-Glu	110	N-Source, peptide
Lys-Gly	109	N-Source, peptide
Phe-Asp	109	N-Source, peptide
Tyr-Gly	108	N-Source, peptide
Lys-Pro	107	N-Source, peptide
Gly-Gly-Phe	107	N-Source, peptide
Asp-Leu	106	N-Source, peptide
His-Asp	106	N-Source, peptide
Pro-Gly	106	N-Source, peptide

Met-Leu	105	N-Source, peptide
Gly-Gly-Leu	105	N-Source, peptide
Arg-Met	104	N-Source, peptide
Arg-Tyr	104	N-Source, peptide
Leu-Glu	104	N-Source, peptide
Lys-Ile	104	N-Source, peptide
Ser-Met	104	N-Source, peptide
Tyr-Glu	104	N-Source, peptide
D-Ala-Gly	104	N-Source, peptide
Lys-Ser	102	N-Source, peptide
Tyr-Gly-Gly	101	N-Source, peptide
Gly-Tyr	100	N-Source, peptide
Leu-Asp	100	N-Source, peptide
Met-Arg	100	N-Source, peptide
Phe-Ile	100	N-Source, peptide
Ile-Leu	100	N-Source, peptide
Gly-Phe-Phe	100	N-Source, peptide
Arg-Ser	99	N-Source, peptide
Ser-Tyr	99	N-Source, peptide
His-Glu	99	N-Source, peptide
Ile-Arg	98	N-Source, peptide
Lys-Asp	98	N-Source, peptide
Phe-Tyr	97	N-Source, peptide
Arg-Asp	96	N-Source, peptide
Asp-Lys	96	N-Source, peptide
Leu-His	96	N-Source, peptide
Phe-Gly-Gly	96	N-Source, peptide
Gly-Phe	95	N-Source, peptide
Lys-Arg	95	N-Source, peptide
Met-Ile	95	N-Source, peptide
Glu-Ala	95	N-Source, peptide
Glu-Asp	94	N-Source, peptide
Thr-Glu	94	N-Source, peptide
Met-Gly	93	N-Source, peptide
Pro-Gln	93	N-Source, peptide
Asp-Glu	92	N-Source, peptide
Ala-Glu	91	N-Source, peptide
Thr-Asp	91	N-Source, peptide
Arg-Ile	90	N-Source, peptide
Glu-Glu	90	N-Source, peptide
Glu-Trp	90	N-Source, peptide
Lys-Glu	90	N-Source, peptide
Leu-Pro	90	N-Source, peptide
Gly-Gly-Ile	90	N-Source, peptide
Gly-Gly-Gly	89	N-Source, peptide

Gly-Arg	88	N-Source, peptide
His-Gly	88	N-Source, peptide
Ile-Gly	88	N-Source, peptide
Lys-Ala	88	N-Source, peptide
Pro-Tyr	88	N-Source, peptide
Ser-Phe	88	N-Source, peptide
Thr-Leu	88	N-Source, peptide
Thr-Met	88	N-Source, peptide
Tyr-Leu	88	N-Source, peptide
Gly-His	87	N-Source, peptide
Gly-Lys	87	N-Source, peptide
Gly-Met	87	N-Source, peptide
Ile-Ser	87	N-Source, peptide
Met-Tyr	87	N-Source, peptide
Pro-Asn	87	N-Source, peptide
Ser-Asp	87	N-Source, peptide
Arg-Phe	86	N-Source, peptide
Glu-Gly	86	N-Source, peptide
Met-Glu	86	N-Source, peptide
Asn-Glu	85	N-Source, peptide
Glu-Tyr	85	N-Source, peptide
Pro-Phe	85	N-Source, peptide
Asp-Trp	84	N-Source, peptide
His-Ser	84	N-Source, peptide
Ile-Gln	84	N-Source, peptide
Lys-Trp	84	N-Source, peptide
Met-Asp	84	N-Source, peptide
Pro-Hyp	84	N-Source, peptide
Leu-Tyr	84	N-Source, peptide
Phe-Pro	82	N-Source, peptide
Pro-Arg	81	N-Source, peptide
Asp-Asp	80	N-Source, peptide

Pérdidas fenotípicas

Compuesto	Diferencia	Modo de acción
Pyrophosphate	-110	Chelator, hydrophilic
Sulfamonomethoxine	-130	Folate antagonist
Sulfachloropyridazine	-115	Folate antagonist, PABA analog
2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridine	-152	Folate antagonist, vibriostatic
Dequalinium	-61	Ion channel inhibitor, K ⁺
Furaltadone	-143	Nitro compound, oxidizing agent,
Nitrofurazone	-66	Nitro compound, oxidizing agent,
1% Sodium Lactate	-79	Osmotic sensitivity, sodium
Lawson	-176	Oxidizing agent
pH 9.5 + Trimethylamine-N-Oxide	-101	pH, deaminase

pH 8.5	-80	pH, growth at 8.5
Chelerythrine	-136	Protein kinase C inhibitor
Thioglycerol	-120	Reducing agent, thiol, adenosyl
Sorbic Acid	-68	Respiration, ionophore, H ⁺
Gallic acid	-62	Respiration, ionophore, H ⁺
Rifampicin	-76	RNA polymerase

Tabla S2. Ganancias y pérdidas fenotípicas para la cepa mutante Δppx .

Ganancias fenotípicas		
Compuesto	Diferencia	Modo de acción
a-Hydroxybutyric Acid	74	C-Source, carboxylic acid
5-Azacytidine	133	DNA methylation,
Pipemidic Acid	115	DNA topoisomerase
Ciprofloxacin	97	DNA topoisomerase
Guanidine hydrochloride	188	Membrane, chaotropic agent
Pro-Asn	137	N-Source, peptide
Lys-Pro	127	N-Source, peptide
Pro-Arg	109	N-Source, peptide
Gly-Pro	106	N-Source, peptide
Pro-Pro	102	N-Source, peptide
Pro-Gln	96	N-Source, peptide
Ser-Pro	91	N-Source, peptide
Pro-Trp	90	N-Source, peptide
Thr-Pro	78	N-Source, peptide
Ala-Pro	73	N-Source, peptide
5-Fluoro-5'-deoxyuridine	232	Nucleic acid analog, pyrimidine,
Hygromycin B	131	Protein synthesis, 30S ribosomal
Thiamphenicol	191	Protein synthesis, amphenicol
Chloramphenicol	77	Protein synthesis, amphenicol
Guanazole	91	Ribonucleotide DP reductase
Lithium chloride	196	Toxic cation
100mM Sodium Nitrate	540	Toxicity, nitrate
Pérdidas fenotípicas		
Compuesto	Diferencia	Modo de acción
D-Serine	-84	C-Source, amino acid
Ala-Gly	-83	C-Source, amino acid
L-Rhamnose	-87	C-Source, carbohydrate
D,L-a-Glycerol Phosphate	-84	C-Source, carbohydrate
D-Ribose	-82	C-Source, carbohydrate
D-Saccharic Acid	-114	C-Source, carboxylic acid
a-Ketoglutaric Acid	-104	C-Source, carboxylic acid
Mucic Acid	-78	C-Source, carboxylic acid

Pyrophosphate	-127	Chelator, hydrophilic
Nalidixic acid	-75	DNA topoisomerase
2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridine	-175	Folate antagonist, vibriostatic
D-Serine	-137	Inhibits 3PGA dehydrogenase
D-Alanine	-84	N-Source, amino acid
L-Glutamine	-81	N-Source, amino acid
Cytidine	-127	N-Source, other
Adenosine	-122	N-Source, other
D-Glucosamine	-110	N-Source, other
N-Acetyl-D-Glucosamine	-110	N-Source, other
Gln-Gln	-112	N-Source, peptide
Ala-Gln	-105	N-Source, peptide
Ala-Thr	-105	N-Source, peptide
Ala-Gly	-99	N-Source, peptide
Trp-Ala	-98	N-Source, peptide
Gln-Gly	-96	N-Source, peptide
Met-Gln	-96	N-Source, peptide
Gly-Gln	-94	N-Source, peptide
Ala-Gln	-89	N-Source, peptide
Ala-Trp	-86	N-Source, peptide
Ala-Thr	-84	N-Source, peptide
Ala-Asn	-81	N-Source, peptide
Gly-Ala	-78	N-Source, peptide
Tyr-Gln	-78	N-Source, peptide
Ala-Tyr	-76	N-Source, peptide
Ala-Gly	-75	N-Source, peptide
Ala-Phe	-74	N-Source, peptide
10% Ethylene Glycol	-105	Osmotic sensitivity, ethylene
15% Ethylene Glycol	-102	Osmotic sensitivity, ethylene
Lawsone	-247	Oxidizing agent
Adenosine 2',3'-Cyclic Monophosphate	-79	P-Source, organic
Chelerythrine	-154	Protein kinase C inhibitor
Josamycin	-164	Protein synthesis, 50S ribosomal
Iodonitro tetrazolium violet	-161	Respiration
100mM Ammonium Sulfate pH 8	-109	Toxicity, ammonia
Cefmetazole	-136	Wall, cephalosporin
Cefoxitin	-75	Wall, cephalosporin

Tabla S3. Ganancias y pérdidas fenotípicas para la cepa mutante $\Delta poliP$

Ganancias fenotípicas		
Compuesto	Diferencia	Modo de acción
D-Malic Acid	120	C-Source, carboxylic acid
a-Hydroxybutyric Acid	97	C-Source, carboxylic acid

a-Ketobutyric Acid	89	C-Source, carboxylic acid
Propionic Acid	82	C-Source, carboxylic acid
Mono-Methylsuccinate	76	C-Source, carboxylic acid
Glycine	144	N-Source, amino acid
Ammonia	120	N-Source, inorganic
L-Ornithine	114	N-Source, amino acid
D-Asparagine	111	N-Source, amino acid
d-Amino-N-Valeric Acid	109	N-Source, other
L-Alanine	108	N-Source, amino acid
L-Asparagine	107	N-Source, amino acid
L-Arginine	105	N-Source, amino acid
Cytosine	102	N-Source, other
L-Lysine	89	N-Source, amino acid
Adenine	85	N-Source, other
L-Glutamine	85	N-Source, amino acid
Putrescine	85	N-Source, other
L-Phenylalanine	79	N-Source, amino acid
D-Alanine	77	N-Source, amino acid
L-Glutamic Acid	76	N-Source, amino acid
g-Amino-N-Butyric Acid	75	N-Source, other
D-Valine	73	N-Source, amino acid
Pyrophosphate	103	P-Source, inorganic
Trimetaphosphate	101	P-Source, inorganic
Phosphate	100	P-Source, inorganic
D-2-Phospho-Glyceric Acid	123	P-Source, organic
Adenosine 3',5'-Cyclic	121	P-Source, organic
D-3-Phospho-Glyceric Acid	119	P-Source, organic
O-Phospho-D-Tyrosine	115	P-Source, organic
Carbamyl Phosphate	114	P-Source, organic
6-Phospho-Gluconic Acid	114	P-Source, organic
O-Phosphoryl-Ethanolamine	114	P-Source, organic
Phospho-L-Arginine	113	P-Source, organic
O-Phospho-L-Threonine	109	P-Source, organic
Inositol Hexaphosphate	108	P-Source, organic
Phospho-Glycolic Acid	102	P-Source, organic
O-Phospho-D-Serine	101	P-Source, organic
Phosphoryl Choline	101	P-Source, organic
Thymidine 5'-Monophosphate	98	P-Source, organic
Adenosine 2'-Monophosphate	97	P-Source, organic
D-Mannose-1-Phosphate	92	P-Source, organic
Thymidine 3'-Monophosphate	90	P-Source, organic
Cysteamine-S-Phosphate	85	P-Source, organic
Phosphoenol Pyruvate	80	P-Source, organic
Guanosine 2',3'-Cyclic	73	P-Source, organic
Thiosulfate	116	S-Source, inorganic

Tetrathionate	110	S-Source, inorganic
Sulfate	94	S-Source, inorganic
Thiophosphate	82	S-Source, inorganic
D-Cysteine	128	S-Source, organic
Cys-Gly	127	S-Source, organic
Glutathione	115	S-Source, organic
L-Cysteine Sulfinic Acid	111	S-Source, organic
Lanthionine	103	S-Source, organic
Dithiophosphate	93	S-Source, organic
Taurine	82	S-Source, organic
L-Cysteine	79	S-Source, organic
Cystathionine	79	S-Source, organic
Hypotaurine	77	S-Source, organic
L-Djenkolic Acid	76	S-Source, organic
D-Methionine	75	S-Source, organic
L-Methionine Sulfoxide	73	S-Source, organic
Gly-Met	70	S-Source, organic
Gln-Glu	142	N-Source, peptide
Gly-Met	139	N-Source, peptide
Lys-Ser	135	N-Source, peptide
Asp-Gly	133	N-Source, peptide
Lys-Ala	132	N-Source, peptide
Gly-Asn	130	N-Source, peptide
Lys-Asp	130	N-Source, peptide
Asp-Lys	128	N-Source, peptide
His-Ser	126	N-Source, peptide
Asp-Leu	124	N-Source, peptide
Asp-Ala	124	N-Source, peptide
Asp-Gln	123	N-Source, peptide
Leu-Glu	121	N-Source, peptide
Ser-Met	121	N-Source, peptide
Pro-Asp	120	N-Source, peptide
Ile-Asn	119	N-Source, peptide
Glu-Ala	118	N-Source, peptide
Pro-Asn	118	N-Source, peptide
Phe-Gly-Gly	118	N-Source, peptide
Gly-Glu	117	N-Source, peptide
Gly-Ile	117	N-Source, peptide
Thr-Asp	116	N-Source, peptide
Leu-Arg	115	N-Source, peptide
Gly-Gly-Gly	115	N-Source, peptide
Gly-Gly-Phe	114	N-Source, peptide
Arg-Asp	113	N-Source, peptide
Phe-Glu	113	N-Source, peptide
Pro-Arg	113	N-Source, peptide

Cys-Gly	112	N-Source, peptide
Gly-Lys	112	N-Source, peptide
Met-Arg	112	N-Source, peptide
Gly-Phe-Phe	112	N-Source, peptide
Lys-Gly	111	N-Source, peptide
Lys-Arg	110	N-Source, peptide
Met-Gly	110	N-Source, peptide
Pro-Gly	110	N-Source, peptide
Gly-Asp	110	N-Source, peptide
Arg-Ser	109	N-Source, peptide
Phe-Asp	109	N-Source, peptide
Gly-Arg	108	N-Source, peptide
Gly-Met	108	N-Source, peptide
His-Asp	108	N-Source, peptide
Ile-Gln	108	N-Source, peptide
Lys-Thr	108	N-Source, peptide
Ile-Arg	107	N-Source, peptide
Lys-Pro	107	N-Source, peptide
Pro-Gln	107	N-Source, peptide
Phe-Met	107	N-Source, peptide
Gly-Phe	106	N-Source, peptide
Gly-Ser	105	N-Source, peptide
Lys-Trp	105	N-Source, peptide
Ile-Leu	105	N-Source, peptide
Lys-Met	105	N-Source, peptide
D-Ala-Gly	105	N-Source, peptide
Ser-Phe	104	N-Source, peptide
Gly-Asn	103	N-Source, peptide
Tyr-Gly	103	N-Source, peptide
Ser-Asn	103	N-Source, peptide
Glu-Trp	102	N-Source, peptide
Glu-Gly	101	N-Source, peptide
Gly-Thr	101	N-Source, peptide
Ile-Gly	101	N-Source, peptide
Ile-Ser	101	N-Source, peptide
Lys-Ile	100	N-Source, peptide
Ser-Gly	100	N-Source, peptide
Thr-Leu	100	N-Source, peptide
Thr-Gln	100	N-Source, peptide
Gly-Gly-Ile	99	N-Source, peptide
Tyr-Gly-Gly	99	N-Source, peptide
Ala-Glu	98	N-Source, peptide
Gly-His	98	N-Source, peptide
Ser-Asp	98	N-Source, peptide
Arg-Met	97	N-Source, peptide

Ile-Ala	97	N-Source, peptide
Arg-Ala	96	N-Source, peptide
Glu-Asp	96	N-Source, peptide
His-Gly	96	N-Source, peptide
Met-Glu	96	N-Source, peptide
Ala-Ile	96	N-Source, peptide
His-Glu	96	N-Source, peptide
Leu-Pro	96	N-Source, peptide
Ala-Arg	95	N-Source, peptide
Asp-Glu	95	N-Source, peptide
Thr-Met	95	N-Source, peptide
Gly-Gly-Ala	95	N-Source, peptide
Ala-His	94	N-Source, peptide
Arg-Lys	94	N-Source, peptide
Asn-Glu	94	N-Source, peptide
Gly-Gly	94	N-Source, peptide
Phe-Gly	94	N-Source, peptide
Ala-Met	94	N-Source, peptide
Leu-His	94	N-Source, peptide
Arg-Ile	93	N-Source, peptide
Lys-Glu	93	N-Source, peptide
Ser-His	93	N-Source, peptide
His-His	93	N-Source, peptide
Arg-Phe	92	N-Source, peptide
Ala-Ala-Ala	92	N-Source, peptide
Gly-Gly-Leu	92	N-Source, peptide
Ser-Glu	91	N-Source, peptide
Thr-Glu	90	N-Source, peptide
Ala-Asp	90	N-Source, peptide
Glu-Glu	89	N-Source, peptide
Gly-Cys	89	N-Source, peptide
Met-Asp	89	N-Source, peptide
Ala-His	88	N-Source, peptide
Arg-Tyr	86	N-Source, peptide
Met-Thr	85	N-Source, peptide
Met-Lys	84	N-Source, peptide
Glu-Tyr	83	N-Source, peptide
Thr-Gly	83	N-Source, peptide
Tyr-Lys	83	N-Source, peptide
Pro-Trp	83	N-Source, peptide
Arg-Glu	80	N-Source, peptide
Pro-Ala	80	N-Source, peptide
Ala-Glu	79	N-Source, peptide
Ala-Lys	79	N-Source, peptide
Phe-Ser	79	N-Source, peptide

His-Ala	79	N-Source, peptide
Pro-Ser	79	N-Source, peptide
Lys-Leu	78	N-Source, peptide
Met-Leu	78	N-Source, peptide
Met-Phe	78	N-Source, peptide
Phe-Ala	78	N-Source, peptide
Asp-Asp	77	N-Source, peptide
Gly-Pro	77	N-Source, peptide
Gly-Tyr	77	N-Source, peptide
Thr-Ser	77	N-Source, peptide
Arg-Arg	75	N-Source, peptide
Arg-Gln	75	N-Source, peptide
Leu-Asp	75	N-Source, peptide
Pro-Hyp	75	N-Source, peptide
Ser-Tyr	75	N-Source, peptide
Ala-Ala	74	N-Source, peptide
Met-Met	73	N-Source, peptide
Ser-Gln	73	N-Source, peptide
Thr-Phe	73	N-Source, peptide
Leu-Met	72	N-Source, peptide
Tyr-Leu	72	N-Source, peptide
D-Ala-Gly-Gly	72	N-Source, peptide
Ala-Gly	71	N-Source, peptide
Arg-Trp	71	N-Source, peptide
His-Lys	71	N-Source, peptide
Ala-Thr	70	N-Source, peptide
100mM Sodium Nitrite	295	Toxicity, nitrite
200mM Sodium Phosphate pH 7	266	Osmotic sensitivity; sodium phosphate
pH 9.5 + L-Asparagine	154	pH, deaminase
pH 9.5 + Glycine	140	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Arginine	138	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Serine	137	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Glutamine	130	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Lysine	130	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Threonine	129	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Glutamic Acid	128	pH, deaminase
pH 9.5 + Hydroxy-L-Proline	121	pH, deaminase
pH 9.5 + Anthranilic Acid	121	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Aspartic Acid	120	pH, deaminase
pH 9.5 + Urea	111	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Histidine	108	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Methionine	107	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Proline	93	pH, deaminase
pH 9.5 + Creatine	89	pH, deaminase
pH 9.5 + L-Isoleucine	84	pH, deaminase

pH 6	79	pH, growth at 6
X-β-D-Galactosaminide	102	β-D-galactosaminidase
X-α-D-Galactoside	110	α-D-galactosidase
X-β-D-Glucosaminide	111	β-D-glucosaminidase
X-α-D-Glucoside	145	α-D-glucosidase
X-β-D-Glucoside	103	β-D-glucosidase
X-α-D-Glucuronide	105	α-D-glucuronidase
X-β-D-Glucuronide	104	β-D-glucuronidase
X-α-D-Mannoside	99	α-D-mannosidase
X-PO4	93	aryl phosphatase
Nitrite	166	Toxic anion
Sodium metaborate	138	Toxic anion
Guanidine hydrochloride	226	Membrane, chaotropic agent
Sodium caprylate	81	Respiration, ionophore, H ⁺
Methyltrioctylammonium chloride	43	Membrane, detergent, cationic

Pérdidas fenotípicas

Compuesto	Diferencia	Modo de acción
Sulfamonomethoxine	-154	Folate antagonist
Sulfachloropyridazine	-125	Folate antagonist, PABA analog
2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridine	-142	Folate antagonist, vibriostatic agent
Lawsone	-90	Oxidizing agent

7. Bibliografía

Ahn K, Kornberg A. (1990) Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*: Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *The Journal of Biological Chemistry* 265(20):11734-9.

Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *The Journal of Biological Chemistry* 268(1):633-9.

Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E. (2001) Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research* 11(7):1246-55.

Bochner BR. (2009) Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 33(1):191-205.

Campos M, Surovtsev IV, Kato S, Paintdakhi A, Beltran B, Ebmeier SE, Jacobs-Wagner C. (2014) A constant size extension drives bacterial cell size homeostasis. *Cell*. 159(6):1433-46.

Chávez FP, Gordillo F, Jerez CA. (2006) Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnology Advances*. 24(3):309-20.

Chávez FP, Mauriaca C, Jerez CA. (2009) Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria. *BMC Research Notes*. 2:50. doi: 10.1186/1756-0500-2-50.

Crooke E, Akiyama M, Rao NN, Kornberg A. (1994) Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 269(9):6290-5.

Datsenko KA, Wanner BL. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 97(12):6640-5.

Hsieh PC, Shenoy BC, Jentoft JE, Phillips NF. (1993) Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: evidence that poly(P) and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. *Protein Expression and Purification*. 4(1):76-84.

Ishige K, Zhang H, Kornberg A. (2002) Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 99(26):16684-8.

Keasling JD, Bertsch L, Kornberg A. (1993) Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 90(15):7029-33.

Keasling JD, Hupf GA. (1996) Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(2):743-6.

Kornberg A. (1995) Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*. 177(3):491-6.

Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*. 68:89-125.

Maisonneuve E., Castro-Camargo M, Gerdes K. (2013) (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*. 154(5):1140-50.

Milo R, Jorgensen P, Moran U, Weber G, Springer M. (2010) BioNumbers--the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Research* 38:D750-3.

Ortiz-Severín J, Varas M, Bravo-Toncio C, Guiliani N, Chávez FP. (2015) Multiple antibiotic susceptibility of polyphosphate kinase mutants (ppk1 and ppk2) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as revealed by global phenotypic analysis. *Biological Research* 48:22

Paradela A, Marcilla M, Navajas R, Ferreira L, Ramos-Fernandez A, Fernández M, Mariscotti JF, García-del Portillo F, Albar JP. (2010) Evaluation of isotope-coded protein labeling (ICPL) in the quantitative analysis of complex proteomes. *Talanta*. 80(4):1496-502.

Pick U, Weiss M. (1991) Polyphosphate Hydrolysis within Acidic Vacuoles in Response to Amine-Induced Alkaline Stress in the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*. 97(3):1234-40.

Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual Review of Biochemistry*. 78:605-47.

Rashid MH, Rao NN, Kornberg A. (2000) Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of Bacteriology*. 182(1):225-7.

Reasoner DJ, Geldreich EE. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* 49(1):1-7.

Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr, Bork P, Sander C. (1993) Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp 70 superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*. 18(7):247-8.

Tanaka S, Lee SO, Hamaoka K, Kato J, Takiguchi N, Nakamura K, Ohtake H, Kuroda A. (2003) Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlunatus phosphovorius*. *Journal of Bacteriology*. 185(18):5654-6.

Valdivieso C. (2011) Estudios de proteómica cuantitativa en mutantes de *Escherichia coli* deficientes en las enzimas relacionadas con el metabolismo de los polifosfatos inorganicos. Seminario de Titulo, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Van Dien SJ, Keyhani S, Yang C, Keasling JD. (1997) Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(5):1689-95.

Varas MA, Valdivieso C, Mauriaca C, Ortíz-Severín J, Paradela A, Poblete-Castro I, Cabrera R, Chávez FP. (2016) Multi-level biology analyses of *Escherichia coli* polyphosphate metabolism mutants reveal metabolic adaptation and regulatory role in bacterial resistance. *Biochimica et Biophysica Acta – en revisión*.

Voelz H, Voelz U, Ortigoza RO. (1966) The "polyphosphate overplus" phenomenon in *Myxococcus xanthus* and its influence on the architecture of the cell. *Archiv für Mikrobiologie*. 53(4):371-88.

Zhang H, Ishige K, Kornberg A. (2002) A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 99(26):16678-83.

Zhang H, Rao NN, Shiba T, Kornberg A. (2005) Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: motility, development, and predation. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. 102(38):13416-20.

Zhang H, Gómez-García MR, Shi X, Rao NN, Kornberg A. (2007) Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. 104(42):16486-9.

Zhou L., Lei XH, Bochner BR, Wanner BL. (2003) Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. Journal of Bacteriology 185(16):4956-72.