



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Caracterització fisiològica i identificació de noves soques bacterianes del complex d'espècies de *Pseudomonas putida*.

Josep Miquel Bordoy Homar

Grau de Biologia

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43183789R

Treball tutelat per Jordi Lalucat Jo
Departament de Microbiologia

NO

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball: *Pseudomonas*, WC-MALDI-TOF, espectre de proteïnes.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ.....	4
Gènere <i>Pseudomonas</i>	4
Complex d'espècies <i>Pseudomonas putida</i>	6
Espectrometria de masses WC MALDI-TOF.....	7
OBJECTIUS DE L'ESTUDI.....	8
MATERIAL Y MÈTODES.....	8
Microorganismes i soques.....	8
Medi i condicions de cultiu.....	9
Corbes de creixement.....	9
Preparació de les mostres per a WC MALDI-TOF.....	10
Anàlisis d'espectres amb el programa Biotyper.....	11
RESULTATS.....	13
Corbes de creixement.....	13
Espectres d'absorció.....	14
Dendrogrames i filogènia.....	21
DISCUSSIÓ I CONCLUSIÓ.....	23
Influència de les fases de creixement.....	23
Identificació dels microorganismes per espectrometria de masses.....	24
Associacions proteiques.....	25
AGRAÏMENTS.....	25
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....	25

Introducció.

Gènere *Pseudomonas*.

Pseudomonas és un gènere de microorganismes compost per espècies que presenten la capacitat d'utilitzar una àmplia varietat de composts orgànics e inorgànics i de viure sota diverses condicions ambientals. Per aquesta raó, són omnipresents en ambients terrestres i aquàtics, i tenen una gran importància com a patògens de plantes, animals i humans. (Palleroni. 1992; Schroth et al. 1992). Aquest gènere presenta un creixement ràpid i la capacitat per a metabolitzar un elevat nombre de substrats diferents, fins i tot alguns productes orgànics tòxics. Les espècies de *Pseudomonas* solen presentar resistència a antibiòtics, detergents, desinfectants, metalls pesats i dissolvents orgànics. Les soques de *Pseudomonas* són bacteries de gran importància en el medi ambient en el reciclatge dels nutrients, i també són importants en medicina i biotecnologia. El gènere es troba àmpliament distribuït a la natura, cobrint molts hàbitats diferents i colonitzant molts sòls, aigües, animals i plantes. Com s'ha comentat, algunes espècies són patògenes per als éssers humans (*Pseudomonas aeruginosa*), els animals (*Pseudomonas baetica*) i les plantes (*Pseudomonas syringae*). Per altre banda, moltes altres espècies són beneficioses en la rizosfera, i algunes son utilitzades com agents de control biològic de malalties de plantes com *Pseudomonas protegens*. (Palleroni et al. 2005).

El gènere *Pseudomonas* es defineix per les bacteries que presenten una morfologia de bacil, recta o lleugerament corbada, són Gramnegatives i, normalment, mòbils. Els organismes són aeròbics i utilitzen l'oxigen com a dador d'electrons, però, en alguns casos, el nitrat pot actuar com a dador d'electrons alternatiu. Les soques poden ser positives o negatives per a l'oxidasa i positives per a la catalasa. Totes les soques son quimioorganòtrofes i algunes espècies són capaces d'acumular polihidroxicanoats com a material de reserva. El genoma sol presentar uns valors de G+C del 58-69 mol%. (Palleroni. 2005).

El gènere va ser descrit per Migula en 1894 basant-se en les característiques morfològiques de cada un dels seus membres. (Migula. 1900). Durant molts anys, el gènere va estar compost per moltes espècies que no havien estat ben caracteritzats fins els treballs de Stanier i els seus col·laboradors. (Stanier et al. 1966). Es van basar en la fisiologia i les propietats bioquímiques per a establir clarament les bases taxonòmiques per la identificació de les espècies. Durant els darrers anys, moltes de les espècies que s'havien descrit en un principi com a *Pseudomonas*, s'han re classificat en nous gèneres. Degut a l'heterogeneïtat de la filogènia d'aquest gènere, s'ha realitzat una revaluació de les principals característiques fenotípiques, activitats metabòliques, la genètica, l'ecologia i altres característiques del gènere.

El gènere *Pseudomonas* és un dels més complexes gèneres bacterians i, fins el moment, és el grup de Gramnegatius que presenta el major nombre d'espècies, des de 140 espècies i subespècies. A més, el nombre d'espècies descrites es troba en continu creixement. (Palleroni et al. 2005).

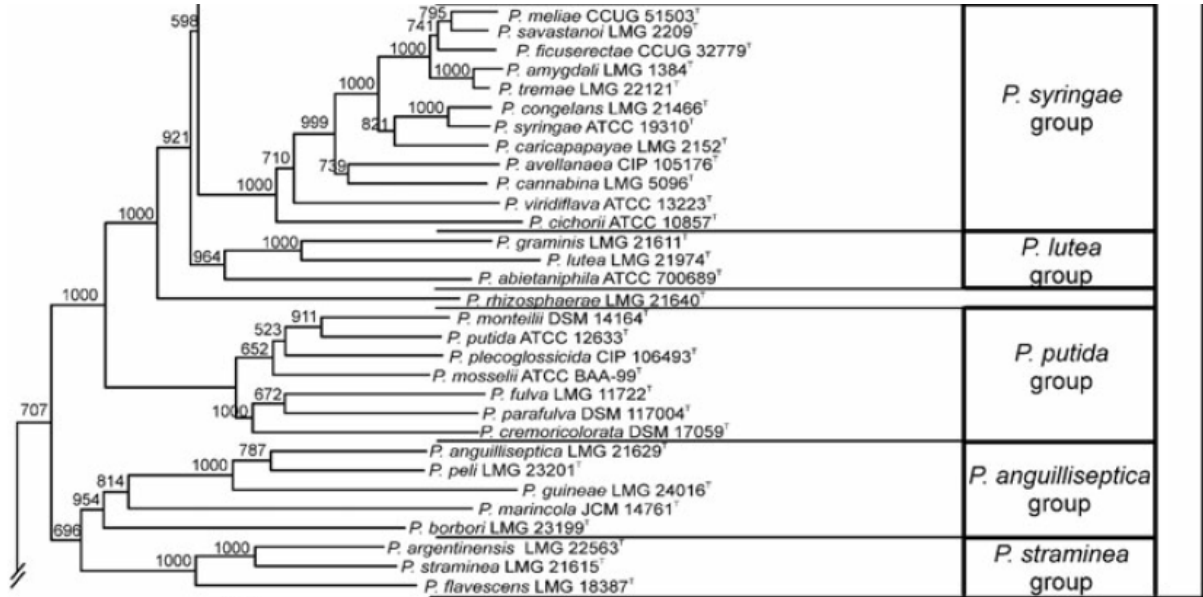
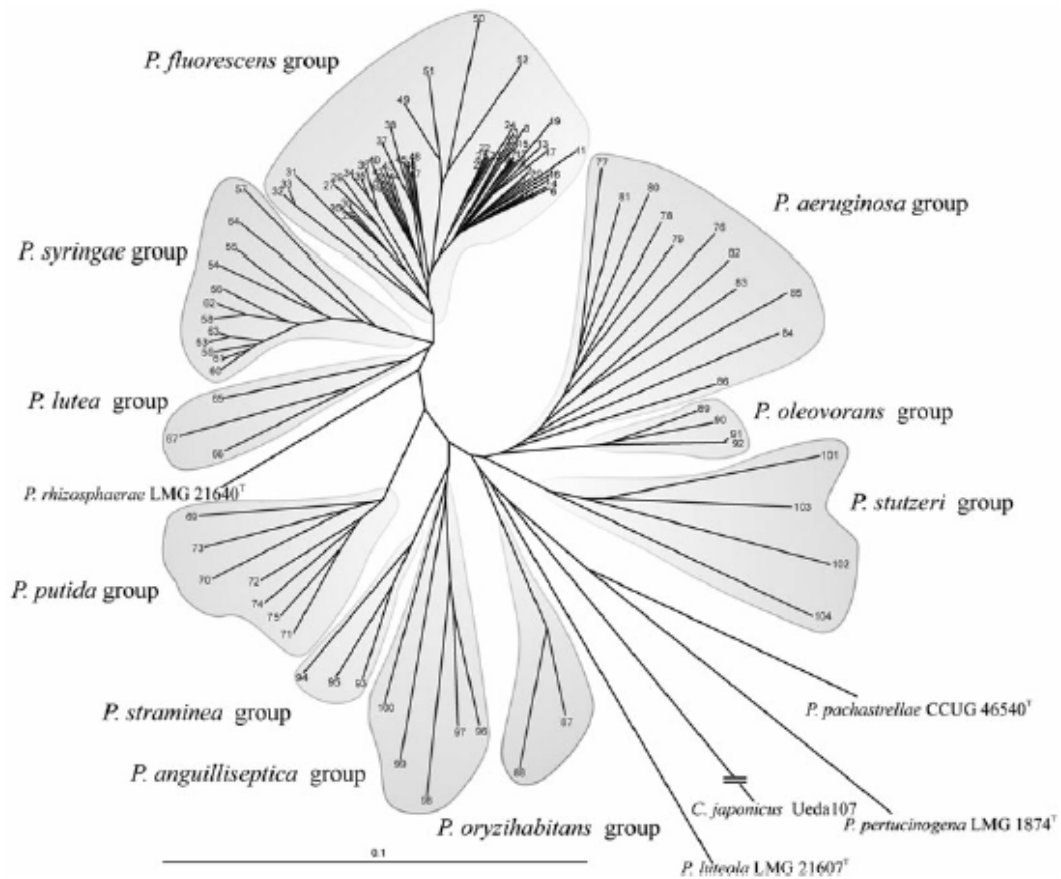


Figura 1. Arbre filogenètic del gènere *Pseudomonas*, realitzat a partir de l'anàlisi de 4 gens: ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* i *rpoD* (Mulet et al. 2010).

Complex d'espècies *Pseudomonas putida*.

En la figura anterior es mostra el gènere *Pseudomonas* dividit en els diferents grups segons un anàlisi filogenètic a partir de les seqüències parcials de 4 gens (ARNr 16S, gyrB, rpoB i rpoD). Aquest arbre filogenètic proposat per Mulet et al. (2010), constitueix la base de la classificació actual del gènere. S'observa com hi ha un grup al que s'anomena complex d'espècies *P. putida*. En aquest grup d'organismes s'hi troben les soques de diferents espècies: *P. cremoricolorata*, *P. fulva*, *P. mosselii*, *P. monteilii*, *P. parafulva*, *P. plecoglossicida* i *P. putida*. En aquest estudi ens basarem en l'anàlisi d'aquest complex d'espècies de *P. putida*.

Les soques de *P. putida* són respiratòries estrictes, bacils gramnegatius amb flagel·lació polar dins les grammaproteobactèria. (Palleroni, 2005). L'espècie *P. putida* és coneguda per la seva versatilitat metabòlica i la seva capacitat d'adaptació a diferents ambients: es distribueixen en aigües i sòls, i poden sobreviure en ambients altament contaminants, jugant un important paper en la bioremediació (Timmis, 2002) Les soques de *P. putida* es descriuen com a no patògens i sols hi ha alguns casos de patògens clínics oportunistes. (Perz et al. 2005).

P. putida pertany al grup fenotípic anomenat *Pseudomonas* fluorescents. Juntament amb *P. putida*, dins el grup de fluorescents, s'hi troben *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* i *P. syringae*. Aquestes espècies s'han diferenciat seguint les característiques fenotípiques, tals com proves bioquímiques, composició d'àcids grassos i perfils de proteïnes. (Stainer et al., 1995).

L'alta heterogeneïtat fenotípica dels membres de *P. putida* ha portat a la subdivisió d'aquest grup en 2 biotips principals, biotip A (que és considerat el 'vertader' *P. putida*) i biotip B, seguit per un tercer biotip C, definit per l'anàlisi numèric de dades fenotípiques. Stenström et al. (Palleroni, 2005) demostraren, per taxonomia numèrica, que algunes soques descrites en un principi com a *P. putida* no poden estar afiliats a cap dels biotips descrits anteriorment. Algunes d'aquestes soques s'han re classifcat com a *Pseudomonas mosselii* o *Pseudomonas monteilii*. (Dabboussi et al. 2002).

La caracterització de procariotes pot seguir dos models bàsics d'anàlisi, la caracterització per trets fenotípics i la caracterització per trets genotípics. La taxonomia polifàsica intenta integrar ambdós tipus de característiques. Els trets fenotípics són les característiques observables que resulten de l'expressió de gens d'un organisme. Els trets genotípics d'un organisme són aquells del seu material genètic, el genoma (Tindall et al. 2010). La classificació dels microorganismes es troba contínuament canviant com a conseqüència de l'evolució progressiva de les tècniques d'anàlisi. La taxonomia procariota s'està convertint en una disciplina amb una elevada diversitat de tècniques per analitzar els organismes. Les metodologies actuals emprades per anàlisi de soques procariotes són massa lents i requereixen molta mà d'obra i esforç per ser veritablement efectives. Afortunadament, les noves tecnologies que s'empren per a la identificació a nivell d'espècie, són extremadament ràpides i de baix cost, com l'espectrometria de masses (MALDI-TOF) o l'espectroscòpia Raman. Aquestes tècniques són els nous mitjans per a restablir de forma eficaç, les interaccions taxonòmiques i filogènia (Moore et al. 2010).

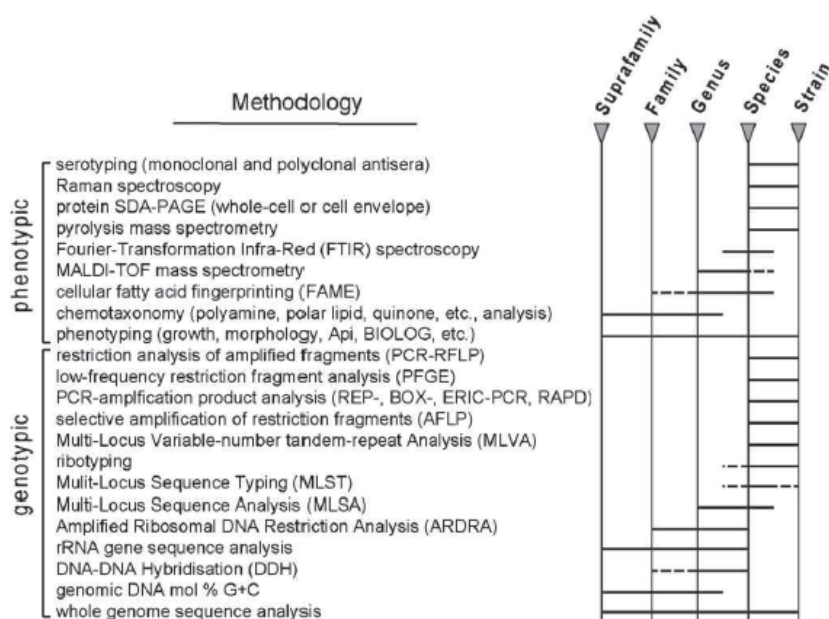


Figura 2. Metodologies per a la caracterització dels procarïotes i les respectives aproximacions dels nivells taxonòmics (Vandamme et al. 1996)

Espectrometria de masses WC MALDI-TOF.

Paral·lelament a les tècniques basades en la seqüenciació, els mètodes quimiotaxònics també han suposat un avanç en l'aclariment de la taxonomia del gènere. Una de les tècniques més recents es la coneguda com WC-MALDI-TOF MS, de l'anglès "Whole-cell matrix-assisted laser-desorption time-of-flight mass spectrometry. El 1975 es va descobrir l'eficiència d'aquesta tècnica per a l'anàlisi bacteriana, tot i que es va començar a aplicar recentment per a la sistemàtica microbiana (Welker et al. 2011). S'han anat desenvolupant les característiques d'aquesta tècnica per incloure-la a la microbiologia clínica per a la realització d'estudis per identificar bacils gramnegatius en cultius de sang o en cultius de pacients amb fibrosis quística (Loonen et al. 2011). Els resultats d'aquestes identifikacions s'han comparat amb els resultats obtinguts mitjançant metodologies fenotípiques (com l'API o el Vitek) proporcionant resultats satisfactoris.

El MALDI-TOF és una tècnica que examina les masses moleculars de les proteïnes bacterianes que han estat ionitzades a partir de cèl·lules bacterianes intactes. Els anàlisis de l'espectre es realitzen a través d'una relació de massa / càrrega (m/z) que oscil·la entre 2.000-20.000 Da (Arnold et al. 1998).

MALDI-TOF s'ha aplicat al gènere *Pseudomonas* com a una tècnica complementària en la proposta de noves espècies o per caracteritzar les espècies en el grup de *P. putida* o la descripció taxonòmica de *P. Entomophila* (Mulet et al. 2012). La concordança entre els agrupaments d'espècies pel MALDI-TOF i pels anàlisis filogenètics ha estat demostrada també per Scotta et al. (2013).

L'exactitud de la identificació per aquesta tècnica depèn de la base de dades de referència.

Objectius de l'estudi.

Els objectius de l'estudi es bàsicament observar la diferenciació entre soques d'espècies del complex de *P. putida* mitjançant l'espectrometria de masses. En primer lloc s'han d'establir les condicions per una bona reproductibilitat del mètode i s'han de comprovar les identificacions amb soques de referència. S'utilitzarà la tècnica de MALDI-TOF per a determinar l'agrupació de les diferents espècies dins aquest complex. També es tractarà de comparar les mostres de l'estudi amb les diferents soques de la base de dades del programa MALDI Biotyper. A més d'això, es vol observar si existeixen diferències en els resultats segons la fase de creixement de la bactèria.

Material i mètodes.

Soques dels microorganismes.

El grup de prova va consistir en 19 aïllats bacterians, tots representants del mateix gènere *Pseudomonas* i de 13 espècies diferents, que pertanyien a l'anomenat complexa *P. putida*. Tal com s'indica a la Taula 1, es varen incloure 11 soques tipus de les 11 espècies reconegudes dins del grup de *P. putida*, altres 5 soques de referència ben estudiades per altres autors i 2 aïllaments nous del laboratori de Microbiologia de la UIB considerats com a representants d'una possible espècie nova.

Els aïllats es varen obtenir de la col·lecció de microorganismes del laboratori de l'àrea de microbiologia de la UIB. I procedien tant de mostres clíniques com ambientals.

Espècie	Font	referencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Derivat de JCM 6156 (degradador del meta-toluè; Japó).	Yamamoto & Harayama (1998)
<i>Pseudomonas putida</i> S12	Sòl del Campus de la UIB.	Sánchez (2013)
<i>Pseudomonas putida</i> IAM 1235 T	Sòl després d'enriquiment amb lactat .	Trevisan et al. (1889)
<i>Pseudomonas japonica</i> JCM21532 T	Llots activats de la planta de tractaments d'aigües residuals, Japó.	Pungrasmi et al. (2008)
<i>Pseudomonas</i> FBF18	Patogen de <i>Citrus</i> aïllat al Iran.	F. Beiki (comunicació personal)
<i>Pseudomonas putida</i> GB1	Aigua dolça, oxidant de manganès soluble.	Wu et al. (2011)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Rierol contaminat, capacitat de degradar hidrocarburs aromàtics; EUA.	Wu et al. (2011)
<i>Pseudomonas monteilii</i> ATCC700476 T	Mostres clíniques.	Elomari et al., 1997
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23483	Crostes d'òxid de manganès d'una canonada.	Caspi et al. (1998)

<i>Pseudomonas putida</i> G7	Sòl, degradador de naftalè.	Yamamoto & Harayama (1998)
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM21245 T	sòl; Taiwan.	Wang et al. (2009)
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 T	<i>Drosophila</i> ; Mèxic.	Mulet et al. (2012)
<i>Pseudomonas fulva</i> IAM 1529 T	Aïllada d'un arrossar.	Skerman et al, 1980)
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ATCC700383 T	Hemorràgia bacteriana d'un peix Ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>).	Nishimori et al., 200
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM17059 T	Aïllat d'arròs japonès.	Uchino et al., 2001
<i>Pseudomonas parafulva</i> DSM17004 T	Aïllat d'un arrossar japonès.	Uchno et al., 2001
<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> JCM16553	Sòl; Korea del Sud	Veeranagouda et al. (2011)
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM16006 T	Sòl i carretera; república Checa	Tvrzová et al. (2006)
<i>Pseudomonas mosselii</i> ATCC BAA-99 T	Mostres clíniques	Daboussi 2002

Taula 1. Llistat de totes les soques usades per al treball, a més de la seva font d'origen i la referència de la seva descripció.

Medi i condicions de cultiu.

Les soques varen créixer a una placa de Petri amb un medi de cultiu anomenat medi de Luria-Bertani o LB (Sambrook and Russell, 2001 Gerhardt, *et al.* 1994). Utilitzant la recepta estàndard: per 1 g de LB, 10g de Triptona, 5g d'extracte de llevat i 10g de NaCl. Un cop sembrades es varen incubar a l'estufa a 30°C durant 48 h. Quan els microorganismes havien crescut es ressemblava una colònia dins un tub d'assaig (160 x 16 mm) amb 4 ml de LB i es varen incubar 30°C 24 h amb agitació. 0.5 ml es varen inocular a 4 ml de LB a les mateixes condicions per 16-18 hores. 0.5 ml es varen inocular a un tub Falcon de 50ml amb 20 ml de medi de cultiu LB líquid i es deixava a una cambra a 30°C amb agitació orbital de 180 rpm i s'agafaven mostres periòdicament. De cada placa es realitzava un duplicat de tubs per a realitzar l'estudi dos pics amb la mateixa soca.

També s'ha de tenir en compte que el primer cop que s'agafava una mostra del tub, es va sembrar una colònia a una placa amb medi de cultiu LB i es deixà a 30°C durant 24h, per comprovar que es tenia un cultiu pur i que no s'havia contaminat la mostra. El mateix procés es realitzava al final de totes les lectures d'un aïllat.

Corbes de creixement.

Independentment del creixement dels aïllats i de la preparació d'aquests per al WC MALDI-TOF, també es varen realitzar corbes de creixement a 10 de les soques de l'estudi per a poder observar si hi havia diferències al perfil de proteïnes segons la fase de creixement del microorganisme.

Per a la realització de les corbes de creixement dels aïllats, es varen anar agafant mesures cada cert temps de la densitat òptica que presentava cada cultiu. Cada lectura es realitzava amb l'espectrofotòmetre model UVISpec, mesurant l'absorbància del cultiu a 600nm, mitjançant 1ml de mostra que s'introduïa a la cubeta del espectrofotòmetre. L'espectrofotòmetre era prèviament calibrat mitjançant una cubeta amb 1ml d'aigua destil·lada i tarant l'aparell.

Un cop es tenien els diferents resultats de cada mostra, es realitzaven les corbes de creixement, disposant a l'eix de les de les ordenades el valor d'absorbància i a l'eix de les abscisses, el temps. D'aquesta manera s'obté de forma gràfica i clara el creixement del microorganisme i les diferents etapes de latència, exponencial i estacionària. Aquestes corbes de creixement seran molt útils per observar la influència de l'estat de creixement en el perfil de proteïnes obtingut al MALDI-TOF i les diferències que pot produir aquest paràmetre en els resultats.

Preparació de les mostres per l'anàlisi WC MALDI-TOF.

Les condicions de cultiu tenen petits efectes sobre la identificació al MALDI-TOF. Es poden usar diferents medis de cultiu com el xocolata-agar, Agar-sang o altres, independentment de les diferents fases de creixement o temperatura de la mostra. Aquestes condicions de cultiu diferent, només produeixen petites variacions en els pics observats. Tot i això, s'haurien d'usar els mateixos medis de cultiu per a tots els microorganismes. En el nostre cas es va utilitzar medi de cultiu LB.

Degut a les característiques de la seva paret, certs microorganismes no poden ser identificats al WC MALDI-TOF directament des de el seu medi de cultiu, requerint un procés d'extracció previ amb la finalitat d'exposar les proteïnes intracel·lulars. Per aquest motiu es varen seguir les següents passes per a la preparació de les mostres per al WC MALDI-TOF:

1. Un cop es va realitzar la lectura de cada mostra amb l'espectrofotòmetre Ultrospec 1100 pro, es diposita la mostra a un tub eppendorf correctament etiquetat amb el nom de la soca i el temps d'incubació de la mostra.
2. Centrifugar a 16.000 rpm durant un minut a una Centrífuga Eppendorf 5415D amb rotor F45-24-11.
3. Posteriorment, s'elimina el sobrenedant de la mostra, s'afegeix 1ml de Ringer i es dona un cop de vòrtex. Es torna a centrifugar a 16.000rpm durant 1 minut.

4. Un cop hagi finalitzat es torna a eliminar el sobrenedant i s'introdueix 1 ml d'etanol. És molt important que, a partir d'aquest pas, els tubs siguin de la marca Eppendorf® ja que si és d'una altra marca o material, l'etanol pot degradar el plàstic i contaminar la mostra.
5. Un cop s'ha introduït l'etanol a la mostra i s'ha mesclat amb el vòrtex, es torna a centrifugar durant 2 minuts a 16.000rpm. Aquest pas es realitzarà dos cops per assegurar que sedimenta tota la mostra.
6. Es treu el tub de la centrífuga i s'elimina el sobrenedant amb una pipeta, amb molta cura i es deixa el tub obert, eixugant-se a temperatura ambient, durant uns minuts per a que s'acabi d'evaporar l'etanol.
7. S'afegeix 50µl d'àcid fòrmic 70% al pellet i es mescla amb molta cura amb la pipeta o el vòrtex.
8. S'afegeix 50µl d'acetonitril pur i es mescla amb molta cura i sense utilitzar vòrtex.
9. Es centrifuga a 16.000rpm durant 2 minuts de tal forma que tot el material es quedi en el pellet. Posteriorment, s'agafen 50µl del sobrenedant dins un nou Eppendorf®. (en aquest moment la mostra es pot conservar a -80°C, si no s'ha d'analitzar a l'espectròmetre de masses de forma immediata).
10. S'introdueix 1µl del tub i es diposita a la placa de l'analitzador, i es deixa eixugar a temperatura ambient.
11. Superposar el material amb 1µl d'àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic, que actuarà com a la matriu sòlida a la qual s'hi aplicarà la càrrega. Aquest àcid orgànic és el més usat per a l'anàlisi de pèptids en l'espectròmetre MALDI-TOF. Deixar eixugar-se a temperatura ambient per a que es cristal·litzi.

Aquesta matriu compleix dos rols fonamentals; primer exposa les proteïnes intracel·lulars mitjançant la ruptura de la membrana cel·lular i segon, facilita la vaporització i la ionització de les proteïnes mitjançant un fes de làser polsant.

Quan s'han preparat les mostres es dipositen sobre la placa de metall polit reutilitzable de l'aparell WC MALDI-TOF Autoflex III de la casa Bruker i s'introdueixen per a realitzar la lectura. Dins l'espectròmetre MALDI-TOF la mostra es irradiada amb un làser de nitrogen que carrega la matriu. Un cop ionitzades, aquestes proteïnes viatgen per una càmera de vuit sent detectades al final d'aquesta. El temps que tardí el fragment en arribar al final, dependrà de la relació massa/càrrega (m/z) de cada fragment. Aquest temps és anomenat "temps de vol" i és utilitzat per a construir l'espectre específic de les masses.

Anàlisis d'espectres amb el programa Biotyper.

Com a resultat, s'obté un nombre de 3 espectres per mostra analitzada, que és el nombre predeterminat de disparos del làser que realitza la màquina amb una potència i freqüència constants. Aquests espectres d'absorció de cada mostra van ser comparats amb els espectres d'una base de dades del programa Biotyper 2.0TM, mitjançant un algoritme de recerca. Aquest programa també t'obre una perspectiva per a la classificació de les soques de la mateixa espècie.

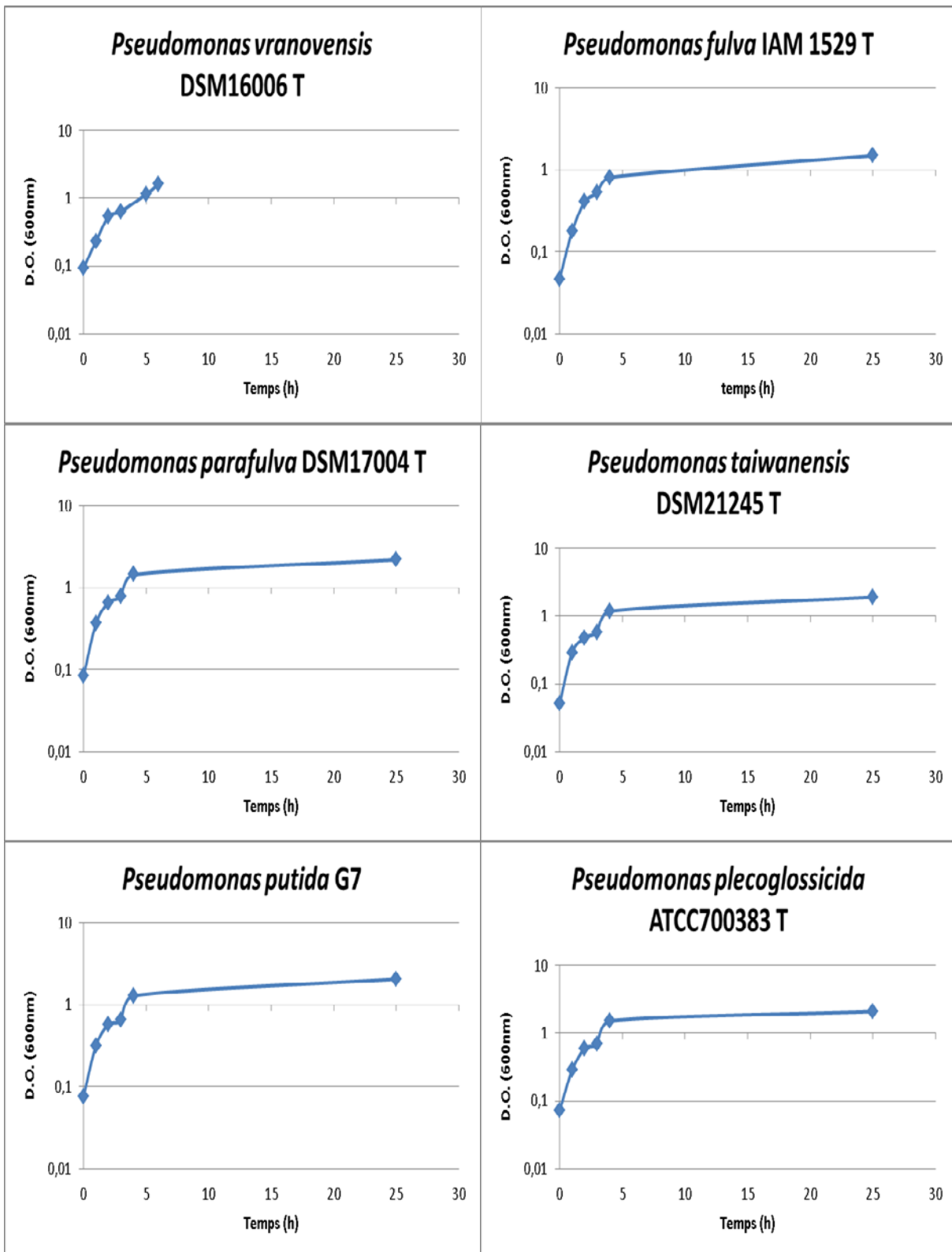
Aquests resultats de la identificació venen donats juntament amb un valor de similitud de les soques. Si aquest valor és igual o major a 2, la identificació és possible a nivell de gènere i espècie i es representarà amb un color verd; entre 1,7 i 1,9 la identificació és només a nivell de gènere i és representada per un color groc; i si es menor de 1,7 no dona cap identificació segura i es representa amb un color vermell.

A partir d'aquest programa es varen estudiar tots els perfils de proteïnes de cada mostra i es varen observar les diferències entre elles i la comparació amb les soques de la base de dades del programa. Aquesta base de dades del programa conté un llistat de soques sobretot de naturalesa clínica.

Des perfils de proteïnes també es pot generar amb el Biotyper un dendrograma de similituds que té en compte la coincidència de pics i la seva intensitat. Dóna una idea de les relacions de proximitat entre soques.

Resultats.

Corbes de creixement.



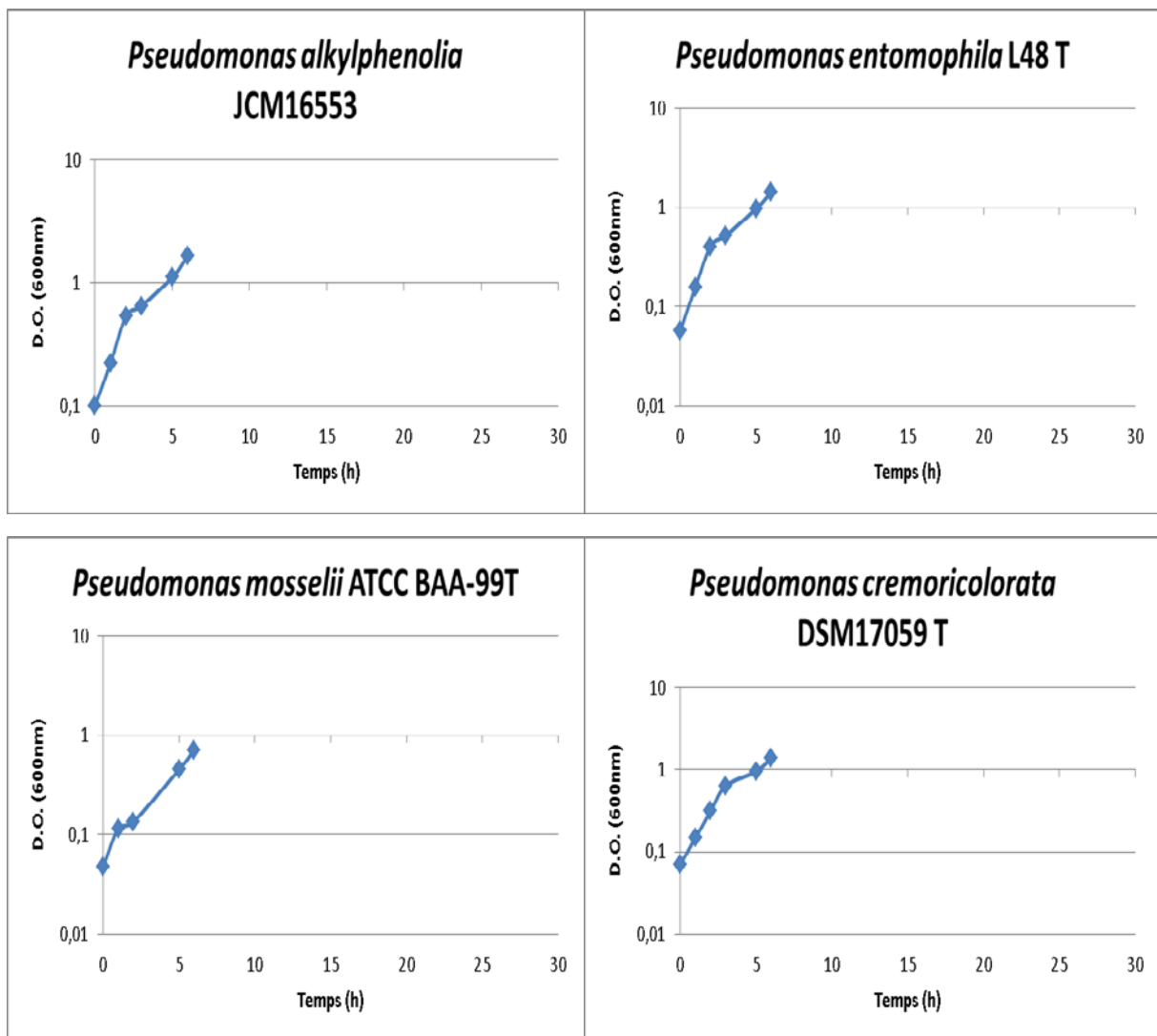


Figura 3. Representació de les corbes de creixement de 10 de les soques estudiades. A l'eix vertical es mostra el resultat de la densitat òptica de la lectura de l'espectrofotòmetre a 600nm, mentre que a l'eix horitzontal ve representat el temps. Algunes soques es varen mesurar fins les 25 hores i altres fins a les 7 hores.

Espectres de MALDI-TOF.

A la Taula 1 es resumeix tota la informació necessària de cada soca analitzada, el moment de la presa de mostra i del seu tractament. En ella es pot observar diferents dades d'importància com: les mostres realitzades de cada aïllat, indicant el nom complet de la soca i l'etiqueta que es va usar per a realitzar tots els experiments dins el laboratori i identificar a cada mostra, la data de la realització del creixement del microorganisme i la lectura de les densitats òptiques, la data en que es va realitzar la lectura en l'espectrofotòmetre MALDI-TOF, el temps d'incubació de cada mostra en el moment en que es va realitzar la lectura (h), la densitat òptica que va donar l'espectrofotòmetre a 600nm, el volum de cultiu que es va agafar per preparar les mostres, la biomassa total de la mostra segons la densitat òptica registrada i el

volum agafat de cada mostra (ml) i la posició que ocupava la mostra a la placa de l'espectròmetre MALDI-TOF.

Soca	Etiqueta	Data MALDI-TOF	Data mostra	Temp s incubació (h)	DO (600nm)	ml cultiu	biomasa equival./ml	Posició MALDI-TOF	
<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> JCM16553	P. alky 1A	25/03/2014	13/03/2014	2,5	0,65	2	1,3	E	13-15
<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> JCM16553	P. alky 1B	25/03/2014	13/03/2014	2,5	0,65	2	1,3	E	19-21
<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> JCM16553	P. alky 2	25/03/2014	13/03/2014	6	1,645	1	1,645	E	16-18
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM17059 T	P. cremo 1A	25/03/2014	13/03/2014	3	0,635	2	1,27	D	16-18
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM17059 T	P. cremo 1B	25/03/2014	13/03/2014	3	0,635	2	1,27	D	19-21
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM17059 T	P. cremo 2	25/03/2014	13/03/2014	6	1,377	1	1,377	F	7-9
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 T	P. ento 1A	25/03/2014	13/03/2014	3	0,524	2	1,048	C	19-21
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 T	P. ento 1B	25/03/2014	13/03/2014	3	0,524	2	1,048	D	1-3
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 T	P. ento 2	25/03/2014	13/03/2014	6	1,42	1	1,42	C	22-24
<i>Pseudomonas</i> FBF18	F18 1	10/03/2014	06/03/2014	3	0,325	3	0,975	O	7-9
<i>Pseudomonas</i> FBF18	F18 2	10/03/2014	06/03/2014	5	0,74	3	2,22	O	10-12
<i>Pseudomonas fulva</i> IAM 1529 T	fulva 1A	25/03/2014	12/03/2014	5	0,527	2	1,054	D	4-6
<i>Pseudomonas fulva</i> IAM 1529 T	fulva 1B	25/03/2014	12/03/2014	5	0,527	2	1,054	D	7-9
<i>Pseudomonas fulva</i> IAM 1529 T	fulva 2	25/03/2014	12/03/2014	8	0,81	1	0,81	D	10-12
<i>Pseudomonas japonica</i> JCM21532 T	JT 1	10/03/2014	06/03/2014	3	0,334	3	1,002	O	1-3
<i>Pseudomonas japonica</i> JCM21532 T	JT 2	10/03/2014	06/03/2014	5	0,37	3	1,11	O	4-6
<i>Pseudomonas monteilii</i> ATCC700476 T	MT 1	10/03/2014	07/03/2014	5	0,555	3	1,665	P	1-3
<i>Pseudomonas monteilii</i> ATCC700476 T	MT 2	10/03/2014	07/03/2014	7	1,017	3	3,051	P	4-6
<i>Pseudomonas mosselii</i> ATCC BAA-99 T	P. mosse 1A	25/03/2014	13/03/2014	4	0,452	2	0,904	F	10-12
<i>Pseudomonas mosselii</i> ATCC BAA-99 T	P. mosse 1B	25/03/2014	13/03/2014	4	0,452	2	0,904	F	13-15
<i>Pseudomonas mosselii</i> ATCC BAA-99 T	P. mosse 2	25/03/2014	13/03/2014	6	0,71	1	0,71	F	16-18
<i>Pseudomonas parafulva</i> DSM17004 T	paraf 1A	25/03/2014	12/03/2014	5	0,785	2	1,57	E	1-3
<i>Pseudomonas parafulva</i> DSM17004 T	paraf 1B	25/03/2014	12/03/2014	5	0,785	2	1,57	E	4-6
<i>Pseudomonas parafulva</i> DSM17004 T	paraf 2	25/03/2014	12/03/2014	8	1,451	1	1,451	E	7-9
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ATCC700383 T	pleco 1A	25/03/2014	12/03/2014	5	0,697	2	1,394	D	10-12
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ATCC700383 T	pleco 1B	25/03/2014	12/03/2014	5	0,697	2	1,394	E	10-12
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ATCC700383 T	pleco 2	25/03/2014	12/03/2014	8	1,505	1	1,505	D	13-15
<i>Pseudomonas putida</i> IAM 1235 T	PT 1	10/03/2014	06/03/2014	3	0,435	3	1,305	N	19-21
<i>Pseudomonas putida</i> IAM 1235 T	PT 2	10/03/2014	06/03/2014	5	0,875	3	2,625	N	22-24
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23483	ATCC 1	10/03/2014	07/03/2014	5	0,918	3	2,754	P	7-9
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23483	ATCC 2	10/03/2014	07/03/2014	7	1,351	3	4,053	P	10-12
<i>Pseudomonas putida</i> F1	F1-1	10/03/2014	07/03/2014	5	0,97	3	2,91	O	19-21
<i>Pseudomonas putida</i> F1	F1-2	10/03/2014	07/03/2014	7	1,306	3	3,918	O	22-24
<i>Pseudomonas putida</i> G7	PpG71A	25/03/2014	12/03/2014	5	0,65	2	1,3	C	1-3
<i>Pseudomonas putida</i> G7	PpG71B	25/03/2014	12/03/2014	5	0,65	2	1,3	C	7-9
<i>Pseudomonas putida</i> G7	PpG72	25/03/2014	12/03/2014	8	1,289	2	2,578	C	4-6

<i>Pseudomonas putida</i> GB1	GB1- 1	10/03/2014	07/03/2014	5	0,837	3	2,511	O	13-15
<i>Pseudomonas putida</i> GB1	GB1- 2	10/03/2014	07/03/2014	7	1,323	3	3,969	O	16-18
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT a	10/03/2014	26/02/2014	3	1,726	1	1,726	M	19-21
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT b	10/03/2014	26/02/2014	3	1,68	1	1,68	M	22-24
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-1	10/03/2014	27/02/2014	3	0,61	3	1,83	N	1-3
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-2	10/03/2014	27/02/2014	3	0,69	3	2,07	N	4-6
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-3	10/03/2014	27/02/2014	5	1,009	3	3,027	N	7-9
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-4	10/03/2014	27/02/2014	5	1,08	1,5	1,08	N	10-12
<i>Pseudomonas putida</i> S12	S/2 1	10/03/2014	06/03/2014	3	0,315	3	0,945	N	13-15
<i>Pseudomonas putida</i> S12	S/2 2	10/03/2014	06/03/2014	5	0,775	3	2,325	N	16-18
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM21245 T	P.t 1A	25/03/2014	12/03/2014	5	0,577	2	1,154	C	10-12
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM21245 T	P.t 1B	25/03/2014	12/03/2014	5	0,577	2	1,154	C	13-15
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM21245 T	P.t 2	25/03/2014	12/03/2014	8	1,178	1	1,178	C	16-18
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM16006 T	P. vreno 1A	25/03/2014	13/03/2014	2,5	0,64	2	1,28	E	22-24
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM16006 T	P. vreno 1B	25/03/2014	13/03/2014	2,5	0,64	2	1,28	F	1-3
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM16006 T	P. vreno 2	25/03/2014	13/03/2014	6	1,626	1	1,626	F	4-6

Taula 2. Mostra les dades rellevants de cada microorganisme usat en l'experiment i de les característiques que presentava cada mostra.

Com a resultat s'obté un perfil de proteïnes de cada soca i mostra. Cada un dels espectres va ser analitzat amb el Biotyper i va ser comparat amb la seva base de dades per que identifiqués cada espectre amb algun dels microorganismes presents.

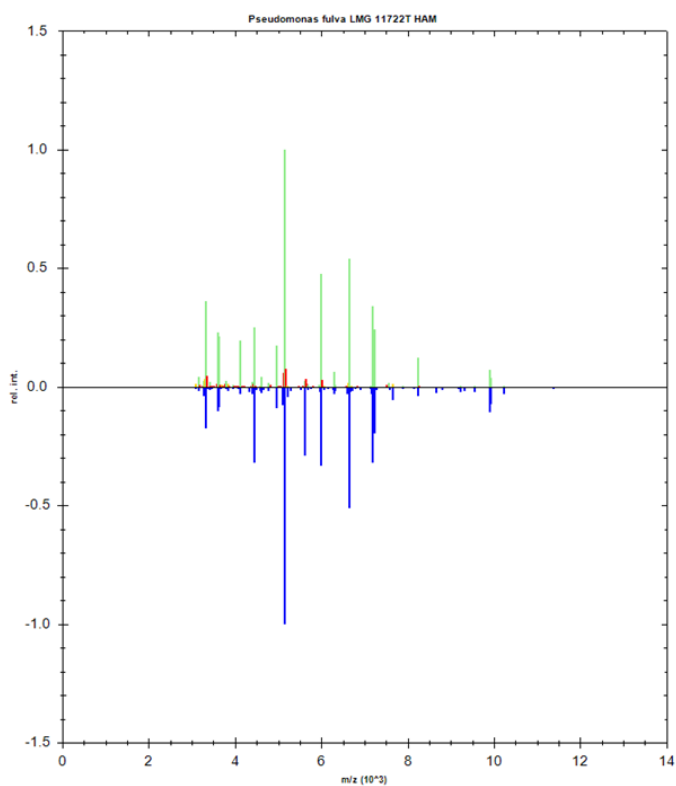


Figura 4. Resultats de l'espectre d'una de les soques de l'estudi (*P. fulva*) analitzats amb el Biotyper i comparat amb la soca més propera a la base de dades.

En els gràfics resultants es mostra la superposició dels dos espectres, tant de la mostra prova (adalt) com de la mostra més similar trobada a la base de dades del programa (abaix). També es representa en diferents colors (verd, groc i vermell) les diferents parts, segons el grau de similitud amb la soca trobada a la base de dades. El programa considera en la identificació el nombre de pics comuns entre la soca a identificar i les més pròximes de la base de dades, així com la intensitat dels pics; el valor màxim es de 3 quan els perfils són idèntics. La identificació es considera fiable a nivell d'espècie quan el valor és superior a 2. Els valors entre 1,7 i 2 indiquen que la identificació arriba exclusivament a nivell de gènere.

Posteriorment, es van recopilar els resultats de totes les soques en una taula. En ella es mostra el nom de la soca amb la seva etiqueta corresponent i el microorganisme identificat de la base de dades amb la que més similitud presenta i amb el color adequat segons el grau de similitud. A la taula, també es representa el valor de similitud de cada soca. Per a cada microorganisme es presenten 3 identificacions, que corresponen a les tres mesures que es varen realitzar de cada mostra.

Soca	Etiqueta	Identificació	Valor
<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> JCM16553	P. alky 1A	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> DSM 14020T HAM	1,781
		<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T HAM	1,781
		<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 2209T HAM	1,73
<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> JCM16553	P. alky 1B	<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 5011 HAM	1,797
		<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 5011 HAM	1,8
		<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 2209T HAM	1,787
<i>Pseudomonas alkylphenolia</i> JCM16553	P. alky 2	<i>Pseudomonas lutea</i> 21974T HAM	1,865
		<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T HAM	1,881
		<i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363T HAM	1,77
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM17059 T	P. cremo 1A	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	1,86
		<i>Pseudomonas putida</i> 039 W07 NFI	1,92
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,859
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM17059 T	P. cremo 1B	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	1,841
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,958
		<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,012
<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> DSM17059 T	P. cremo 2	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,693
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,735
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,823
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 T	P. ento 1A	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,8
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,919
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,826
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 T	P. ento 1B	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,62
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,755
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,843

<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 T	P. ento 2	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	1,865
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,905
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	1,952
<i>Pseudomonas</i> FBF18	F18 1	<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 5011 HAM	1,855
		<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 5011 HAM	1,694
		<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 5011 HAM	1,833
<i>Pseudomonas</i> FBF18	F18 2	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,821
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	1,941
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	1,959
<i>Pseudomonas fulva</i> IAM 1529 T	fulva 1A	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,431
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,362
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,436
<i>Pseudomonas fulva</i> IAM 1529 T	fulva 1B	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,414
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,307
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,409
<i>Pseudomonas fulva</i> IAM 1529 T	fulva 2	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,612
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,509
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	2,44
<i>Pseudomonas japonica</i> JCM21532 T	JT 1	<i>Pseudomonas sp</i> 057 Galv13 NFI	1,835
		<i>Pseudomonas sp</i> 057 Galv13 NFI	1,77
		<i>Pseudomonas sp</i> 057 Galv13 NFI	1,961
<i>Pseudomonas japonica</i> JCM21532 T	JT 2	Espectre no vàlid.	
		Espectre no vàlid.	
		Espectre no vàlid.	
<i>Pseudomonas monteilii</i> ATCC700476 T	MT 1	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,28
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,294
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,228
<i>Pseudomonas monteilii</i> ATCC700476 T	MT 2	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,353
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,497
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,508
<i>Pseudomonas mosselii</i> ATCC BAA-99 T	P. mosse 1A	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,363
		<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,292
		<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,297
<i>Pseudomonas mosselii</i> ATCC BAA-99 T	P. mosse 1B	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,203
		<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,329
		<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,267
<i>Pseudomonas mosselii</i> ATCC BAA-99 T	P. mosse 2	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,267
		<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,333
		<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T HAM	2,221
<i>Pseudomonas parafulva</i> DSM17004 T	paraf 1A	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,754
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,823

		<i>Pseudomonas marginalis</i> DSM 13124T HAM	1,716
<i>Pseudomonas parafulva</i> DSM17004 T	paraf 1B	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,848
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,859
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,769
<i>Pseudomonas parafulva</i> DSM17004 T	paraf 2	<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,884
		<i>Pseudomonas fulva</i> LMG 11722T HAM	1,989
		Espectre no vàlid.	
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ATCC700383 T	pleco 1A	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,184
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,166
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,118
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ATCC700383 T	pleco 1B	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,088
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,006
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,227
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ATCC700383 T	pleco 2	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,335
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,428
		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> DSM 15088T HAM	2,461
<i>Pseudomonas putida</i> IAM 1235 T	PT 1	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291T HAM	2,085
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,333
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,083
<i>Pseudomonas putida</i> IAM 1235 T	PT 2	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291T HAM	2,248
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,391
		<i>Pseudomonas putida</i> DSM 291T HAM	2,163
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23483	ATCC 1	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,249
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,19
		Espectre no vàlid.	
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23483	ATCC 2	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,06
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,015
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,041
<i>Pseudomonas putida</i> F1	F1-1	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,141
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,269
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,168
<i>Pseudomonas putida</i> F1	F1-2	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 THL	2,279
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,113
		<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 49128 THL	2,179
<i>Pseudomonas putida</i> G7	PpG71A	<i>Pseudomonas putida</i> B342T UFL	2,304
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,403
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,229
<i>Pseudomonas putida</i> G7	PpG71B	<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,323
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,427
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,236
<i>Pseudomonas putida</i> G7	PpG72	<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,272

		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,289
		<i>Pseudomonas putida</i> B401 UFL	2,387
<i>Pseudomonas putida</i> GB1	GB1- 1	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,166
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,969
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,139
<i>Pseudomonas putida</i> GB1	GB1- 2	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,136
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,181
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,187
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT a	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,25
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,205
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,256
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT b	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,195
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,203
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,154
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-1	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,148
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,052
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-2	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,133
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,15
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,104
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-3	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	2,047
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,903
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,639
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	KT 27-4	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,875
		<i>Pseudomonas koreensis</i> LMG 21318T HAM	1,644
		<i>Pseudomonas putida</i> DSM 50198 HAM	1,774
<i>Pseudomonas putida</i> S12	S/2 1	<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,816
		<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,711
		<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,711
<i>Pseudomonas putida</i> S12	S/2 2	<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,799
		<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,544
		<i>Pseudomonas abietaniphila</i> CIP 106708 T HAM	1,565
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM21245 T	P.t 1A	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,773
		<i>Pseudomonas masselii</i> CIP 105259T HAM	1,867
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,794
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM21245 T	P.t 1B	<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,884
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,961
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,863
<i>Pseudomonas taiwanensis</i> DSM21245 T	P.t 2	<i>Pseudomonas masselii</i> CIP 105259T HAM	1,961
		<i>Pseudomonas masselii</i> CIP 105259T HAM	1,898
		<i>Pseudomonas monteilii</i> DSM 14164T HAM	1,851

<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM16006 T	P. vreno 1A	Espectre no vàlid.	
		Espectre no vàlid.	
		Espectre no vàlid.	
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM16006 T	P. vreno 1B	<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 2209T HAM	1,764
		<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,81
		<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i> LMG 5011 HAM	1,817
<i>Pseudomonas vranovensis</i> DSM16006 T	P. vreno 2	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> DSM 14164T HAM	1,773
		<i>Pseudomonas viridiflava</i> DSM 11124T HAM	1,645
		Espectre no vàlid.	

Taula 3. Identificació totes les soques analitzades indicant el microorganisme amb el qual ha estat associat a la base de dades del Biotyper, segons la similitud del seu espectre. Si aquest valor és igual o major a 2, la identificació és possible a nivell de gènere i espècie i es representarà amb un color verd, entre 1,7 i 1,9 la identificació és només a nivell de gènere i és representada per un color groc, i si es menor de 1,7 no dona cap identificació segura i es representa amb un color vermell.

Dendrogrames i associacions proteiques.

Amb el mateix programa utilitzat per a la identificació dels microorganismes (Biotyper) es van dissenyar una sèrie de dendrogrames on es representen les associacions dels perfils proteics de les diferents soques. El programa compara les similituds i les distàncies entre els perfils i dona com a resultat una representació gràfica.



Figura 5. Dendrograma corresponent a la representació dels agrupaments i distàncies de les soques estudiades i les soques del complex *P. putida* presents a la base de dades del programa Biotyper.

Discussió i conclusions.

Influència de les fases de creixement.

El primer de tot que s'ha de tenir en compte és que totes les corbes de creixement realitzades a les 10 soques diferents, presenten uns resultats gairebé idèntics. Es pot observar com les corbes creixen fins a les 4-5 hores del cultiu, etapa que correspon a la fase exponencial del creixement. Per altre banda, a partir de les 5-6 hores, els microorganismes entren a la fase estacionària i no augmenta el nombre de cèl·lules. Les soques es troben a la fase exponencial de creixement fins a una absorbància propera a 1. Les cèl·lules de la fase estacionària de creixement presenten uns perfils proteics diferents al de les cèl·lules de la fase exponencial. Aquest va ser el punt on es varen recollir les cèl·lules per experiments posteriors i per la identificació a la base de dades Biotyper.

Una altre evidència de diferències entre les fases de creixement dels microorganismes i l'agrupament final és la dels resultats de la soca *P. putida* KT2440. Es pot observar com existeix una distància molt significativa entre les mostres preses a una mateixa hora i les preses a una fase de creixement diferent.

A la majoria d'agrupaments s'observa que les mostres corresponents al mateix microorganisme es presenten properes, no obstant, dins aquestes, la mostra 2, que fa referència a la mostra presa a la fase estacionària, sempre està més separada que la resta de les mostres, com es pot observar clarament en el cas de la soca KT2440. A més d'això, també es pot observar com hi ha un grup de quatre microorganismes (*P. putida* F1, *P. monteilii* ATCC700476 T, *P. putida* GB1, *P. putida* ATCC 23483) que no segueixen el patró i que es troben més properes entre elles, que no entre les mostres del seu mateix microorganismes preses a diferent fase. Aquests microorganismes formen dos grups diferents, un format per les seves mostres agafades a les 5 hores, corresponents a la fase exponencial, i un altre grup de les mostres de les 7 hores, corresponent a la fase logarítmica. El mateix passa amb *Pseudomonas* FBF18 i *P. putida* S12, que s'agrupen segons el temps de creixement del cultiu, i no segons l'espècie.

Una altre evidència de diferències entre les fases de creixement dels microorganismes i l'agrupament final és la dels resultats de la soca *P. putida* KT2440. Es pot observar com existeix una distància molt significativa entre les mostres preses a una mateixa hora i les preses a una fase de creixement diferent.

Identificació dels microorganismes per espectrometria de masses.

En la Taula 3, es mostren totes les identificacions resultants de comparar els espectres d'absorció dels nostres microorganismes amb els de la base de dades del programa Biotyper. En primer lloc, s'ha de tenir en compte que aquest programa té una finalitat clínica, pel que la seva base de dades sols presentarà les espècies d'interès clínic. Dins del complex *P. putida*, la base de dades sols presenta 5 espècies: *P. plecoglossicida*, *P. fulva*, *P. putida*, *P. moselii* i *P. monteilii*.

A la taula 3 es pot observar com les úniques espècies del nostre estudi que presenten un valor superior a 2 en les tres mesures, i per tant, que presenten una bona identificació a nivell de gènere i espècies, són precisament les que coincideixen amb les 5 espècies presents a la base de dades. De les 19 soques estudiades, només aquestes 10 varen donar una correcta identificació: *P. putida* IAM 1235 T, *P. putida* KT2440 , *P. putida* GB1, *P. putida* F1, *P. monteilii* ATCC700476 T, *P. putida* ATCC 23483, *P. putida* G7, *P. fulva* IAM 1529 T, *P. plecoglossicida* ATCC700383 T i *P. mosselii* ATCC BAA-99 T. Totes elles les relaciona correctament amb el seu gènere i espècies, excepte algunes *P. putida* que les identifica com a *P. monteilii*. Aquestes confusions que realitza el programa entre *P. putida* i *P. monteilii* ens poden indicar que presenten uns espectres molt semblants i gairebé idèntics, que dona lloc a l'error de la identificació. Aquestes dues espècies són filogenèticament molt properes i aparentment el Biotyper no les distingeix.

Referent a les altres 9 soques que no es troben a la base de dades, gairebé totes presenten un valor entre 1,7 i 1,9 i, per tant, una identificació a nivell de gènere *Pseudomonas*. També es pot observar com la major part d'aquestes soques, són relacionades amb alguna de les 5 espècies del complex *P. putida*. Inclús, algunes d'elles, com *P. cremoricolorata* DSM17059 T, presenten una identificació amb un valor superior a 2 amb *P. mosselii* CIP 105259T HAM, cosa que certifica la gran relació entre totes les soques del complex *P. putida*. A partir d'aquí, podem concloure, que si la base de dades presentés totes les espècies, aquestes s'identificarien amb un valor superior a 2.

S'ha de destacar que algunes de les soques tipus, com *P. japonica* JCM21532 T o *P. vranovensis* DSM16006 T, no estan a la base de dades del Biotyper i per tant, només les identifica a nivell de gènere.

Associacions proteiques.

En la Figura 5 es representa el dendrograma obtingut incloent les soques de la base de dades. S'observa com hi ha un primer grup més diferenciat de la resta, on hi ha 5 de les soques que no es troben en la base de dades. En segon lloc, s'observa una gran agrupació de soques corresponents a la majoria de soques de la base de dades. I, finalment, el darrer grup, que és el més gran, es troben les soques del nostre estudi que si que estan presents en la base de dades, juntament amb alguna mesclada de la base de dades, i també algunes de les no presents en la base de dades. Aquests agrupaments es poden explicar, perquè les condicions de cultiu no són les mateixes recomanades per el programa. Es va fer així per tal de construir una base de dades pròpia més endavant.

També es pot observar com en el grup de les soques de la base de dades, es presenten mesclades les espècies *P. putida* i *P. monteilii*. Això ens indicaria que els seus espectres són molts semblants, i ens corroboraria el comentat anteriorment, que ens duia a l'error d'identificació i la confusió del programa per aquestes dues espècies.

Un dels resultats que crida l'atenció, és el de les soques *P. cremoricolorata* DSM17059 T i *P. entomophila* L48 T. Es pot observar com es mesclen els resultats d'aquestes dues soques i s'intercanvien les mostres 2 de cada microorganisme a l'hora d'agrupar-los. Aquests resultats, segurament hagin estat degut a un error d'etiquetatge de les mostres, i que realment la mostra de *P. entomophila* L48 T sigui la de *P. cremoricolorata* DSM17059 T i al revés. Es comprovarà en experiments posteriors.

Conclusions.

Com a conclusió general, podem dir que la tècnica de espectrometria de masses MALDI-TOF pot ser utilitzada per l' identificació de soques de *Pseudomonas* sempre que les cèl·lules estiguin recollides a la mateixa fase de creixement i la base de dades inclogui totes les espècies reconegudes dins del gènere. En aquestes condicions, el espectres obtinguts es poden representar molt bé en dendrogrames, encara que soques de espècies filogenèticament molt properes es puguin confondre. Les dues soques filogenèticament pròximes constitueixen molt probablement una espècie nova dins del gènere *Pseudomonas*, ja que els seus espectres apareixen en la mateixa branca del dendrograma i els seus valors a la identificació és inferior a 2 respecte a les demes espècies.

Agraïments.

Donar les gràcies a totes les persones que amb la seva ajuda han fet possible l'estudi. Especialment a Rosa Gomila dels Serveis Científic-Tècnics, Claudia Prince, Antoni Busquets i Magda Mulet de l'àrea de Microbiologia.

Referències bibliogràfiques.

Arnold, R.J., et J.P. Reilly. 1998. *Fingerprint matching of E. coli strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 12(10):630-6.

Dabboussi, F., Hamze, M., Singer, E., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., Izard, D., 2002. *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 363e376.

Dworkin, W. Harder, & K.-H. Schleifer (Ed.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York, NY. 3:3104–3131.

Elomari, M., Colorel, L., Verhille, S., Izard, D. & Leclerc, H. 1997. *Pseudomonas monteilii* sp. nov., isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 846-852.

- Loonen, A.J.M., Jansz, A.R., Stalpers, J., Wolffs, P.F.G., van den Brule, A.J.C. 2011. *An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.
- Manji, R., Bythrow, M. & Branda, J.J. 2014. *Multi-center evaluation of the VITEK® MS system for mass spectrometric identification of non-Enterobacteriaceae Gram-negative bacilli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2014) 33:337–346.
- Migula, W. 1900. *System der Bakterien. Handbuck der Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik der Bakterien*, vol. 2, Verlag von Gustav Fischer, Jena, pp. 875–954.
- Moore, E., Mihaylova, S., Vandamme, P., Krichevsky, M. & Dijkshoorn, L. 2010. *Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons*. Research in Microbiology 161 (2010) 430e438.
- Moore, E., Tindall, B., Dos Santos, V., Pieper, D., Ramos, J. & Palleroni, N. 2006. *Nonmedical: Pseudomonas*. Prokaryotes (2006) 6:646–703.
- Mulet, M., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E. 2010. *DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species*. Environmental microbiology.
- Mulet, M., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E. 2013. *Phylogenetic affiliation of Pseudomonas putida biovar A and B strains*. Research in Microbiology 164 351e359
- Mulet, M., Gomila, M., Lemaitre, B., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E. 2012. *Taxonomic characterization of Pseudomonas strain L48 and formal proposal of Pseudomonas entomophila sp. nov.* Syst. Appl. Microbiol. 35, 145–149.
- Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sanchez, D., Lalucat, J., & García-Valdes, E. 2012. *Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus Pseudomonas*. nov. Syst. Appl. Microbiol 35 (2012) 455– 464.
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. & Wakabayashi, H. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, Plecoglossus altivelis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 83-89.
- Palleroni, N. J. 1992. *Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads*. In: E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (Eds.) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, DC. 105–115.
- Palleroni, N.J. 2005. *Pseudomonas*. In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part B, The Gammaproteobacteria*, second ed. Springer, New York, pp. 323e379.

- Perz, J.F., Craig, A.S., Stratton, C.W., Bodner, S.J., Phillips Jr., W.E., Schaffner, W., 2005. *Pseudomonas putida* septicemia in a special care nursery due to contaminated flush solutions prepared in a hospital pharmacy. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5316e5318.
- Schroth, M., D. C. Hildebrand, and N. Panopoulos. 1992. *Phytopathogenic pseudomonads and plant-associated pseudomonads*. In: A. Balows, H G. Trüper, M.
- Scotta, C., Gomila, M., Mulet, M., Lalucat, J. & García-Valdés, E. 2013. Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry and Multilocus Sequence Analysis in the Discrimination of *Pseudomonas stutzeri* Populations: Three Novel Genomovars. *Microb Ecol.* DOI 10.1007/s00248-013-0246-8.
- Skerman, V., McGowan, V. & Sneath, P. 1980. *Approved Lists of Bacterial Names*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 225-420
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M., 1966. *The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study*. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159e271.
- Timmis, K.N., 2002. *Pseudomonas putida: a cosmopolitan opportunist per excellence*. *Environ. Microbiol.* 4, 779e781.
- Tindall, B.J., Rossello-Mora, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., Kämpfer, P., 2010. *Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 249e266.
- Uchino, M., Shida, o., Uchimura, T. & Komagata, K. 2001. Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47, 247-261.
- Welker, M., Moore, E.R.B. (2011) *Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology*. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 2–11.