

ARTÍCULO ORIGINAL

Papel biológico de genes ubicados en una isla genómica en *Pseudomonas aeruginosa*

Mireia Tena-Garitaonaindia¹, Manuel Rubio-Gómez², Diego Ceacero Heras¹, Olga Martínez-Augustin¹ y Abdelali Daddaoua*¹.

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

²Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

*Email autor correspondiente: daddaoua@ugr.es

Recibido: 16 enero 2020. **Aceptado:** 28 febrero 2020

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno humano oportunista Gram negativo omnipresente que no se considera parte de la microbiota intestinal comensal humana. Sin embargo, el agotamiento de la microbiota intestinal (disbiosis) después del tratamiento con antibióticos facilita la colonización del tracto intestinal por *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos. Una posible alternativa a los tratamientos convencionales se basa en el uso de alimentos funcionales con actividad prebiótica. El efecto bifidogénico de fructooligosacáridos (FOS) está bien establecido, se ha demostrado que promueve el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas específicas como las bifidobacterias. Estudios previos del patógeno oportunista nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 han demostrado que los FOS reducen el crecimiento y la formación de biopelículas, debido a una disminución en la motilidad y la secreción de exotoxina. Sin embargo, la base transcripcional de estas alteraciones fenotípicas sigue sin estar clara. Para abordar esta pregunta, se realizó un análisis de secuencia de ARN (RNAseq) que nos permitió detectar la presencia de una isla genómica formada por 15 genes que fueron reprimidos en presencia de FOS. Anteriormente, se demostró mediante el análisis funcional de mutantes isogénicos, que los genes PA0643, PA0644 y PA0646, ubicados en esta isla genómica, codifican proteínas involucradas en el crecimiento, la formación de biopelículas, la motilidad. En este contexto, este trabajo plasma la implicación de estos genes en la modulación de la respuesta inflamatoria.

Palabras clave: Motilidad, biopelículas, virulencia, citocinas, respuesta inflamatoria e isla genómica.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an omnipresent Gram negative opportunistic human pathogen that is not considered part of the human commensal intestinal microbiota. However, depletion of the intestinal microbiota (dysbiosis) after antibiotic treatment facilitates colonization of the intestinal tract by multiple drug *P. aeruginosa* resistant. A possible alternative to conventional treatments is based on the use of functional foods with prebiotic activity. The bifidogenic effect of fructooligosaccharides (FOS) is well established; it has been shown to promote the growth of specific beneficial intestinal bacteria such as bifidobacteria. Previous studies of the nosocomial opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 have shown that FOS reduce the growth and formation of biofilms, due to a decrease in motility and exotoxin secretion. However, the transcriptional basis of these phenotypic alterations remains unclear. To address this question, an RNA sequence analysis (RNAseq) was performed that allowed us to detect the presence of a genomic island formed by 15 genes which are repressed in the presence of FOS. Previously, it was demonstrated by the functional analysis of isogenic mutants, that the genes PA0643, PA0644 and PA0646, located in this genomic island, encode proteins involved in growth, biofilm formation, motility. In this context, this work reflected the implication of these genes in the modulation of the inflammatory response.

Keywords: Motility, biofilms, virulence, cytokines, inflammatory response and genetic island.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución, los microorganismos han ido desarrollando y perfeccionando estrategias para garantizar su supervivencia y conseguir una mejor adaptación a distintas condiciones medioambientales, incluyendo la temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes, la presencia de sustancias antibacterianas (antibióticos, péptidos antibacterianos, etc.) o la presencia de contaminantes, entre otros. Así, las bacterias han desarrollado múltiples sistemas

de adaptación que les permiten detectar las señales extracelulares, transducir estas señales y, en consecuencia, desencadenar una serie de respuestas celulares entre las que se incluyen la modulación de la expresión génica, la formación de biopelículas, la virulencia, la motilidad y modificaciones en su metabolismo. En este sentido *P. aeruginosa*, de naturaleza ubicua, no es una excepción y ha desarrollado mecanismos, basados en una importante flexibilidad genética, que le permiten adaptarse al medio ambiente y que contribuyen a su alta

infectividad y resistencia al tratamiento [24].

El patógeno humano *Pseudomonas aeruginosa* causa una amplia gama de infecciones agudas y crónicas potencialmente mortales, particularmente en pacientes inmunodeprimidos, con cáncer, con quemaduras y con fibrosis quística [10]. Además, bajo un tratamiento antibiótico continuo, la integridad de la microbiota intestinal se ve comprometida y conlleva el agotamiento de la microbiota intestinal (disbiosis), por lo tanto, la resistencia a la colonización fisiológica que posteriormente facilita el establecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el ecosistema intestinal [25]. La gravedad y la permanencia de estas infecciones están relacionadas con la capacidad de resistencia de *P. aeruginosa* al efecto de los antibióticos mediante diferentes sistemas como la formación de biopelículas [8, 14], la motilidad, quórum sensing, quimiotaxis y los sistemas de secreción de factores virulentos como la exotoxina A [21] que bloquean la síntesis de proteínas que conduce a la muerte celular [7]. De hecho, en las últimas tres décadas, la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa* se ha intensificado a nivel mundial, a través de la diseminación global de varios clones epidémicos resistentes a múltiples fármacos [17], por lo tanto, representan una grave amenaza para la salud humana en todo el

mundo. Además, la Organización Mundial de la Salud ha declarado a esta bacteria como el segundo patógeno prioritario para la investigación y el desarrollo de nuevas estrategias para combatirla (OMS, 2017).

Una posible alternativa a los tratamientos convencionales se basa en el uso de alimentos funcionales con actividad prebiótica, que son alimentos no digeribles (en su mayoría oligosacáridos) que estimulan selectivamente el crecimiento de un número limitado de bacterias del colon amigables con el huésped [6]. Estas acciones adicionales de los prebióticos tienden a mejorar la capacidad de la mucosa para contener microorganismos lumbales y sus componentes, es decir, la función de barrera intestinal (IBF, por sus siglas en inglés). Normalmente, el paso de microorganismos y / o sus componentes como LPS a la mucosa y de allí al torrente sanguíneo (translocación) es mínimo, y el sistema inmune desarrolla tolerancia a la microbiota, sin inflamación. Por el contrario, cuando la IBF se ve comprometida, se produce la translocación, y según la naturaleza de la disfunción y el contexto fisiológico / patológico. Por lo tanto, se considera que la inflamación del intestino proviene de la translocación aumentada que compromete el sistema inmunitario adaptativo, lo que finalmente resulta en una inflamación no controlada. Por lo tanto, el refuerzo de la IBF

puede ser protector y se considera terapéutico en este contexto [5;19]. Se ha encontrado que un número significativo de compuestos naturales inhiben el crecimiento bacteriano, aunque sus mecanismos de acción permanecen poco claros [1]. Los fructooligosacáridos (FOS) son oligosacáridos de cadena corta que se generan por hidrólisis de la inulina de polisacárido, que está compuesta de 2 a 60 monómeros de fructosa. Anteriormente, hemos descrito que FOS inhibió el crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 [20]. Además, ambos compuestos causaron efectos opuestos sobre la motilidad bacteriana; mientras que FOS inhibió la motilidad, se observó un aumento de la motilidad en presencia de inulina. Además, en co-cultivos con células eucariotas (macrófagos) FOS, y en menor medida inulina, redujo la secreción de las citocinas inflamatorias IL-6, IL-10 y TNF- α . También pudimos demostrar que la reducción en la secreción de citocinas se debe a una modulación mediada por FOS de la vía de transducción de señales NF- κ B [20]. Sin embargo, la base transcripcional de estas alteraciones fenotípicas sigue sin estar clara. Para abordar esta pregunta, realizamos un análisis de RNAseq [15]. Los resultados publicados recientemente en Manuel Rubio-Gómez et al., 2020 [15]. demostraron una reducción de la expresión de diferentes genes

mediada por FOS, especialmente los niveles de transcripción de genes que participan en varias vías involucradas en el metabolismo y el crecimiento, la motilidad, la formación de biopelículas, la resistencia a los β -lactámicos y en la modulación de los sistemas de secreción del tipo III y VI [15]. Sorprendentemente, nuestro análisis de secuencia RNAseq, indican la presencia de una isla genómica de 17 kb que comprende 15 genes, que se habían insertado en el extremo 3' del gen PA0639 (Figura 1), que codifican proteínas no caracterizadas y que fueron totalmente reprimidas en presencia de FOS [15].

Demostramos, mediante el análisis funcional de los mutantes isogénicos, que los genes PA0643, PA0644 y PA0646 ubicados en la isla génica, codifican proteínas involucradas en el crecimiento, la formación de biopelículas, la motilidad [15] y, en este trabajo, en la modulación de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, podemos sugerir que estos genes están implicados en algún proceso fisiológico que reduce la patogenicidad de *P. aeruginosa*.

METODOLOGÍA

Cultivo y condiciones de crecimiento

Pseudomonas aeruginosa PAO1 se cultivó durante la noche a 37 °C en medio LB con agitación a 200 rpm. Cuando se requirió, se añadieron antibióticos al medio de cultivo para

alcanzar una concentración final de 50 µg/mL de ampicilina (Ap) o 25 µg/mL de gentamicina (Gm).

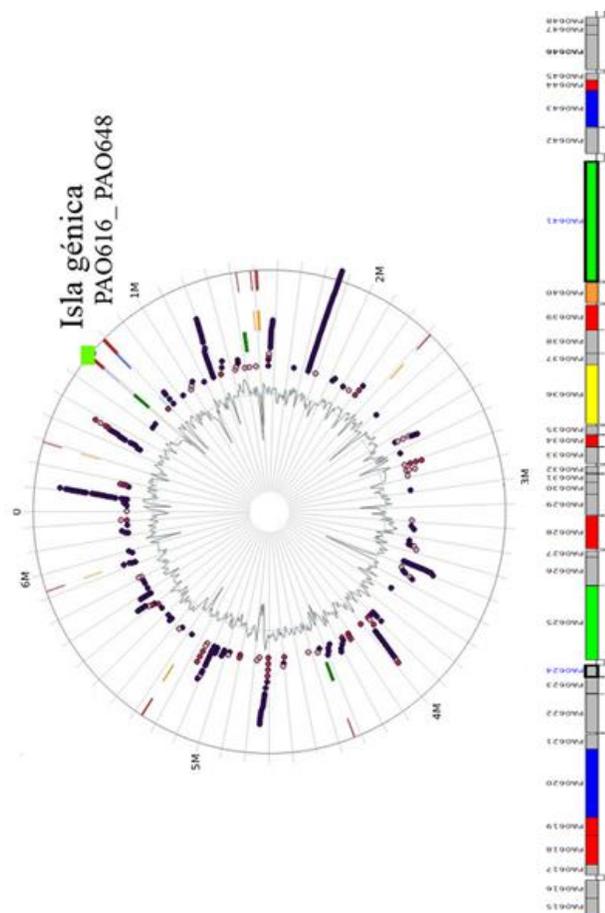


Figura 1. Ubicación de la isla genómica en el genoma PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*. La isla está compuesta por genes ampliamente reprimidos por la presencia de FOS y las mayorías definidos como proteínas hipotéticas. La figura se realizó utilizando el programa IslandViewer4. (Información tomada de Rubio-Gómez et al., 2020 [15]).

Generación de mutantes en genes ubicados en la isla genómica

Para generar los mutantes PA0643::Gm, PA0644::Gm y PA0646::Gm, se amplificó mediante PCR y a partir de ADN genómico de

P. aeruginosa PA01 fragmentos de ADN del tamaño de 656 pb, 241 pb y 636 pb, que cubren respectivamente la parte central de los genes mencionados anteriormente. Los productos resultantes se clonaron en el plásmido pMBL para producir los plásmidos pMBL::PA0643, pMBL::PA0644 y pMBL::PA0646. Posteriormente, los plásmidos resultantes se digirieron con BamHI para incorporar el gen de resistencia a Gm, obtenido desde el plásmido pCHESI digerido con la misma enzima, produciendo pMBL::PA0643ΩGm, pMBL::PA0644ΩGm y pMBL::PA0646ΩGm. Finalmente, los plásmidos fueron introducidos, de manera individual en *P. aeruginosa* PA01 por electroporación para la recombinación homóloga. Las cepas mutantes se seleccionaron en placas suplementada con Gm y se confirmaron mediante Southern-blot [18;22].

Determinación semicuantitativa de la formación de biopelícula

La determinación semicuantitativa de la formación de biopelícula se realizó como ha sido descrito en trabajos anteriores [3]. Los experimentos se realizaron en tubos de ensayos con medio M9 suplementado con 0,2% (p/v) de glucosa y casaminoácidos. La formación de biopelícula se cuantificó después de 6 h utilizando el método de cristal violeta (CV) [3].

Ensayos de motilidad

Se llevaron a cabo ensayos para determinar el

efecto de la delección de los genes PA0643, PA0644 y PA0646 en las diferentes formas de motilidad que caracterizan *P. aeruginosa*. Para los ensayos de natación (Swimming en inglés), las bacterias se colocaron en el centro de las placas con una capa de 5 mm de medio LB agar al 0,3% (p / v), 0,2% de casaminoácidos (p/ v) y 30 mM de glucosa. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se inspeccionó la difusión radial de las bacterias. Para controlar la motilidad de las sacudidas (Twitching en inglés), se colocaron bacterias en un punto de una capa de 2 mm de espesor que contenía 1,5% (p/v) de agar Bacto, 0,2% (p/v) de casaminoácidos y glucosa 30 mM. Después de la incubación a 37 °C durante 24 h, se midió y se representó la expansión de bacterias en la placa. Para los ensayos de enjambre (Swarming en inglés), se colocaron 5 µl de un cultivo nocturno de bacterias en el centro de las placas formadas por LB agar al 0,5% (p/v) suplementado con 0,2% (p/v) de casaminoácidos y glucosa 30 mM. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h, y se determinó el movimiento de la bacteria en la superficie.

Aislamiento y cultivo de macrófagos

Para ello, se sacrificaron ratas Wistar, por dislocación cervical, para la extracción del bazo asépticamente. Las suspensiones celulares del bazo se centrifugaron a 15000 rpm durante 5

min y las células se eliminaron de los eritrocitos mediante resuspensión en tampón de lisis (NH₄Cl 15 mM, KHCO₃ 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,3) durante 30 min en hielo. Los macrófagos se aislaron siguiendo el protocolo del Kit “Macrophage Isolation Kit (Peritoneum)” de la empresa MiltenyiBiotec y se resuspendieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM Sigma) suplementado con FBS al 10% (sigma), 2,5 mg/L de anfotericina B y L-glutamina 2 mM.

Medición de citosinas secretadas por macrófagos infectados por *P. aeruginosa* PAO1

Para la determinación de los niveles de citocinas, las suspensiones de macrófagos (10⁶ células/ml de medio DMEM) se cultivaron conjuntamente con *Pseudomonas aeruginosa* silvestre y mutantes en los genes PA0643, PA0644 y PA0646 durante 6 horas. Después de centrifugar a 10000 rpm a 4 °C y durante 5 min, los sobrenadantes resultantes se congelaron a -80 °C. Se descongelaron alícuotas y se determinaron los niveles de citocinas usando un kit basado en la técnica de ELISA (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

RESULTADOS

Identificación de islas genómicas ampliamente reprimidas por el tratamiento

con FOS en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Realizamos un estudio de RNAseq para entender la respuesta celular de *P. aeruginosa* PAO1 al tratamiento con FOS a una concentración final de 20 mg/mL [15] y los datos obtenidos por análisis transcriptómico de secuencia del RNAm indican la presencia de una isla genómica en PAO1 de ~17 kb que comprende 15 genes que se habían insertado en el extremo 3' del gen PA0639 (Figura 1) a través de una piocina R2/F2 codificada por fago [2]. La mayoría de sus genes fueron claramente reprimidos en presencia de FOS [15]. Desafortunadamente, la mayoría de estos genes codifican proteínas de funciones desconocidas. Por lo tanto, para determinar el papel biológico de esta isla genómica, se construyeron varios mutantes isogénicos y se sometieron a un análisis fenotípico que investiga los cambios en el crecimiento, la formación de biopelículas y la motilidad. Para llevar a cabo este objetivo nos basamos sobre los resultados publicados en Manuel Rubio-Gómez et al., 2020 [15] que han demostrado, especialmente, que los genes PA0643, PA0644 y PA0646 de esta isla genómica codifican proteínas involucradas en el crecimiento (Figura 2A), la formación de biopelículas (Figure 2B) y la motilidad (Figura 2C). Por lo tanto, investigamos el efecto de estos mutantes sobre la respuesta inflamatoria.

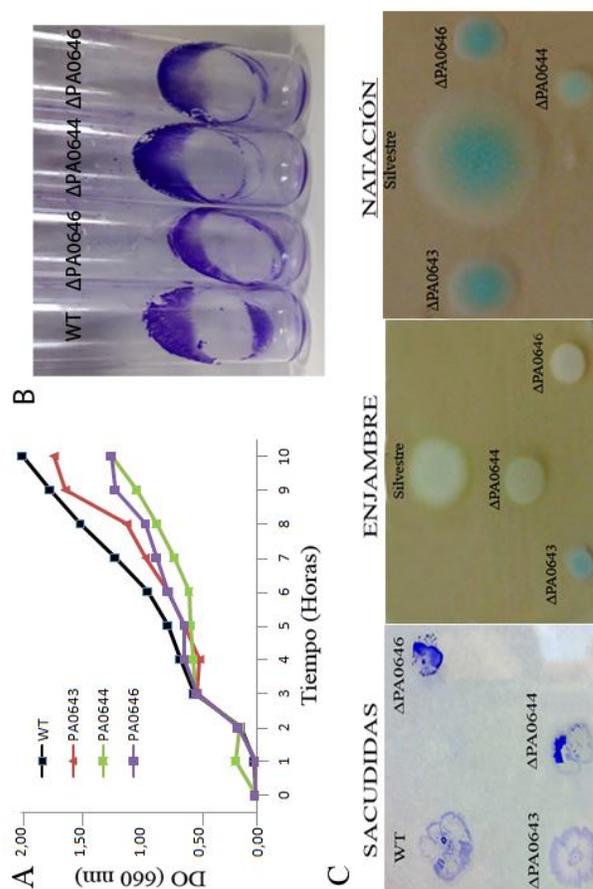


Figura 2. A) Efecto de los mutantes en los genes PA0643, PA0644 y PA0646 sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1. Se muestran los resultados de los experimentos de crecimiento que se realizaron a 37 °C durante 24 horas. B) Efecto de los mutantes en los genes PA0643, PA0644 y PA0646 sobre la formación de biopelículas por *P. aeruginosa* PAO1. La formación de biopelículas se llevó a cabo en el medio LB y después de 2, 4 y 6 h se cuantificó la cantidad de bacterias que formaban la biopelícula mediante tención con cristal de violeta a 590 nm. Arriba se demuestran los tubos de ensayos a las 6 horas. C) Efecto de los mutantes en los genes PA0643, PA0644 y PA0646 sobre la motilidad de *P. aeruginosa* PAO1. Los ensayos de motilidad se llevaron a cabo en el medio LB suplementado con agar, casaminoácidos al 0,2% (p/v) y glucosa 30 mM a 37 °C y durante 24 h (Información tomada de Rubio-Gómez et al., 2020 [15]).

Se ha descrito que la lesión o infección del tejido estimula el reclutamiento y activación de las células inmunes del huésped, entre los

cuales los macrófagos son las primeras células inmunes que responden para internalizar y matar patógenos bacterianos durante una infección. La activación de los macrófagos se basa en gran medida en el reconocimiento de los patógenos por los receptores Toll-like (TLR), como TLR4 [9] que juegan un papel clave en la detección de *P. aeruginosa* que es de primordial importancia [13]. Esto a su vez provoca cambios significativos en la expresión génica y la secreción de citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α que reclutan células inflamatorias en respuesta a factores de virulencia bacteriana. Por lo tanto, estas citocinas se encuentran entre los principales mediadores de señalización liberados por macrófagos. En este contexto, hemos incubado macrófagos en presencia de *P. aeruginosa* PAO1 cepa silvestre o mutantes en los genes PA0643, PA0644 y PA0646 ubicados en la isla genómica y hemos evaluado los niveles de secreción de IL-6 y TNF- α después de 6 horas (Figura 3). Los resultados obtenidos (Figura 3) indican un aumento significativo en TNF- α y IL-6 en comparación con los macrófagos infectados por la cepa silvestre.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los prebióticos ejercen efectos beneficiosos sobre la salud humana al alterar la microbiota intestinal y también al inhibir la progresión de algunas cepas

patógenas [12], debido a un efecto indirecto causado por el crecimiento selectivo de bacterias amigables con el huésped. Hasta donde sabemos, se han descrito propiedades antimicrobianas para varios oligosacáridos [4] y en un estudio anterior, se demostró que el FOS como prebiótico tiene efectos específicos sobre *P. aeruginosa*, ya que reduce el crecimiento, limita la formación de biopelículas, motilidad alterada y reducción de la respuesta inflamatoria [20]. Recientemente, Manuel Rubio-Gómez et al., 2020 [15] demostraron que FOS induce una serie de cambios importantes en los niveles de transcripción de *P. aeruginosa*, algunos de los cuales están relacionados con la supervivencia bacteriana y permiten obtener una visión inicial de los mecanismos moleculares correspondientes. Sorprendentemente, los datos obtenidos por análisis de RNAseq [15] indican la presencia de una isla genómica en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 de 17 kb que comprende 15 genes que se habían insertado en el extremo 3' del gen PA0639 (Figura 1) que codifican proteínas no caracterizadas y que fueron totalmente reprimidas en presencia de FOS [15]. Debido a su relevancia para la salud humana, se han realizado grandes esfuerzos para estudiar las islas genómicas, que son grandes elementos genéticos adquiridos por transmisión horizontal [11;16;23]. En este

contexto, planteamos estudiar a fondo la implicación de estos genes en los procesos de virulencia de *P. aeruginosa*.

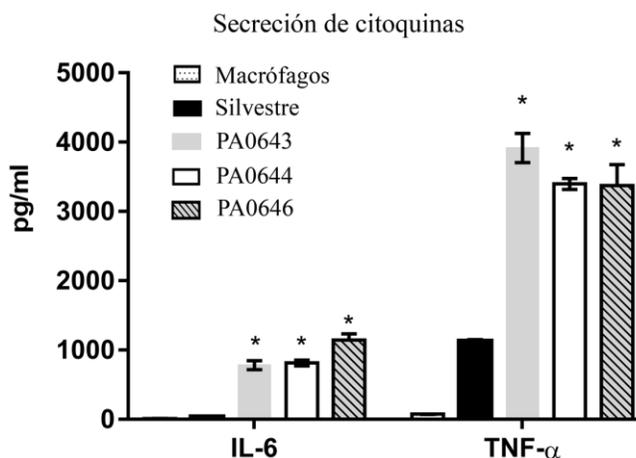


Figura 3. Efecto de los mutantes en los genes PA0643, PA0644 y PA0646 ubicados en la isla génica sobre la respuesta inflamatoria de los macrófagos. Los macrófagos se incubaron con *P. aeruginosa* de tipo silvestre y mutante durante 6h antes de la determinación de los niveles de citoquinas (IL-6 y TF- α) usando un kit basado en la técnica de ELISA (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

Datos publicados determinaron, después de realizar varios mutantes, que la delección de los genes PA0643, PA0644 y PA0646 ubicados en la isla génica causó alteraciones en el crecimiento bacteriano (Figura 1A), la formación de biopelículas (Figura 1B) y la motilidad (Figura 1C) [15]. Presumimos que estos efectos pueden alterar la virulencia de *P. aeruginosa*.

En este trabajo, para probar esta hipótesis, infectamos macrófagos de rata con la cepa silvestre y los mutantes de *P. aeruginosa* y medimos la liberación de las citoquinas IL-6 y

TNF- α . Destacamos que estas citoquinas son producidas por macrófagos activados como respuesta a reacciones inflamatorias en el proceso de infección bacteriana. Sorprendentemente, los resultados obtenidos indican que los macrófagos muestran una liberación mejorada de citoquinas en respuesta a la infección por los mutantes en comparación con los macrófagos infectados por la cepa silvestre (Figura 3), que suponemos que dependía de la activación de NF- κ B, enfatizando el efecto más virulento de los mutantes en los macrófagos.

Dado que no se redujo la liberación de citoquinas en presencia de los mutantes en los genes PA0643, PA0644 y PA0646, nuestros resultados sugieren que estos genes codifican para proteínas que están implicadas en la modulación de la respuesta inflamatoria de los macrófagos a la infección con *P. aeruginosa* actuando sobre algún proceso fisiológico que reduce la patogenicidad por esta bacteria.

CONCLUSIÓN

Los suplementos que contienen FOS se utilizan actualmente para prevenir infecciones gastrointestinales [26], lo que sugiere que podría ser una estrategia válida para combatir la infección por *Pseudomonas* mediante la posible inclusión de FOS en cócteles antimicrobianos. Además, el presente estudio indica que los genes PA0643, PA0644 y PA0646 de la isla

génica están implicados en diferentes procesos relacionados con la virulencia y que la alteración de sus niveles de transcripción es, por lo tanto, otro posible mecanismo por el cual FOS reduce la patogénesis bacteriana. Sin embargo, cualquier aplicación clínica requeriría un estudio más exhaustivo en humanos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

[1]. Amer LS., Bishop BM., van Hoek ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396: 246-251.

[2]. Chang W., Small D.A., Toghrol F., Bentley W.E. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics* 2005; 6: 115.

[3]. Christensen GD., Simpson WA., Younger JJ., Baddour LM., Barrett FF et al. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22: 996-1006.

[4]. Daddaoua A., Puerta V., Requena P.,

Martinez-Ferez A., Guadix E. et al., Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 2006; 136: 672-676.

[5]. Duseja A., Chawla Y.K. Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. *Clin Liver Dis* 2014;18: 59-71.

[6]. Froebel L.K., Jalukar S., Lavergne T.A., Lee J.T. Duong T. Administration of dietary prebiotics improves growth performance and reduces pathogen colonization in broiler chickens. *Poult Sci* 2019; 98: 6668-6676.

[7]. Gaines J.M., Carty N.L., Tiburzi F., Davinic M., Visca P., Colmer-Hamood J.A., Hamood A.N. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor PvdS under reduced levels of oxygen. *Microbiology* 2007; 153: 4219-33.

[8]. Hoiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 2010; 5: 1663-1674.

[9]. Huang X., Du W., McClellan SA., Barrett RP., Hazlett LD. TLR4 is required for host resistance in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4910-4916.

10. Juhas M. *Pseudomonas aeruginosa* essentials: an update on investigation of essential genes. *Microbiology* 2015; 161: 2053-

2060.

[11]. Juhas, M., Van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., Crook, D.W. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33: 376-93.

[12]. Knol J., Boehm G., Lidestri M., Negretti F., Jelinek J., Agosti M., Stahl B., Marini A., Mosca F. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants. *Acta Paediatr Suppl* 2005;94(449): 31-3.

[13]. Lavoie EG., Wangdi T., Kazmierczak B.I. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect* 2011;13: 1133–1145.

[14]. Mah TF., Pitts B., Pellock B., Walker G.C., Stewart P.S., O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003; 426(6964):306-10.

[15]. Manuel Rubio-Gómez., Carlos Molina-Santiago., Zulema Udaondo., Mireia Tena-Garitaonandia., Tino Krell., Juan-Luis Ramos., Abdelali Daddaoua. Full Transcriptomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* to an Inulin-Derived Fructooligosaccharide. *Frontiers in Microbiology* 2020; 11:202. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00202.

[16]. Mao J., Lu T., Population-Dynamic Modeling of Bacterial Horizontal Gene Transfer by Natural Transformation. *Biophys J* 2016; 110: 258-68.

[17]. Miyoshi-Akiyama T., Tada T., Ohmagari N., Viet Hung N., Tharavichitkul P., Pokhrel B.M., Gniadkowski M., Shimojima M., Kirikae T. Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol Evol* 2017; 9: 3238-3245.

[18]. Molina-Fuentes Á., Pacheco D., Marín P., Philipp B., Schink B., Marqués S. Identification of the Gene Cluster for the Anaerobic Degradation of 3,5-Dihydroxybenzoate (α -Resorcyate) in *Thauera aromatica* Strain AR-1. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(20):7201-14.

[19]. Natividad J.M., Verdu E.F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 2012; 69:42-51.

[20]. Ortega González M., v Sánchez de medina F., Molina-santiago C., López-posadas R., Pacheco D., Krell T., Martínez Augustin O., Abdelali Daddaoua. Fructooligosaccharides reduce *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pathogenicity through distinct mechanisms. *Plos One* 2014; 9(1):e85772.

[21]. Ortiz-Castro R., Pelagio-Flores R., Méndez-Bravo A., Ruiz-Herrera L.F., Campos-

García J., López-Bucio J. Pyocyanin, a virulence factor produced by *Pseudomonas aeruginosa*, alters root development through reactive oxygen species and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 2014; 27: 364-78.

[22]. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor: New York 1989.

[23]. Stephen-Bentley D., Julian Parkhill. *Genomic perspectives on the evolution and spread of bacterial pathogens*. *Proc Biol Sci* 2015; 22: 282.

[24]. Tattersson, L.E., Poschet, J.F., Firoved, A., Skidmore, J., Deretic, V. CFTR and

Pseudomonas infections in cystic fibrosis. *Front Biosci*. 2001;6:D890-7.

[25]. Von Klitzing, E., Bereswill, S., Heimesaat, M.M. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Induce Systemic Pro-Inflammatory Immune Responses in Colonized Mice. *Eur J Microbiol Immunol* 2017; 7: 200-209.

[26]. Yasuda, A., Inoue, K., Sanbongi, C., Yanagisawa, R., Ichinose, T., Tanaka, M., Yoshikawa, T., Takano, H. Dietary supplementation with fructooligosaccharides attenuates allergic peritonitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;422(4):546-50.