

03088



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Colegio de Ciencias y Humanidades**

12  
21

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Estudio genético de la producción  
de ramnolípidos en  
*Pseudomonas aeruginosa***

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**  
**P R E S E N T A**  
**M. en C. Marina Wild Santamaría**

**Cuernavaca, Morelos, Noviembre de 1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Estudio genético de la producción de ramnolípidos  
en *Pseudomonas aeruginosa***

**Tesis que para obtener el grado de DOCTOR EN  
BIOTECNOLOGIA en el Instituto de Biotecnología de la  
Universidad Nacional Autónoma de México presenta la M. en  
C. MARINA WILD SANTAMARIA bajo la asesoría de la Dra.  
Gloria Soberón Chávez.**

**Cuernavaca, Mor. Octubre de 1997**

## **AGRADECIMIENTOS**

Estoy agradecida con los miembros del comité tutorial formado por los doctores Xavier Soberón, Guadalupe Espín y Gloria Soberón por saber guiar pacientemente este trabajo.

Mi sincero agradecimiento a Eduardo Juárez y Maricela Izquierdo que nos ayudan y ofrecen su amistad en las buenas y en las malas. La parte inicial de este estudio se realizó con la colaboración de Alma Delia Caro a quien agradezco su apoyo técnico.

A Lourdes Lloret, Marfa Eugenia Campos y Rita Barreto. Al Dr. Vázquez Duhalt por la revisión y corrección de éste y otros manuscritos, a Raunel Tinoco por su apoyo con el HPLC, a Pedro Saucedo por la elaboración de las figuras en esta tesis, a los fotógrafos Sergio y Alejo Pichardo y a la Dra. Gloria Soberón por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto tan interesante.

A Dios le agradezco que Germán Espinosa, Graciela Santamarfa, Santiago y Cristóbal Espinosa existan y formen parte de mi vida.



## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que produce glicolípidos extracelulares llamados ramnolípidos que tienen propiedades tensoactivas con aplicaciones ambientales e industriales. Los principales ramnolípidos que se producen en cultivos líquidos son los mono-ramnolípidos (L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato) y di-ramnolípidos (L-ramnosil-L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato). En este trabajo se reporta el aislamiento selectivo de una mutante afectada en la producción de ramnolípidos (IBT8) incapaz de acumular mono-ramnolípidos mientras que sigue produciendo di-ramnolípidos. La mutante IBT8 también está afectada en la síntesis de pigmento, lipopolisacáridos de la membrana y en la producción de una proteasa que hidroliza caseína, lo que sugiere que la mutación en IBT8 es de tipo regulatorio. Esta mutante se seleccionó por mutagénesis al azar usando el transposón Tn501. Sin embargo, se encontró que su deficiencia en la producción de mono-ramnolípidos no estaba asociada a la inserción del Tn501 ni a posibles alteraciones en los genes *rhLABRI* para la síntesis de ramnosil transferasa 1 (Rt1). Se construyó una librería genómica de *P. aeruginosa* IGB83 y se aisló el cósmido pNH2198 que complementa a IBT8 para la producción de ramnolípidos, pigmento y proteasa. Se discuten diferentes posibilidades para explicar el fenotipo de IBT8, sobre todo la hipótesis de que sintetiza di-ramnolípidos mediante una actividad residual de la enzima ramnosil transferasa 2 para funcionar como Rt1, al haber TDP-ramnosa disponible.

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* produces rhamnolipids that are tensoactive compounds with potential industrial and environmental applications. There are two main types of rhamnolipids produced in liquid cultures, rhamnosyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate (mono-rhamnolipid) and ramnosyl-ramnosyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate (di-rhamnolipid). In this work we report the selective isolation of a rhamnolipid deficient mutant (IBT8), which does not accumulate mono-rhamnolipid while still producing di-rhamnolipid. A regulatory mutation is suggested for IBT8 since it is also affected in pigment, lipopolysaccharide and caseine protease production. IBT8 was selected after random mutagenesis with Tn501; yet, its mono-rhamnolipid deficiency was found associated neither with its Tn501 insertion nor with a possible alteration in the *rhlABRI* genes for rhamnosyl-transferase I synthesis. A genomic library was constructed from *P. aeruginosa* IGB83 DNA and cosmid pNH2198 was found to restore IBT8 for rhamnolipid, pigment and protease synthesis. Different possibilities to explain IBT8 phenotype are discussed.

## INDICE

<b>Justificación</b>	<b>1</b>
<b>Tensoactivos</b>	<b>1</b>
<b>Tensoactivos biológicos</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	<b>8</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>8</b>
<b>Ramnolípido</b>	<b>9</b>
<b>Biosíntesis de precursores</b>	<b>13</b>
<b>Biosíntesis de ramnolípido</b>	<b>17</b>
<b>Regulación fisiológica de la producción de ramnolípido</b>	<b>19</b>
<b>Genética de la biosíntesis de ramnolípido</b>	<b>20</b>
<b>Estudio del operón <i>rhlAB</i></b>	<b>21</b>
<b>Estudios del gen <i>rhlI</i></b>	<b>23</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>30</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>30</b>
<b>Artículo</b>	
<b>Material y Métodos adicionales</b>	<b>31</b>
<b>Resultados adicionales</b>	<b>32</b>
<b>El gen <i>rhlR</i> complementa parcialmente a IBTS</b>	<b>34</b>
<b>El gen afectado en IBTS podría estar involucrado en la regulación de la disponibilidad ó síntesis de TDP-ramnosa</b>	<b>39</b>



## **Estudio genético de la producción de ramnolípidos en *Pseudomonas aeruginosa***

### **JUSTIFICACION**

#### **TENSOACTIVOS**

Los tensoactivos son también conocidos como detergentes, jabones (sales metálicas alcalinas de cadena larga de ácido graso) y surfactantes. Son compuestos que tienen actividad de superficie o de interfase. Es decir que cuando están en solución acuosa se alinean en la interfase agua-aire ó aceite-agua disminuyendo la tensión superficial e interfacial de la solución con respecto a la del agua.

Los tensoactivos son moléculas amfifílicas, es decir, tienen una porción hidrofóbica que es más soluble en aceite ó en otros solventes hidrocarbonados, y otra hidrofílica que es más soluble en agua. Su alineamiento en las interfaces refleja la tendencia de las moléculas tensoactivas a acomodarse en la orientación más favorecida energeticamente (Neugebauer J, 1988).

Existe una gran variedad de estructuras químicas con posibles propiedades amfifílicas. Sin embargo solamente una pequeña fracción de estas estructuras, que se clasifican de acuerdo a la carga de los iones que producen en solución acuosa (Fig. 1), representa la mayor parte de la producción industrial mundial que aumentó de 35 000 toneladas en 1950 a 4.3 millones de toneladas en 1990 (Cain R, 1994).

La actividad de los tensoactivos puede determinarse de las siguientes formas:

1) Midiendo la tensión superficial en las interfaces aire-agua y aceite-agua con un tensiómetro. La tensión superficial del agua destilada es de 72 mN/m que se reduce al agregar un tensoactivo a 30 mN/m mientras que la interfacial se reduce de 42 mN/m a valores cercanos a cero (Banerjee S. 1991). Cuando se va agregando un tensoactivo a un sistema agua-aire ó aceite-agua, la tensión superficial va disminuyendo hasta llegar a un punto crítico llamado concentración micelar crítica (CMC). En este punto las moléculas de tensoactivo se agrupan para formar micelas en las que sus porciones hidrofóbicas hacen contacto hacia el centro de la micela mientras que las hidrofílicas forman el exterior de la micela en contacto con el agua

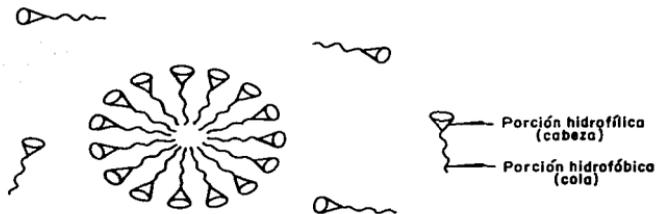


(Fig. 2). La CMC depende de la solubilidad del tensoactivo en el agua y se usa para determinar su eficiencia.

2) Mediante su capacidad de estabilizar ó desestabilizar emulsiones. Una emulsión se forma al dispersar un aceite en forma de gotas microscópicas en agua. Los tensoactivos son emulsificantes cuando estabilizan estas emulsiones y desemulsificantes cuando las desestabilizan. La actividad de emulsión se mide por la capacidad de un tensoactivo para generar turbidez en un sistema aceite-agua agitado.

3) Mediante un balance hidrofílico-lipofílico (BHL). El valor BHL indica cuando un tensoactivo favorece una emulsión agua en aceite ó aceite en agua al compararlo con otro tensoactivo con un valor BHL conocido (Desai J, *et al.* 1997).

Aunque no existe un tensoactivo adecuado para todos los usos, diferentes tensoactivos son excelentes detergentes, emulsificantes, espumantes y dispersantes (Greek B, 1991) con aplicaciones en las industrias petrolera, de pinturas y recubrimientos, tratamiento y manufactura de asfalto, cemento, textiles y pieles, antiespumantes, conservadores de madera, limpiadores industriales, artículos de cuidado personal, detergentes, cosméticos, alimentos y medicinas (Haumann B, 1990; Ainsworth S, 1990). El mercado mundial de tensoactivos asciende así a US\$9.4 billones anuales (Desai J, *et al.* 1997), con un crecimiento aproximado del 35% hacia finales del siglo (Greek B, 1991). La mayoría de estos compuestos son de origen sintético.



**Fig. 2 Formación de micelas por moléculas tensoactivas en solución acuosa (tomado de Neugebauer J. 1988).**

## TENSOACTIVOS BIOLÓGICOS

Los tensoactivos biológicos son moléculas producidas por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, ya sea que los excreten ó que los produzcan sobre su superficie. Se clasifican de acuerdo a su composición química y a su origen. En general, la porción hidrofílica está formada de aminoácidos ó péptidos que pueden ser aniónicos ó catiónicos ó de mono, di ó polisacáridos. La parte hidrofóbica está formada de ácidos grasos saturados ó insaturados. Los tensoactivos biológicos son así una amplia diversidad de moléculas de glicolípidos, lipoproteínas ó lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos, tensoactivos poliméricos y particulados (Desai J, *et al.* 1997) (Tabla 1). Aunque la composición química de algunas de estas moléculas sea conocida, aún queda por aclarar su función en la naturaleza. Se ha propuesto que posiblemente los tensoactivos biológicos participen en los siguientes procesos:

- 1) aumento en la biodisponibilidad y consecuente biodegradación de fuentes de carbono poco solubles como hidrocarburos del petróleo,
- 2) como auxiliar en la adhesión y desprendimiento de la bacteria de superficies,
- 3) como mecanismo de defensa antibacteriano,
- 4) como factor de virulencia en la patogénesis de animales y plantas,
- 5) como auxiliar en la colonización de superficies foliares,
- 6) para atrapar metales (Stanghellini M, *et al.* 1997).

Los tensoactivos biológicos reducen la tensión superficial e interfacial tanto de soluciones acuosas como de mezclas de hidrocarburos por lo que tienen potencial para usarse en los procesos de desulfuración y de extracción del petróleo. Los tensoactivos biológicos tienen algunas ventajas sobre los sintéticos al tener características estructurales y propiedades físicas novedosas en el mercado de los tensoactivos. Los tensoactivos biológicos pueden ser más biodegradables y menos tóxicos que los sintéticos, más compatibles con el medio ambiente, mejores espumantes, con una alta selectividad y actividad específica en condiciones de temperatura, pH y salinidad extremas y tienen la posibilidad de sintetizarse a partir de recursos renovables. Posiblemente se podrían producir mediante fermentaciones y tienen potencial para usarse en las industrias de extracción de petróleo crudo, farmacéutica y de alimentos (Desai J, *et al.* 1997). Sin embargo, no se ha logrado hacer que estos compuestos biológicos sean económicamente competitivos con los sintéticos, pues mientras el costo de producción para los primeros es de US\$ 4-6/Kg, para los sintéticos es de US\$ 0.80/Kg (Chakrabarty A. 1996).

**Tabla 1.** Tensoactivos de origen biológico (Desai J, *et al.* 1997).

Tensoactivo	Microorganismo
<b>Glicolípidos</b>	
Ramnoolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trehalolípidos	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Soforoolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i>
Celobiolípidos	<i>U. zeae</i> , <i>U. maydis</i>
<b>Lipopéptidos y Lipoproteínas</b>	
Péptido-lípido	<i>B. licheniformis</i>
Serawetina	<i>S. marcescens</i>
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
Surfactina	<i>B. subtilis</i>
Subtilisina	<i>B. subtilis</i>
Gramicidina	<i>B. brevis</i>
Polimixinas	<i>B. polymyxa</i>
<b>Ácidos grasos, Lípidos neutros y Fosfolípidos</b>	
Ácidos grasos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lípidos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolípidos	<i>T. thiooxidans</i>
<b>Tensoactivos poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Manan-lípido-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carbohidrato-proteína-lípido	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>D. polymorphis</i>
Proteína PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Tensoactivos particulados</b>	
Vesículas y fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Toda la célula	Variiedad de bacterias

La producción competitiva de tensoactivos biológicos va a depender en gran medida del desarrollo de procesos costeables de extracción y purificación, del uso de sustratos de bajo costo y del aumento del rendimiento a través de manipulaciones genéticas de microorganismos (Desai J, *et al.* 1997). Este último punto requiere a su vez de un conocimiento más amplio sobre la fisiología, bioquímica y genética de la biosíntesis de los tensoactivos. El presente trabajo es un intento por comprender los mecanismos moleculares involucrados en la biosíntesis de los tensoactivos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

## INTRODUCCION

### *Pseudomonas aeruginosa*

Las bacterias del género *Pseudomonas* participan en una amplia variedad de procesos como el catabolismo y reciclaje de materia orgánica, fijación de nitrógeno y parasitismo de plantas y animales. Estas bacterias también participan por medio de sus rutas catabólicas en la eliminación de contaminantes tóxicos del medio ambiente. Recientemente se han dado avances en la genética y bioquímica de cepas de laboratorio, como las cepas PAO1 y PG201 de *Pseudomonas aeruginosa*. Por todo lo anterior, las bacterias del género *Pseudomonas* constituyen un sistema interesante para realizar estudios biotecnológicos (Ramos J, 1990).

Una de las especies de *Pseudomonas* a las que se les ha prestado mayor atención por ser un patógeno oportunista en el hombre, es la de *Pseudomonas aeruginosa*. Su patogenicidad está confinada a determinadas situaciones y grupos de riesgo como son las quemaduras severas y los pacientes con fibrosis quística (Ramos J, 1990). Recientemente también se han encontrado cepas de *Pseudomonas aeruginosa* como epifitas en cultivos de pepino y melón (Stanghellini M, et al. 1997). En este laboratorio se aisló una cepa de *P. aeruginosa* IGB83 por su capacidad de producir una enzima degradadora de grasas (lipasa) en medio alcalino (Palmeros B, et al. 1994). Esta cepa aislada a partir de un coco en descomposición, produce también compuestos tensoactivos. En general, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* producen una variedad de compuestos como el alginato, la elastasa (proteasa), proteasa alcalina, fosfolipasa C, exotoxina A, coenzima S, piocianina, (Latifi A, et al. 1995) y ramnolípidos. Por ser una de las bacterias mejor estudiadas del género a nivel laboratorio, nos pareció un sistema adecuado para el estudio de la genética de la producción de compuestos con propiedades tensoactivas.

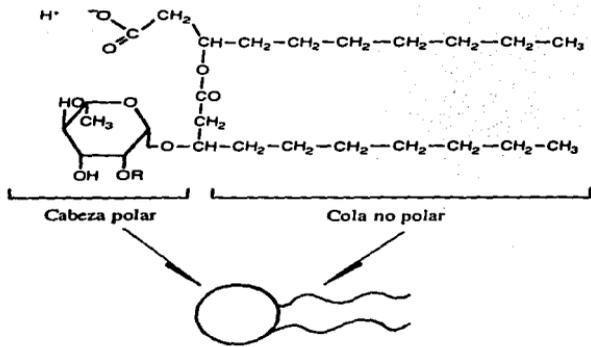
## RAMNOLÍPIDOS

Los tensoactivos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* son glicolípidos llamados ramnolípidos. Están formados por una ó dos unidades de ramnosa unidas mediante un enlace glicosídico a una ó dos unidades de ácido graso. Los principales ramnolípidos que se producen en cultivos líquidos son los mono-ramnolípidos (L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidrodecanoato) y di-ramnolípidos (L-ramnosil-L-ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidrodecanoato) (Fig. 3). *P. aeruginosa* bajo ciertas condiciones puede producir también otros tipos de ramnolípidos compuestos de dos unidades de ramnosa y un ácido graso ó de una ramnosa y un ácido graso (Fig. 4). Aunque *P. aeruginosa* produce mono y di-ramnolípidos en cultivo líquido, por análisis de resonancia magnética nuclear se ha comprobado que la cepa silvestre de *P. aeruginosa* ATCC9027 produce solamente mono-ramnolípidos (Zhang Y. *et al.* 1992). Sin embargo, hasta el presente estudio no se había reportado una cepa de *P. aeruginosa* que sólo produjera di-ramnolípidos.

Los mono y di-ramnolípidos se excretan al medio de cultivo y se pueden purificar a partir del caldo fermentado. Banerjee, en 1991 demostró que los ramnolípidos ó el emulsificante (EM) producido por la cepa de *P. aeruginosa* SBco22 tienen las siguientes ventajas:

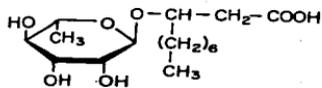
- son biodegradados por microorganismos de drenaje de aguas municipales,
- el caldo de cultivo no es tóxico al proporcionarlo como alimento para ratas,
- el ramnolípidos purificado no produce alergias al probarlo sobre piel de conejo,
- el ramnolípidos purificado es estable a temperatura ambiente y mantiene su actividad emulsificante en un rango de pH 4-9 y aún después de un proceso de esterilización en autoclave,
- el ramnolípidos es más eficiente en la reducción de la tensión interfacial entre agua y aceite de parafina, que algunos detergentes comerciales probados como NEODOL 91-6 (Fig. 5).

Los ramnolípidos tienen potencial para usarse en la industria petrolera y en la remoción de metales pesados (Miller R. 1995). Recientemente se ha demostrado un efecto antagonístico de los ramnolípidos sobre hongos (zoosporas) patógenos de plantas de interés comercial, por lo que se abre la posibilidad de usarse como agentes de control biológico en la agricultura (Stanghellini M. *et al.* 1997).



**Fig. 3** Molécula aniónica de mono-ramnolípido donde R=H. Cuando R=ramnosil, la molécula es un di-ramnolípido (tomado de Stanghellini M, *et al.* 1997).

a)



b)

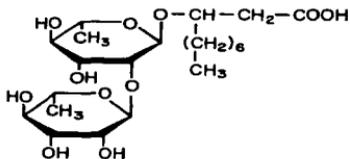


Fig. 4 Moléculas de a) mono-ramnolípido y b) di-ramnolípido formadas por una sola cadena de ácido graso.

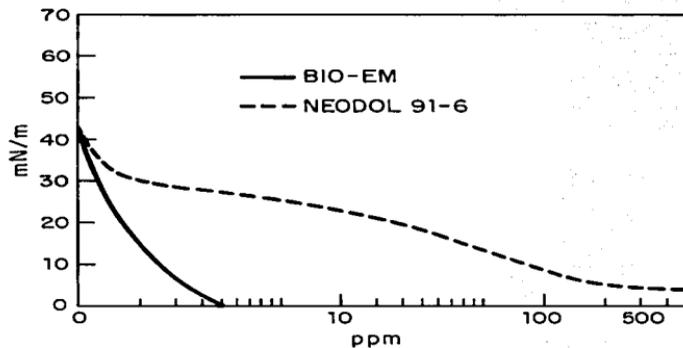


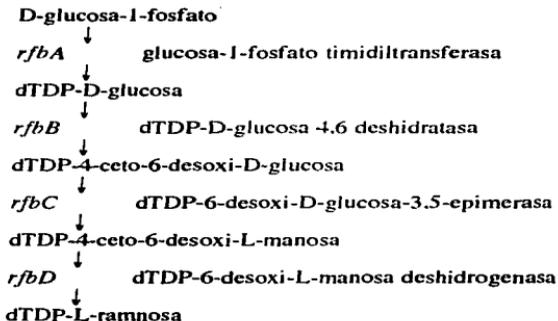
Fig. 5 Gráfica que muestra el efecto de concentraciones crecientes de ramnolípido (BIO-EM) y de un detergente comercial sobre la tensión interfacial del agua (Banerjee S, 1991).

## BIOSINTESIS DE PRECURSORES

En la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* participan dos rutas metabólicas primarias: una para el carbohidrato y otra para el ácido graso. Para la síntesis de la parte del carbohidrato, la molécula precursora es el azúcar activada timidina difosfato  $\alpha$ -L-ramnosa derivada de la reducción de TDP- $\alpha$ -D-glucosa mediante la siguiente reacción (Glaser L, *et al.* 1961):



En *Salmonella* y en algunas bacterias gram negativas las enzimas que catalizan estas reacciones se sintetizan a partir de los genes organizados en el operón *rfaABCD* (Zhang L, *et al.* 1993), en la siguiente secuencia:



En cuanto a la síntesis del ácido graso de los ramnolípidos aún queda por aclarar la concepción entre el metabolismo de ácidos grasos y la vía de síntesis de la molécula precursora  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato. En general, la síntesis de ácidos grasos comienza con acetil-Coenzima A (CoA) que se forma directamente a partir de piruvato que proviene de la glucosa ó del sustrato utilizado. El acetil-CoA es utilizado en la síntesis de citrato para el ciclo de Krebs y para otras reacciones incluyendo la síntesis de ácidos grasos (Fig. 6). Los ácidos grasos también pueden sintetizarse directamente de la oxidación de n-alcanos (Fig. 7) (Boulton C, *et al.* 1987).

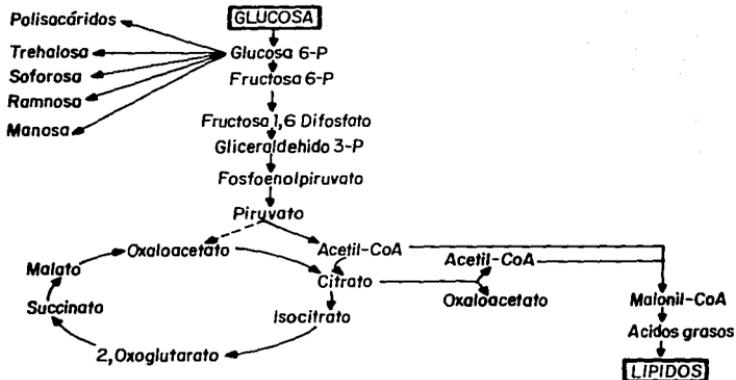


Fig. 6 Metabolismo intermediario a partir de glucosa de donde se deriva la síntesis de precursores de moléculas tensoactivas (Boulton C, *et al.* 1987).

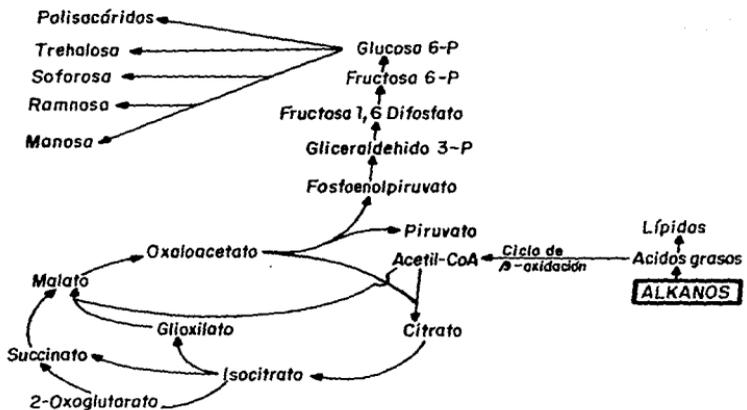


Fig. 7 Metabolismo intermediario a partir de substratos hidrocarbonados de donde se deriva la síntesis de precursores de moléculas tensoactivas (Boulton C, *et al.* 1987).

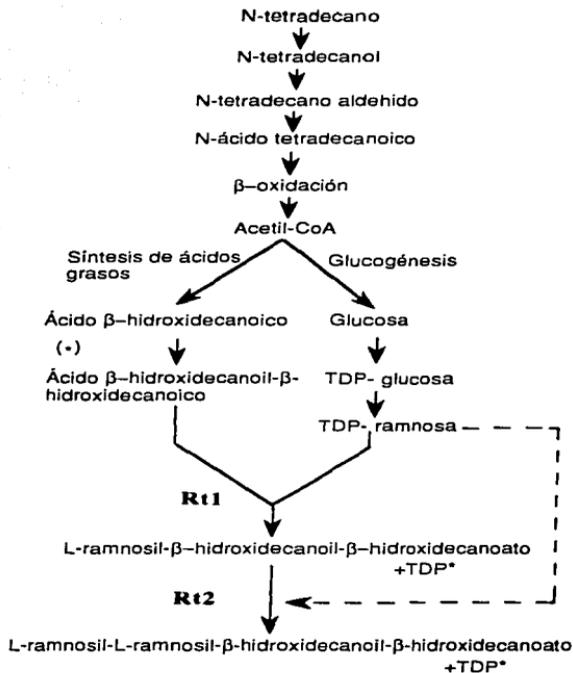
## BIOSINTESIS DE RAMNOLÍPIDOS

La biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* ha sido estudiada midiendo los productos intermedios del metabolismo en experimentos utilizando precursores radiactivos en extractos enzimáticos (Burger M, *et al.* 1963) y en "células en descanso" (biomasa cultivada en condiciones óptimas, separada del caldo de cultivo por centrifugación, lavada y resuspendida en un buffer) (Hauser G, *et al.* 1957). Considerando los resultados de estos experimentos se propuso una vía biosintética a partir de n-alcanos como fuente de carbono (Syldatk C, *et al.* 1987) (Fig. 8).

La molécula activada TDP-L-ramnosa es transferida a  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato mediante una reacción catalizada por la enzima específica ramnosil transferasa 1 (Rt 1) para sintetizar mono-ramnolípidos. Los di-ramnolípidos se forman al transferir una segunda molécula de TDP-L-ramnosa mediante la enzima ramnosil transferasas 2 (Rt 2) al mono-ramnolípedo previamente formado (Fig. 8). Ambas formas de ramnolípedo se pueden extraer a partir del sobrenadante libre de células (Haferburg D, *et al.* 1986).

Para la síntesis de los ramnolípidos compuestos de dos unidades de ramnosa y un ácido graso ó de una ramnosa y un ácido graso, la vía biosintética descrita se modifica ligeramente en la parte de la síntesis de ácidos grasos (Fig. 8(\*)). Estos compuestos son producidos por "células en descanso" con n-alcanos como fuente de carbono (Syldatk C, *et al.* 1987). Las moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanoico no se condensan sino que pasan directamente a la síntesis de mono-ramnolípidos de cadena corta. Sin embargo, la secuencia de las reacciones metabólicas es igual para todas las cuatro formas de ramnolípedo descritas (Syldatk C, *et al.* 1987).

La productividad y la composición del producto crudo dependen en parte de las condiciones de cultivo y del uso de las diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, la longitud de la cadena de los substratos hidrocarbonados no influye sobre la longitud de la cadena del ácido graso de los glicolípidos (Syldatk C, *et al.* 1987).



\*TDP=Timidinadifosfato  
**Rt1** = Ramnosil transferasa 1  
**Rt2** = Ramnosil transferasa 2

**Fig. 8** Diagrama para la síntesis de ramnolípidos a partir de n-tetradecano en *P. aeruginosa* (tomado de Syltatk C, et al. 1987).

## REGULACION FISIOLÓGICA DE LA PRODUCCIÓN DE RAMNOLÍPIDOS

En general la regulación de la producción de tensoactivos por microorganismos se lleva a cabo mediante tres mecanismos que son la inducción, la represión y la limitación de nitrógeno y de iones multivalentes (Desai J. *et al.* 1997).

En *P. aeruginosa* la síntesis de ramnolípidos se induce con substratos lipofílicos ó insolubles en agua. Los ramnolípidos se producen durante el crecimiento de esta bacteria en n-alcános como fuente de carbono (Chakrabarty A. 1985). Otras fuentes de carbono como glicerol, glucosa y etanol pueden inducir la producción de ramnolípidos pero la producción es menor (Hisatsuka K. *et al.* 1972). El rendimiento más alto inducido por n-alcános (3.5 g rml /g peso seco) se obtiene utilizando la biomasa lavada de *P. aeruginosa* ("resting cells") (Syldatk C. *et al.* 1987).

La represión de la síntesis de ramnolípidos se ha observado en cultivos de *P. aeruginosa* en glicerol a los que se les agrega glucosa, acetato succinato o citrato (Hauser G. *et al.* 1954). Sin embargo, se ha aislado una mutante (SB30) que no responde a la represión por glucosa y que produce emulsificante (EM) ó ramnolípidos en tanto en hexadecano como en glucosa con el mismo rendimiento (Chakrabarty A. 1985). Se ha reportado también que la glucosa, el glicerol y el ácido palmítico reprimen otros procesos relacionados con la biodegradación de hexadecano en *P. aeruginosa* S7B1, como es la producción de un activador de la oxidación de n-alcános (Hisatsuka K. *et al.* 1972).

La regulación de la producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa* también es ejercida bajo condiciones limitantes de nitrógeno, fierro y fósforo durante las fases de crecimiento exponencial tardía y estacionaria (Guerra-Santos L. *et al.* 1986; Mulligan C. *et al.* 1989) cuando la densidad celular es alta. En base a la limitación de fósforo se ha optimizado el medio PPGAS (Mulligan C. *et al.* 1989), para la producción de ramnolípidos. El medio PPGAS es un medio glucosado libre de grasas y aceites por lo que resulta conveniente para análisis de producción a pequeña escala. En cultivos de *P. aeruginosa* se puede observar el paso a la fase estacionaria del crecimiento al producirse un pigmento azul que coincide con la producción de ramnolípidos y la consecuente formación de espuma. La sobreproducción de ramnolípidos se induce también durante el crecimiento de *Pseudomonas* sp. en condiciones limitantes del ión  $\text{NH}_4^+$  ó  $\text{NO}_3^-$  y con n-alcános como fuente de carbono. (Syldatk C. *et al.* 1987). En cultivos continuos de *P. aeruginosa* cultivada en glucosa se aumentó la producción de ramnolípidos

de 7 a 10 veces después de limitar el ión  $\text{NO}_3^-$ . En condiciones limitantes de los cationes  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ó  $\text{Ca}^{2+}$ , se aumenta aún más la producción de ramnolípidos (Guerra-Santos L, *et al.* 1986). Para la producción de ramnolípidos en planta piloto se ha optimizado un medio (3M) con exceso de glucosa y fósforo pero limitado en nitrógeno y hierro (Reiling H, *et al.* 1986).

## GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS DE RAMNOLÍPIDOS

La obtención de mutantes de *P. aeruginosa* afectadas en la biosíntesis de ramnolípidos para estudiar la genética de este proceso se veía limitada por la dificultad para poderlas seleccionar. Aunque se había aislado este tipo de mutantes en base a su incapacidad de crecer en hidrocarburos (Chakrabarty A. 1985), realmente no existía un bioensayo que permitiera seleccionar y analizar a las colonias no productoras de ramnolípidos después de mutagenizarlas. Sin embargo, en los últimos años se desarrollaron técnicas como la detección de ramnolípidos en medio mínimo con azul de metileno (Siegmund I, *et al.* 1991) que facilitaron el aislamiento de estas mutantes. Asimismo se adaptó la cromatografía en capa fina (Matsuyama T. 1987) para el análisis de tensoactivos biológicos.

De esta forma, a través de los trabajos de un grupo de investigación del Instituto Federal de Tecnología en Suiza (Ochsner U, *et al.* 1994-1995), se llegó a entender mejor la genética de la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa*. Se aisló una mutante (65E12 derivada de la cepa PG201), incapaz de crecer en medio mínimo con hexadecano como fuente de carbono, que no producía ramnolípidos (Koch A, *et al.* 1991) y sin actividad de ramnosil transferasa I (Ochsner U, *et al.* 1994b). Al complementar a la mutante 65E12 con una librería genómica de la cepa silvestre, se aisló un cósmido que restauró los fenotipos afectados. El cósmido aislado contenía un marco de lectura abierto de 723 pares de bases del que se dedujo una proteína de 28 kDa. Esta proteína tenía homología con proteínas regulatorias (activadores transcripcionales) en *P. aeruginosa*, *Vibrio fischeri*, *Rhizobium leguminosarum* y *E. coli*. Al clonar a este gen llamado *rhlR*, en un vector multicopia e introducirlo en la cepa silvestre, se estimuló tanto el crecimiento de esta bacteria en medio mínimo con hexadecano, como la producción de ramnolípidos y del pigmento piocianina. Se determinó que la proteína RhlR era un regulador pleiotrópico al participar también en la producción de elastasa (Ochsner U, *et al.* 1994).

Usando mutantes de *P. aeruginosa* incapaces de producir ramnolípido, generadas por inserción con transposón, se aislaron los genes *rhIA*, *rhIB* y *rhII* (Ochsner U, *et al.* 1994b). Se clonaron primero las regiones que flanqueaban al transposón en las mutantes para usarlas como probadores de hibridación contra una librería genómica de la cepa silvestre. Los cósmidos así aislados que complementaban a las mutantes para la producción de ramnolípidos se subclonaron y secuenciaron para establecer un mapa del grupo de genes *rhIABRI* que participaba en la biosíntesis y regulación de ramnolípido (Fig. 9).

### Estudio del operón *rhIAB*

Para establecer la función de los dos primeros genes en este grupo se realizaron experimentos de expresión controlada en *P. aeruginosa* y *E. coli*. Al fusionar el promotor inducible *tac* de *E. coli* al gen *rhIA* no se detectó actividad de ramnosil transferasa I (Rt I). Esta actividad se detectó en fusiones del promotor *tac* al gen *rhIB* ó bien en fusiones que incluyan ambos genes funcionales. Se concluyó entonces que RhIB era la proteína catalítica Rt I. Sin embargo, la producción de ramnolípidos en cultivos de *P. aeruginosa* era mayor cuando ambos genes *rhIA* y *rhIB* se expresaban, que cuando sólo se expresaba *rhIB*. Para la producción de ramnolípidos se requería entonces tanto de la proteína RhIB como de la RhIA (Ochsner U, *et al.* 1994b).

Aunque no se estableció con claridad la función de la proteína RhIA, por homología de secuencias se dedujo que esta proteína de 32.5 kDa se exportaba al periplasma al tener un péptido señal característico de exportación en bacterias Gram negativas, en su extremo amino terminal (Ochsner U, *et al.* 1994b). Por otra parte, la proteína RhIB ó Rt I de 47 kDa que se dedujo de la secuencia nucleotídica no tenía homología con ninguna proteína conocida. Mediante un perfil de hidropatía se observó que esta enzima poseía por lo menos dos posibles dominios de adhesión a membrana: uno en los primeros 20 aminoácidos del extremo amino terminal y otro en el extremo carboxilo, entre los aminoácidos 300 y 350. Se pensó entonces que la Rt I podría estar anclada a la membrana citoplásmica por el extremo amino terminal y que la puede atravesar exponiendo sus dominios a ambos lados de la membrana (Ochsner U, *et al.* 1994b). Se sugirió también que el transporte ó síntesis de precursores de substratos para la Rt I se llevaba a cabo mediante la participación de la proteína RhIA. O bien, que RhIA fuera necesaria para estabilizar a la proteína RhIB en la membrana citoplásmica (Ochsner U, *et al.* 1995).

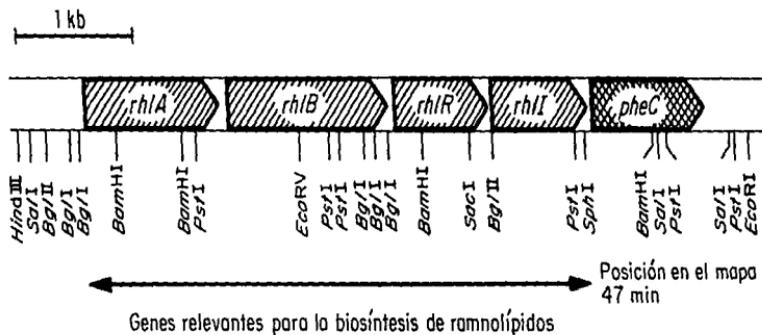


Fig. 9 Mapa del grupo de genes *rhlABRI* involucrados en la biosíntesis de ramnolípidos y su regulación (tomado de Ochsner U, *et al.* 1995).

Se realizaron otros estudios para medir la actividad de los promotores de los genes *rhIB* y *rhIA* fusionandolos al gen reportero *lacZ* de *E. coli*. Al medir la actividad de  $\beta$ -galactosidasa producto del gen *lacZ* bajo el control del promotor *rhIB*, se observó que este promotor se activaba muy poco y solamente durante la fase estacionaria del crecimiento en medio mínimo. En cambio, cuando además del promotor del gen *rhIB* se incluía el gen funcional *rhIA* cuesta arriba del mismo (Fig. 9), los niveles de actividad de  $\beta$ -galactosidasa eran altos. Esta información indicaba que el gen *rhIB* se transcribía a partir del promotor del gen *rhIA*. Se concluyó así que los genes *rhIA* y *rhIB* se encontraban formando un operón (*rhIAB*).

Al fusionar solamente al promotor de *rhIA* al gen *lacZ* y medir la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se reveló que en *P. aeruginosa* la expresión del promotor *rhIA* aumentaba 20 veces durante la fase estacionaria de crecimiento en condiciones de nitrógeno limitante. Este experimento se realizó también en la mutante RhI2 afectada en el gen *rhIR* y se observó que en ausencia de la proteína RhIR no se detectaba activación del promotor *rhIA*. Se concluyó entonces que la proteína RhIR participaba en la activación transcripcional del gen *rhIA*. Mediante análisis de deleciones en la región cuesta arriba del promotor de *rhIA* se determinó la presencia de secuencias nucleotídicas invertidas donde supuestamente se unía la proteína regulatoria RhIR para activar la transcripción del operón *rhIAB* (Ochsner U, et al. 1994b).

### **Estudios del gen *rhII***

Cuesta abajo del grupo de genes *rhIABR* se identificó el gen *rhII* en un marco de lectura abierto de 603 pares de bases del que se deducía una proteína RhII de 22 kDa. Una mutante de *P. aeruginosa* generada en el gen *rhII*, no tenía actividad de ramnosil transferasa ni producía ramnosípidos. Se encontró que la proteína RhII tenía homología con las proteínas LuxI de *V. fischeri*, LasI de *P. aeruginosa*, ExlI de *E. carotovora* y TraI de *A. tumefaciens* que catalizaban la síntesis de moléculas de homo serin lactonas (HSL) (Ochsner U, et al. 1995).

Las HSL son moléculas pequeñas que difunden al medio de cultivo y que activan genes específicos para la producción de metabolitos secundarios mediante un sistema de regulación por autoinducción ó de sensibilidad colectiva y respuesta. En este sistema las bacterias monitorean su propia densidad celular al producir moléculas de HSL llamadas autoinductores que se acumulan en el medio durante el crecimiento. Cuando la densidad celular es baja, la concentración de HSL también es baja; mientras que cuando esta densidad es alta, la concentración de HSL alcanza niveles críticos que

resultan en la activación transcripcional de los genes que participan en la producción del metabolito en cuestión (Claiborne W, *et al.* 1994). Este mecanismo regulatorio de autoestimulación tiene el potencial de generar una respuesta rápida y fuerte al estímulo apropiado al coordinar la respuesta de toda una población celular (Brint J, *et al.* 1995).

El mejor ejemplo de un sistema regulador por autoinducción es el par LuxR-LuxI en *Vibrio fischeri*. Lux R es una proteína activadora de la transcripción del operón *luxICDABEG* cuyos genes participan en el fenómeno de bioluminiscencia de esta bacteria. La proteína LuxR funcional se encuentra formando un complejo con la molécula N-(3-oxohexanoil)-HSL (VAI), producto de la enzima autoinductor sintetasa LuxI. La formación del complejo LuxR-VAI es necesaria para la unión eficiente de LuxR a un sitio de regulación positiva en el ADN que se encuentra cuesta arriba del operón *luxICDABEG* para la producción de luz (Brint J, *et al.* 1995; Claiborne W, *et al.* 1994).

El sistema regulador de la transcripción de respuesta a autoinductor en *P. aeruginosa* es el formado por el par LasR-LasI. LasR es aparentemente un regulador global involucrado en el control transcripcional de varios genes incluyendo las proteasas elastasa, LasA y alcalina. Este control de LasR requiere del autoinductor PAI (formado de N-(3-oxododecanoil) homoserin lactona) producto de acción enzimática de LasI. El sistema LasR-PAI en *P. aeruginosa* se ha descrito como un mecanismo de comunicación entre célula y célula en respuesta a la densidad celular para permitir la expresión coordinada de genes asociados a virulencia para concertar el ataque al huésped (Brint J, *et al.* 1995). Estudios realizados por Pearson J, *et al.* en 1995, demostraron que la cepa de *P. aeruginosa* PAOI producía una segunda señal HSL (N-butirilhomoserin lactona) llamada Factor 2 que también estaba involucrada en el control transcripcional de la elastasa.

Como se mencionaba al principio de esta sección, se generó una mutante de *P. aeruginosa* en el gen *rhlI*, sin actividad de ramnosil transferasa ni producción de ramnolípidos. Se realizaron experimentos para inducir la síntesis de ramnolípidos con los autoinductores Factor 2, PAI y VAI, en cultivos en crecimiento exponencial de la mutante en *rhlI*. El factor 2 resultó ser el inductor más eficiente seguido del inductor VAI. Sin embargo, PAI no funcionó para la inducción de la biosíntesis de ramnolípidos en esta mutante. Se probó entonces inducir estos cultivos usando el sobrenadante de cultivos de la cepa silvestre PG201, de una mutante en el gen *rhlA* y de otra en el gen *rhlR*. La producción de ramnolípidos en la mutante *rhlI* se indujo tanto con el sobrenadante de la

cepa silvestre como con el de la mutante en *rhIA*. El sobrenadante de la mutante en *rhIR* no tuvo ninguna capacidad de inducción sobre estos cultivos. Estas observaciones indicaban que el gen *rhIR* era necesario para la síntesis de autoinductor tal vez mediante la activación transcripcional del gen *rhII* (Ochsner U, *et al.* 1995).

Se propuso entonces un modelo para la regulación de la producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa*. (Fig. 10). La regulación se llevaba a cabo mediante un sistema RhIR-RhII en el que participaba un autoinductor. La proteína regulatoria RhIR se activaba al unirse al autoinductor producto de la enzima autoinductor sintetasa RhII. Aunque la proteína RhIR se podía unir tanto al Factor 2 como al inductor VAI, no se determinó cuál de los dos era el producto de la proteína RhII.

La expresión del gen *rhII* se encontraba a su vez bajo el control de la proteína regulatoria RhIR. La unión de la proteína RhIR activada a un sitio específico cuesta arriba del promotor de *rhIA* activaba la transcripción del operón *rhIAB* que codificaba para la enzima Rt 1, que era la enzima clave para la biosíntesis de ramnolípidos. El sistema RhIR-RhII tenía homología con los sistemas reguladores sensores de la familia LuxR-LuxI y LasR-LasI (Ochsner U, *et al.* 1995).

Como se mencionaba en los trabajos de Pearson J, *et al.* 1995, el Factor 2 estaba involucrado tanto en el control transcripcional de ramnolípidos como de la elastasa pues mutantes afectadas en los genes *rhIR* ó *rhII* no sintetizaban ninguno de estos productos. Estas mutantes se complementaban por lo menos parcialmente para la producción de ramnolípidos y elastasa en presencia de sus genes silvestres respectivos. Sin embargo, mutantes afectadas en el gen *lasR*, no producían elastasa ni ramnolípidos. Entonces, se sugirió que para la síntesis tanto de ramnolípidos como de elastasa se requería de ambos sistemas regulatorios RhIR-RhII y LasR-LasI (Latifi A, *et al.* 1996). Se observó que mutantes en RhIR en presencia del gen *lasR* en multicopia producían niveles bajos, pero detectables de ramnolípido. En contraste, una mutante *lasR<sup>-</sup>* que lleva al gen *rhIR* en multicopia producía altos niveles de elastasa. Es decir, que existía una regulación cruzada entre los genes *rhIR* y *lasR* que les permitía substituirse, por lo menos parcialmente cuando se encontraban en multicopia (Ochsner U, *et al.* 1995).

Una explicación a este comportamiento de entrecruzamiento podría ser que la proteína RhIR mejorara la producción de PAI, por lo que se mejoraría a su vez la expresión del gen estructural de la elastasa *lasB*. Otra explicación sería que el sistema RhIR-RhII estuviera involucrado en la regulación del

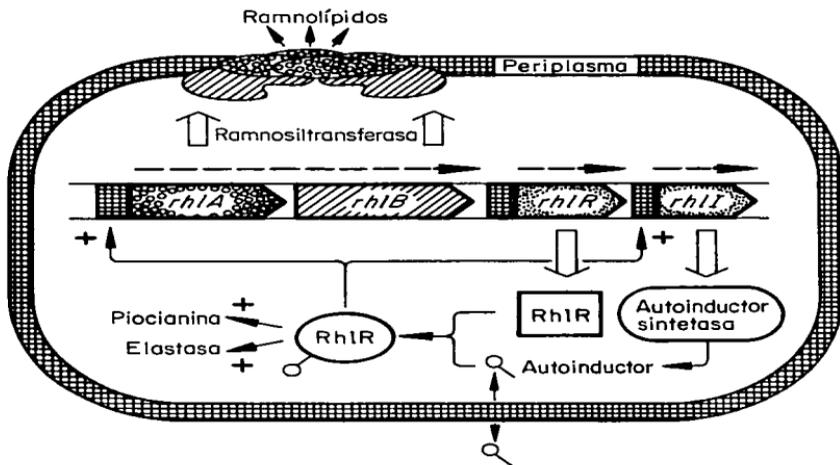


Fig. 10 Modelo para la regulación de la producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa*. (Ochsner U, et al. 1995).

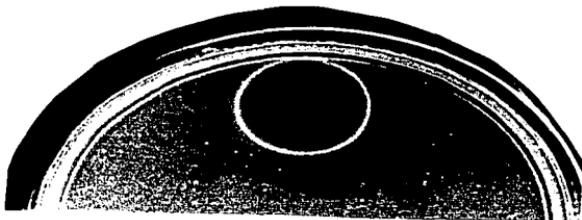
gen *lasA*, que codificaba para una segunda elastasa que se sabe incrementa la actividad elastolítica en *P. aeruginosa*. El hecho de que el gen *lasR* en multicopia en mutantes *rhIR*<sup>-</sup> sólo produjera cantidades limitadas de ramnolípido podía indicar que múltiples copias del gen *lasR* llevaban a una activación preferencial del promotor del gen heterólogo de la autoinductor sintetasa *rhII*, en lugar de activar al promotor del gen *rhIA*. Este punto de vista se apoyaba en unos estudios recientes en los que se sugería una jerarquía regulatoria de autoinductores: LasR y bajas concentraciones de PAI activaban principalmente la expresión del gen *lasI* en una vuelta de cascada regulatoria. Al acumularse PAI, se vio que se producía una activación secundaria de genes producto de virulencia como *lasB*. El complejo heterólogo LuxR-VAI, sin embargo, no tuvo ningún efecto en la expresión del gen *lasI*. Tampoco se encontró una actividad significativa de LuxR ni de LasR con los autoinductores heterólogos de *Vibrio* ó de *Pseudomonas* (Ochsner U, *et al.* 1995).

Los fenotipos pleiotrópicos de mutantes de *P. aeruginosa* en ambos genes para RhIR y para RhII, que provocaban también defectos en otros factores de virulencia extracelular como la proteasa LasA y el pigmento pirocianina de reducción-oxidación confirmaban el papel de este par en la regulación global de productos de virulencia extracelular (Brint J, *et al.* 1995). *P. aeruginosa* posee por lo menos dos sistemas de autoinducción para regular la expresión de sus numerosos factores de virulencia secretados de una manera dependiente de la densidad celular. Aún no se había definido cómo estos sistemas regulatorios dependientes de autoinductor influenciaban la expresión de sus genes blanco y cómo interactuaban uno con otro.

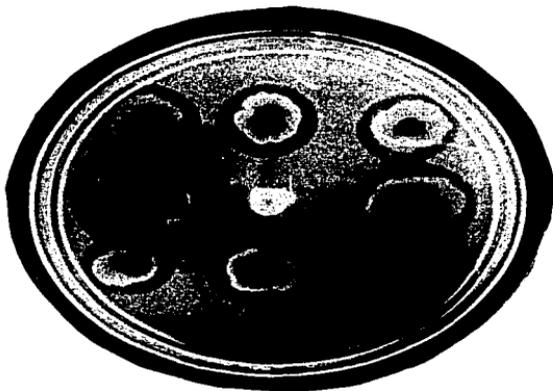
El presente trabajo se inició antes de la publicación de los trabajos de U. Ochsner en donde se describía a los genes *rhIABRI* como los genes biosintéticos para la producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa* así como las estrategias que usaron para la obtención, selección y análisis de mutantes no productoras de ramnolípidos. Es decir, que al inicio de este trabajo no se habían establecido técnicas para el aislamiento y análisis de estas mutantes. Tampoco se tenía la certeza de que los compuestos tensoactivos producidos por las diferentes cepas de *P. aeruginosa* fueran ramnolípidos. Es decir, en el presente proyecto, antes de iniciar el estudio de genético de la producción de ramnolípidos, se trabajó primero en:

- la identificación del tensoactivo producido por las cepas de *P. aeruginosa* del laboratorio IGB83, 29-1 y ATCC9027 por cromatografía y medición de la tensión interfacial (información no incluida).

a)



b)



**Fig. 11** Formación de halos en medio PPSW asociados a la producción de ramnolípido. a) ramnolípido purificado de la cepa 29-1, b) colonias de *P. aeruginosa* 29-1::Tn501. Al centro la mutante IBT8.

- la adaptación de un bioensayo en caja de Petri para el análisis de mutantes en el que la cepa 29-1 resultó ser la cepa más adecuada por la formación de halos bien definidos en el medio de selección (Fig. 11).
- el montaje de la cromatografía en capa fina en el laboratorio incluyendo la definición del sistema de solventes y revelador a usar.
- en la medición de la tensión interfacial de un cultivo en ausencia de un tensiómetro.
- en la evaluación del transposón adecuado para mutagenizar a la cepa 29-1.

Por eso, los objetivos particulares enunciados a continuación enfatizan el trabajo en esa dirección. Una vez que se adaptó una metodología de selección y análisis de mutantes en la producción de ramnolípidos, se aisló una mutante en la producción de ramnolípidos que es muy interesante dado su fenotipo y por no estar afectada, por lo menos directamente, en ninguno de los genes reportados con anterioridad.

## **OBJETIVO GENERAL**

El presente estudio se inició con la finalidad de contribuir al conocimiento de la genética de la producción de ramnolípidos para mejorar eventualmente las perspectivas biotecnológicas de su producción. Dado el potencial de la manipulación genética de *Pseudomonas aeruginosa* para impactar en el aumento del rendimiento a través de fermentaciones, en este proyecto se planteó el estudio de los genes involucrados en la producción y regulación de tensoactivos en la cepa 29-1 de *Pseudomonas aeruginosa*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Identificar el tensoactivo producido por esta cepa mediante el análisis por disminución de la tensión interfacial, cromatografía en capa fina, y cromatografía de alta resolución (HPLC).
- 2) Diseñar un bioensayo para la producción de tensoactivo.
- 3) Mutagenizar a la cepa 29-1 de *Pseudomonas aeruginosa* y seleccionar colonias incapaces de producir tensoactivos.
- 4) Elaborar una librería genómica de *P. aeruginosa* en el cósmido pCP13.
- 5) Complementar a la cepa mutada para la síntesis de ramnolípidos con la librería genómica previamente fabricada.
- 6) Caracterización de la mutante.

## Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant

Marina Wild <sup>a</sup>, Alma Delia Caro <sup>a</sup>, Ana Lilia Hernández <sup>a</sup>, Raina M. Miller <sup>b</sup>,  
Gloria Soberón-Chávez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México, México

<sup>b</sup> Department of Soil and Water Science, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA

Received 14 May 1997; accepted 20 May 1997

### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* produces rhamnolipids which are tenso-active compounds with potential industrial and environmental applications. There are two main types of rhamnolipids produced in liquid cultures, rhamnopyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate (mono-rhamnolipid) and rhamnopyl-rhamnopyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate (di-rhamnolipid). In this work we report the selective isolation of a rhamnolipid deficient mutant (IBT8), which does not accumulate mono-rhamnolipid while still producing di-rhamnolipid. IBT8 was selected after random mutagenesis with Tn501; yet, its mono-rhamnolipid deficiency was found associated neither with its Tn501 insertion nor with a possible alteration in the *rhlABR1* genes for rhamnopyl-transferase 1 synthesis. Different possibilities to explain IBT8 phenotype are discussed.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; Rhamnolipid; *rhl* gene

### 1. Introduction

Rhamnolipids are compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* which reduce water surface tension and emulsify oil. These compounds are biodegradable and have potential industrial and environmental applications [1-4]. Recently rhamnolipids have been found to have important antagonistic effects on economically important zoosporic plant pathogens, thus opening their use as biocontrol agents [5].

The rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* in

liquid cultures are mainly rhamnopyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate (mono-rhamnolipid) and rhamnopyl-rhamnopyl- $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate (di-rhamnolipid). Rhamnolipid biosynthesis was first described by Burger et al. in 1963 [6] as a series of rhamnose transfers from TDP-rhamnose to  $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoate. The enzyme rhamnopyl-transferase 1 (Rt 1) catalyzes the synthesis of mono-rhamnolipids while rhamnopyl-transferase 2 (Rt 2) synthesizes di-rhamnolipid from TDP-rhamnose and mono-rhamnolipid.

Genes coding for biosynthesis, regulation and induction of Rt 1 enzyme are organized in tandem in the *rhlABR1* gene cluster around minute 38 of the *P. aeruginosa* chromosome [7]. Mutations in any of

\* Corresponding author. Tel.: +52 (73) 291634; Fax: +52 (73) 172388; E-mail: gloria@ibt.unam.mx

Table 1  
Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics*	Reference
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
29-1	PAO1 mutant, <i>met-9020 catA1 pxaA1 lip1</i>	[7]
IBT8	29-1::Tn301 mono-rhamnolipid deficient mutant	This work
29-2	29-1 <i>Str'</i> spontaneous mutant	This work
ATCC 9027	Wild-type strain produces only mono-rhamnolipid	[2]
<i>Escherichia coli</i>		
UW937	<i>thr-1, leu-5, thi-1, lacY-1, supE44, tonA21, λ<sup>-</sup>, gyrA</i>	[9]
Plasmids		
pUW942	RP4-ColE1 <i>Tra<sup>+</sup>, Tc<sup>r</sup>, Hg<sup>r</sup></i>	[9]
pUC58	Contains the <i>rhlABRI</i> genes, <i>Ap<sup>r</sup></i>	[6]
pJB311	RM derivative, <i>CMA, Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup></i>	[18]
pN12198	Cosmid clone with <i>P. aeruginosa</i> DNA	This work

\* Abbreviations used: Resistance to: ampicillin (*Ap<sup>r</sup>*), kanamycin (*Km<sup>r</sup>*), mercury (*Hg<sup>r</sup>*), streptomycin (*Str<sup>r</sup>*) and tetracycline (*Tc<sup>r</sup>*). Self transmissible (*Tra<sup>+</sup>*), promotes chromosome mobilization (*CMA*).

these *rhl* genes cause a rhamnolipid minus phenotype which indicates that mono-rhamnolipid is an obligate precursor of di-rhamnolipid. The genes encoding Rt 2 are yet to be described.

In this study we report the selection and characterization of a rhamnolipid deficient mutant (IBT8) which was derived from a *P. aeruginosa* PAO1 derivative (strain 29-1 [8], Table 1). This mutant is deficient in the production of mono-rhamnolipid, but is still able to produce di-rhamnolipid. We also report that the gene affected in mutant IBT8 is different from the previously described *rhlABRI* genes involved in Rt 1 enzyme biosynthesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microbiological procedures

Strains and plasmids used in this work are shown in Table 1. *P. aeruginosa* strains were routinely grown at 29°C on one of the following media: Pseudomonas Isolation Agar (PIA, Difco), PPGAS [2] ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.02 M;  $\text{KCl}$  0.02 M;  $\text{Tris-HCl}$  0.12 M;  $\text{MgSO}_4$  0.0016 M; glucose 0.5%; peptone 1%, adjusted to pH 7.2) or PFSW (PPGAS medium supplemented with 2.5 µg/ml of methylene blue and 200 µg/ml of the surfactant cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB)). Antibiotic and mercury concentra-

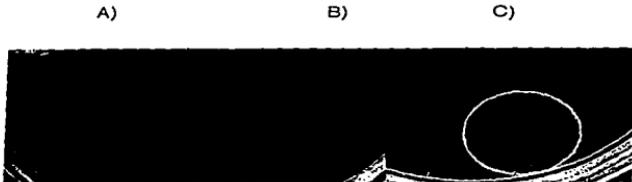


Fig. 1. Halo formation in PPSW plates associated with rhamnolipid production. A: Strain 29-1, B: mutant IBT8, and C: purified rhamnolipids from strain 29-1.

Table 2  
Production of rhamnolipids and interfacial tension of culture supernatants of different *P. aeruginosa* strains

Strain	Rhamnolipids(mg rH/mg protein)	Interfacial tension(din/cm)
– (broth)	–	19.82
29-1	1.63	2.09
IBTS	0.18	11.85
IBTS(pUO58)	0.56	2.09
IBTS(pN12198)	1.81	1.99

tions ( $\mu\text{g/ml}$ ) used for *P. aeruginosa* and *Escherichia coli*, respectively, were: carbenicillin (Cb) 300 and 30, mercury (Hg) 10 and 10, streptomycin (Str) 200 and 200, and tetracycline (Tc) 150 and 30. Transformation of *P. aeruginosa* was done as described by Olsen et al. [9]. Matings were performed mixing a 1:1 proportion of donor:recipient strains and incubating them overnight at 29°C onto agar LB medium. Appropriate dilutions were made on selective media in order to isolate transconjugants. Controls of individual donor and recipient strains were treated similarly to the mixture. Mutagenesis with the transposon Tn501 was carried out by selecting Hfr transconjugants on PIA medium from the cross between *E. coli* UJW937(pUW942) [10] and *P. aeruginosa* 29-1. Rhamnolipid deficient mutants were selected on PPSW medium by lack of halo formation.

## 2.2. Rhamnolipid determination

Culture supernatants of 96 h PPGAS cultures at 29°C and shaken at 250 rpm were used for all rhamnolipid determinations. Total rhamnolipid concentration was determined from cell culture supernatants by measuring rhamnose concentration after acid hydrolysis using the orcinol method [11]. Interfacial tension between water and hexadecane was determined by the 'drop weight' method [12]. Thin layer chromatography (TLC) was carried out on silica gel G plates treated as indicated by Matsuyama et al. [13], rhamnolipids being revealed with a 25 mg/ml solution of  $\alpha$ -naphthol. The samples for TLC were prepared by extracting 333  $\mu\text{l}$  of culture supernatant twice with two volumes of diethyl ether and suspending in 10  $\mu\text{l}$  of water. Unrevealed upper spots were scratched off from a parallel untreated TLC plate and were extracted twice with diethyl ether, suspended in 1 ml of phosphate buffer and analyzed

by high performance liquid chromatography (HPLC). A reverse phase nova-pack C18 3.9  $\mu\text{m}$  150 mm column was used. HPLC analysis was isocratic using 40% acetonitrile and 60% 0.1 M phosphate buffer pH 6 with a flow rate of 1 ml/min.

## 2.3. Construction of the genomic library

Total genomic DNA from *P. aeruginosa* IGB83 [14] was partially digested with *Sau3A* and ligated to cosmid pCPI3 [15] digested with *Bam*HI endonuclease. Cosmids were packaged onto  $\lambda$  heads and transfected as described previously [16]. About 5000 clones were obtained, which represent at least 10 times the size of the bacterial genome.

## 2.4. Nucleic acid procedures

DNA isolation and cloning, Southern blotting and nick translation procedures were carried out as described previously [16].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Detection of rhamnolipid production on plates

SW medium was originally developed for the selection of *P. aeruginosa* rhamnolipid deficient mutants on plates [17]. It contains the cationic dye methylene blue which complexes with the slightly anionic rhamnolipid molecules in the presence of the surfactant CTAB. This complex is visualized in the form of a blue precipitate surrounding the rhamnolipid producing colonies. However, in our experiments, *P. aeruginosa* colonies formed a blue pigment which interfered with the blue precipitate formed by rhamnolipids in SW medium. Therefore, we devel-

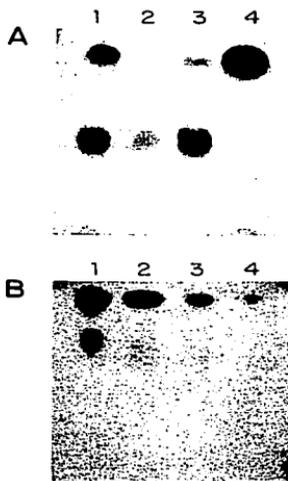


Fig. 2. Detection of rhamnolipids in TLC plates. A: Lanes correspond to: 1: strain 29-1, 2: mutant IBT8, 3: mutant IBT8(pUOS8), and 4: strain ATCC 9027. B: Different dilutions of the rhamnolipids produced by strain 29-1, lanes correspond to: 1: undiluted, 2: 1:2, 3: 1:4, and 4: 1:10.

oped a slightly different medium for enhanced visualization of precipitated rhamnolipids. In this medium CTAB and Congo red or methylene blue were combined with PPGAS, a phosphate-limited medium used for rhamnolipid production. Using these media it was found that a halo was formed around the *P. aeruginosa* colonies that produce rhamnolipids or around the purified rhamnolipids themselves (Fig. 1). A comparison of methylene blue and Congo red showed the former to be slightly better.

The lack of halo formation on plates of PPGAS supplemented with methylene blue and CTAB (PPSW medium) was used as a criterion to select rhamnolipid deficient mutants after Tn501 mutagenesis. One thousand 29-1::Tn501 insertion mutants were screened on PPSW medium and one colony devoid of a halo (IBT8) was further characterized (Fig. 1).

### 3.2. Rhamnolipids production by IBT8

Total rhamnolipid production by mutant IBT8 was nearly 10-fold lower than that of its parental strain 29-1 (Table 2). Lower interfacial tension values confirmed that rhamnolipids were still present in the IBT8 culture supernatant, but in less quantity (Table 2). Interestingly TLC analysis of an IBT8 supernatant showed that the IBT8 di-rhamnolipid spot remained visible while the mono-rhamnolipid species could not be detected (Fig. 2A). As control we used purified rhamnolipids from the culture supernatants of strain 29-1 (wild-type) and strain ATCC 9027 which accumulates only mono-rhamnolipid [2]. In order to rule out that the lack of mono-rhamnolipid detection in mutant IBT8 was due to a problem of TLC sensibility, we ran different dilutions of the rhamnolipids produced by strain 29-1. We found that in all the dilutions where di-rhamnolipid was detected in the 29-1 supernatant, the spot corresponding to the mono-rhamnolipid was clearly visible (Fig. 2B). The 1:10 dilution of the 29-1 supernatant approximately corresponds to the rhamnolipid concentration produced by mutant IBT8, in this condition the mono-rhamnolipid spot is apparent, but the di-rhamnolipid spot is hardly seen (Fig. 2B, lane 4). We cannot rule out that small amounts of mono-rhamnolipid are still produced by mutant IBT8, but it is clear that this mutant produces a considerable decreased ratio of the mono- to the di-rhamnolipid species than the wild-type strain.

Identification of the upper migrating band of the parental strain supernatant as mono-rhamnolipid (the one lacking in IBT8 supernatant), was confirmed by its similar HPLC elution profile to that of strain ATCC 9027 supernatant (Fig. 3), previously characterized as authentic mono-rhamnolipid by mass spectroscopy [3].

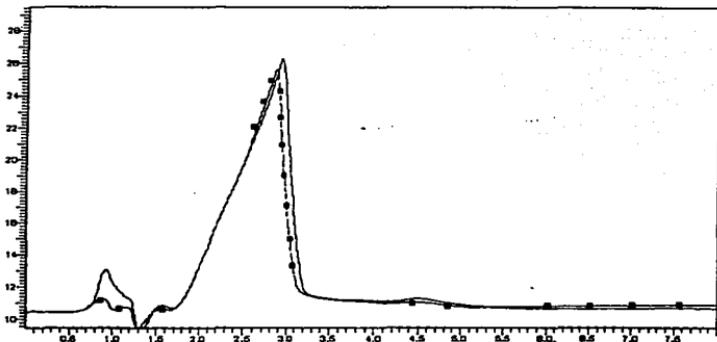


Fig. 3. HPLC elution profiles of purified mono-rhamnolipid from *P. aeruginosa* strains ATCC 9027 O and 29-1 O.

### 3.3. The mutation in *IBT8* does not affect the *rhLABRI* genes

Transcomplementation of *IBT8* mono-rhamnolipid deficiency by the *rhLABRI* genes was undertaken by transferring plasmid pUO58 into *IBT8* [7] (Table 1); only partial complementation was apparent when rhamnolipids were measured (Table 2, Fig. 2), but halo formation was not restored (data not shown). The lack of halo formation by strain *IBT8*(pUO58) might be due to a lower sensitivity of this test for rhamnolipid detection than that of the orcinol method. These results suggested that the mutation present in strain *IBT8* was not due to a mutation in the *rhI* genes encoded by plasmid pUO58. This was the expected result since mutations in any of the *rhI* gene clusters completely abrogate the synthesis of both rhamnolipid species [7].

A cosmid clone (pNH2198) which fully complemented mutant *IBT8* for rhamnolipid production was selected from a *P. aeruginosa* IGB83 [14] genomic library by selecting the restoration of halo formation in PFSW medium. The Southern blot ex-

periment shown in Fig. 4 shows that plasmid pNH2198 does not hybridize with the *rhLABRI* genes and that mutant *IBT8* and its parental strain 29-1 have the same pattern of hybridization with them. These results confirmed that the mutation in *IBT8* is not within the *rhLABRI* genes. The gene encoded by plasmid pNH2198 which complements mutant *IBT8*, and is the presumably mutated gene in *IBT8* strain, is currently being characterized.

### 3.4. The mutation in *IBT8* strain is not caused by the *Tn501* insertion

In order to determine whether the *Tn501* insertion in mutant *IBT8* was causing its mono-rhamnolipid deficiency, the linkage between  $Hg^r$  encoded by the transposon and rhamnolipid deficiency was determined.  $Hg^r$  was mobilized from mutant *IBT8* to a 29-1 *Str^r* spontaneous mutant (29-2, Table 1) using plasmid pJB3J1 which has chromosome mobilization ability [18]. The frequency of  $Hg^r$  transconjugants from this cross was at least one order of magnitude higher than the transposition frequency of *Tn501* in

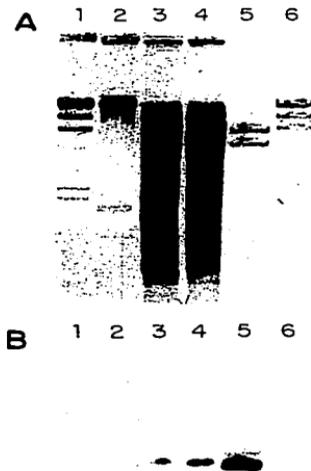


Fig. 4. Southern blot analysis using plasmid pUO58 as probe. A: Electrophoretic profile of DNAs restricted with different endonucleases. B: Hybridization of these DNAs with plasmid pUO58 used as probe. Lanes correspond to: 1 and 6: phage  $\lambda$  DNA restricted with *Hind*III endonuclease, 2: plasmid pNH2198 DNA restricted with *Pst*I endonuclease, 3: total genomic DNA of mutant IBT8 restricted with *Pst*I enzyme, 4: total genomic DNA of strain 29-1 restricted with *Pst*I enzyme, 5: plasmid pUO58 restricted with *Eco*RI and *Hind*III enzymes.

strain 29-1, thus secondary events of transposition were discarded as being the primary event for the incorporation of the transposon into strain 29-2. Thirteen 29-2 Hg<sup>r</sup> transconjugants were selected, but none inherited rhamnolipid deficiency. According to the transposition and the recombination frequencies mentioned above, only one to three of these transconjugants could represent new Tn501 transposition events. This experiment strongly suggests the presence in strain IBT8 of a second mutation, independent of the Tn501 insertion, that affects mono-rhamnolipid accumulation.

This is the first report of a *P. aeruginosa* mutant affected in the production of mono-rhamnolipid while still presenting di-rhamnolipid production. This could be explained by: (1) degradation of the former, and (2) expression of a second metabolic route from substrates other than mono-rhamnolipid. The first alternative would imply synthesis of mono-rhamnolipid from the expression of the *rHAMRI* gene cluster, its flow to di-rhamnolipid via the Rt 2 pathway and degradation of surplus amounts of mono-rhamnolipids. The second alternative implies both the silencing of an intact *rHAMRI* gene cluster and the onset of an alternative pathway, whatever its nature. Partial complementation of IBT8 by pUO58 with regard to mono-rhamnolipid accumulation could be interpreted by either positive (as in alternative 1) or negative (as in alternative 2) regulation and thus, does not throw any light as to which of the two alternatives is correct. Only further work along these lines, now in progress, will aid to solve this issue.

#### Acknowledgments

We greatly acknowledge the support of Urs A. Ochsner during the development of this research. We thank Rebeca Najera for her technical assistance and Fernando Bastarachea for his critical reading of the manuscript. This research was founded in part by the United States-Mexico Foundation for Science, Grant 57-CH197, and by the National Institute of Environmental Health Sciences, Grant P42 ES04940.

## References

- [1] Müller, R.M. (1995) Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl.), 59-62.
- [2] Zhang, Y. and Müller, R.M. (1992) Enhancement of octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3276-3282.
- [3] Zhang, Y. and Müller, R.M. (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2101-2108.
- [4] Koch, A.K., Käppeli, O., Fischer, A. and Reiser, J. (1991) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173, 4212-4219.
- [5] Stanghellini, M.E. and Müller, R.M. (1997) Biosurfactants: their identity and potential efficiency in the biological control of zoospore plant pathogens. *Plant Dis.* 81, 4-12.
- [6] Burger, M.M., Glasser, L. and Burton, R.M. (1963) The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 238, 2595-2602.
- [7] Ochser, U.A., Fischer, A. and Reiser, J. (1994) Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnopyl-transferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 19787-19795.
- [8] Wolfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. and Winkler, U.K. (1992) Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1325-1329.
- [9] Olsen, R.H., DeBuscher, G. and McCombie, W.R. (1982) Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* 150, 60-69.
- [10] Weiss, A.A. and Falkow, S. (1983) Transposon insertion and subsequent donor formation promoted by Tn501 in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* 153, 304-309.
- [11] Chandrasekaran, E.V. and Bemiller, J.N. (1980) Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* 8, 89-96.
- [12] Harkins and Alexander (1959) *Physical Methods of Organic Chemistry*, Vol. 1, Part 1, Weisberg, Interscience, New York.
- [13] Matsuyama, T., Sogawa, M. and Yano, I. (1987) Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1186-1188.
- [14] Palmeron, B., Clórcoca, L., Alagón, A. and Sobrón-Chávez, C. (1994) Biochemical characterization of the lipolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* IG83. *Process Biochem.* 29, 207-212.
- [15] Darzins, A. and Chakrabarty, A.M. (1984) Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 159, 9-18.
- [16] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [17] Siegmund, I. and Wagner, F. (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotech. Technol.* 5, 265-268.
- [18] Brewin, N.J., Berger, J.E. and Johnston, A.W. (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 120, 413-420.

## MATERIAL Y METODOS ADICIONALES:

Tabla 2. Cepas y plásmidos adicionales utilizados en este trabajo

Cepa ó plásmido	Características relevantes	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
IGB83	cepa silvestre que produce mono y di-ramnolípidos	Palmeros B, <i>et al.</i> 1994
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>pro, leu, recA, hsdR, hsdM</i>	Darzins A, <i>et al.</i> 1984
Plásmidos		
pUO94	genes <i>rhlAB</i> en pVLT31 bajo el promotor <i>lac</i> . Tc <sup>r</sup>	Ochsner U, <i>et al.</i> 1994b
pRW58	gen <i>rhlR</i> en pUCP20, Ap <sup>r</sup>	este trabajo
pUCP20	derivado de pUCP18 Ap <sup>r</sup>	West S, <i>et al.</i> 1994
pCP13	3897 pb cósmido de 23 Kb derivado de pLAFRI Tc <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Darzins A, <i>et al.</i> 1984

**Cuantificación de proteína (Lowry).** Esta determinación es necesaria para calcular los miligramos de ramnolípidos que se producen por miligramo de proteína celular.

## RESULTADOS ADICIONALES:

### Construcción de una librería genómica de *P. aeruginosa*.

Se elaboró una librería genómica de la cepa IGB83 en el cósmido pCP13. Después de purificar el ADN total de la cepa de *P. aeruginosa* IGB83 se digirió parcialmente con la enzima *Sau3A*. Para esto se hicieron preparaciones de digestión del ADN con diferentes diluciones de la enzima. La reacción se incubó a 37°C, 15 min. y se detuvo a 65°C, 10 min. Se escogieron los fragmentos de entre 10 y 20 Kb de las preparaciones con enzima diluída 1:8 y 1:16 (Fig. 12-A). El cósmido pCP13 (Darzins, A. *et al* 1984) se digirió con endonucleasa *Bam*HI. Usando una proporción 1:1 de vector:inserto se ligó 1 $\mu$ g de ADN usando Ligasa T4 en un volumen final de 20  $\mu$ l. Antes de agregar la ligasa y el buffer de la enzima, se incubó el ADN en esta secuencia: 5 min. a 65 °C, 10 min. a temperatura ambiente y 15 min. a 4 °C. Después de agregar el buffer se incubó 15 min. a 4 °C para finalmente agregar la enzima e incubar la reacción 1 hr. a 12 °C. Se dejó la reacción el fin de semana a 4 °C. El ADN así ligado se empacó *in vitro* en fagos lambda usando extractos de empacamiento Amersham siguiendo sus instrucciones. El ADN recombinante empacado *in vitro* en cabezas de fago lambda se usó para infectar *E. coli* HB101 como se describe en Maniatis, T. 1982. Se seleccionaron colonias en LB Tetraciclina 10  $\mu$ g/ml de las que se escogieron 10 colonias al azar para analizar. Se les purificó ADN plasmídico y se trató con endonucleasa *Bam*HI para liberar los insertos (Fig. 12-B). Este banco se construyó con la asesoría del Dr. Jaime Martínez Salazar.

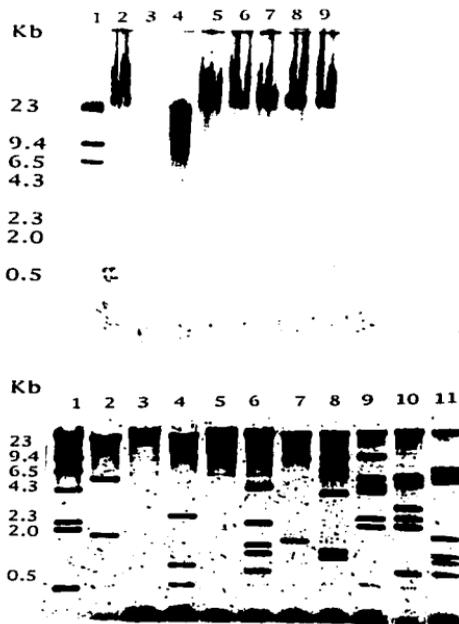


Fig. 12 a) Carril 1: marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III, carril 2: ADN de la cepa de *P. aeruginosa* IGB 83 sin digerir, carriles 3-9: mismo ADN digerido con endonucleasa *Sau*3A diluida 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256 respectivamente. b) carril 1: marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III, otros carriles: cósmidos de la librería genómica de esta cepa digeridos con endonucleasa *Bam*HI con insertos de entre 10 y 20 Kb aproximadamente. Las bandas de 23 y 0.5 Kb corresponden al cósmido pCP13.

### **El gen *rhlR* complementa parcialmente a IBT8**

Para determinar la parte del cluster *rhlABRI* capaz de complementar parcialmente a IBT8 se probó complementarla con los genes *rhlAB* y *rhlR* contenidos en los plásmidos pUO94 (Fig. 13) y pRW58 (Fig. 14) respectivamente. El plásmido pUO94, proporcionado por Urs Ochsner, contiene a los genes *rhlAB* en un fragmento *AclI-HindIII* de 3.1 Kb bajo el promotor inducible *tac* en el plásmido pVLT31. En esta construcción, la transcripción de los genes *rhlAB* no depende de la regulación positiva de la proteína RhlR sino de la inducción del promotor *tac* con IPTG. El plásmido pUO94 se movilizó por conjugación a la cepa IBT8. Al inducirse la expresión de los genes *rhlAB* con IPTG 3 mM, se observó que este plásmido era incapaz de restaurar la producción de ramnolípido (Tabla 3). Se construyó entonces el plásmido pRW58 que lleva al gen *rhlR* en un fragmento *PstI* de 2 Kb clonado en el sitio *PstI* del plásmido pUCP20 (West SEH, *etal* 1994) (Figs. 14 y 15). Mediante un experimento de transformación se transfirió el plásmido pRW58 a la mutante 8 y se determinó que el ramnolípido producido por esta cepa era el 24.5% del producido por la cepa silvestre 29-1.

Estos resultados indican que la complementación parcial en la cepa IBT8 está dada por la presencia del gen *rhlR*. Es decir, que la mutación en esta cepa debía estar dada en alguna función regulatoria que se complementa de una manera cruzada con la proteína RhlR para la biosíntesis de ramnolípido pues al hacer la expresión de los genes *rhlAB* independiente de ésta, la complementación no era posible. Sin embargo, para la formación de pigmento la proteína RhlR no tiene ningún efecto (Fig. 16).

Cepas	Tensión interfacial (mN/m)	mg ramnolípido/ mg de proteína	% ramnolípido
-- (medio)	19.828	0	0
29-1 (cepa silvestre)	2.096	1.628	100
IBT8	11.85	0.181	11.1
IBT8(pU058)	2.096	0.562	34.5
IBT8(pRW58)	11.85	0.399	24.5
IBT8(pU094)	17.19	0.114	7

Tabla 3. Producción de ramnolípidos por la cepa silvestre 29-1 y mutante 8 sin plásmidos y complementada con los plásmidos pU058 (*rhlABR*), pRW58 (*rhlR*) y pU094 (*rhlAB* bajo el promotor inducible *tac*) al cultivarse en medio PPGAS líquido.

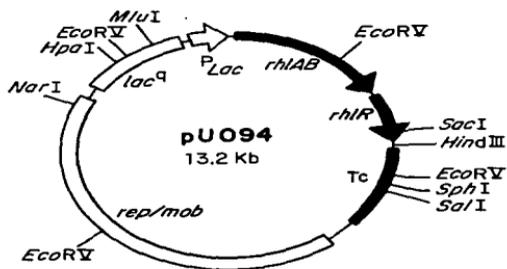


Fig. 13 Plásmido pUO94 movlizado a la cepa IBTS para pruebas de complementación con operón *rhIAB* (tomado de Ochsner U, *et al.* 1994b).

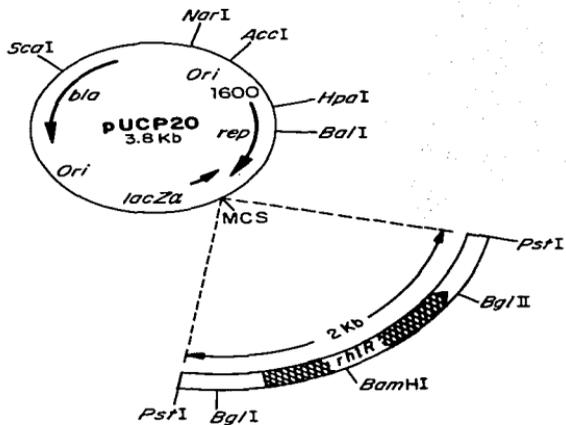


Fig. 14 Plásmido pRW58 de aproximadamente 5.8 Kb que contiene un fragmento *Pst*I de 2 Kb que incluye al gen *rhlR* de *P. aeruginosa* en el plásmido pUCP20.

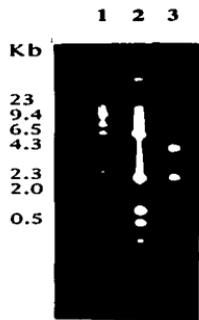
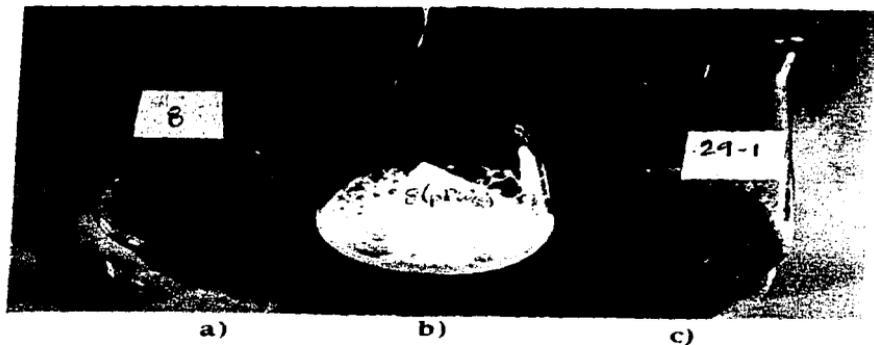


Fig. 15 Electroforesis en gel de agarosa del ADN de plásmidos digeridos con el enzima *Pst*I. Carril 1: 1 *Hind*III; 2: pUO58; 3: pRW58



**Fig. 16 Cultivos de *P. aeruginosa* en medio PPGAS a) IBT8, b) IBT8(pRW58) y c) 29-1. La cepa 29-1 forma un pigmento azul que no se forma en la mutante IBT8 ni en la mutante con el plásmido pRW58.**

**El gen afectado en IBT8 podría estar involucrado en la regulación de la disponibilidad ó síntesis de TDP-ramnosa.**

Entre los factores que pueden afectar la capacidad de producir ramnolípidos en una bacteria se encuentran tanto de las enzimas ramnosil transferasas como de la disponibilidad de los precursores TDP-ramnosa y  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato. Como la mutante IBT8 no parece estar dada en los genes para la biosíntesis ni regulación directa de la ramnosil transferasa 1, se pensó entonces en una mutación que limitara la disponibilidad ó síntesis del precursor TDP-ramnosa. De esta forma la síntesis de otros compuestos que usaran este mismo precursor también estaría afectada.

Los lipopolisacáridos (LPS) de membrana externa de *P. aeruginosa* contienen en su estructura a los antígenos común (banda A) y O (banda A+B). El antígeno común es conservado en *P. aeruginosa* y está compuesto principalmente de D-ramnosa. El antígeno O es un determinante específico de serotipo cuyo precursor para su síntesis al igual que para el antígeno común, es la TDP-ramnosa. En colaboración con la Dra. Joanna Goldberg de la Universidad de Harvard se determinó que la mutante IBT8 no forma el antígeno común ni la banda B de cadena larga que forma la silvestre 29-1 (Tabla 4). En IBT8 se forma solamente la banda B corta y en menor cantidad. Experimentos de complementación de la cepa IBT8 con el plásmido pUO58 que lleva los genes *rhlABRI* demostraron que este plásmido restaura la síntesis de la banda B de cadena larga. Sin embargo, no complementa para el antígeno común del LPS de la cepa silvestre (Tabla 4).

Estas observaciones sugieren que la proteína RhlR podría estar involucrada no sólo en la regulación de los genes *rhlAB*, sino también en la regulación a un nivel anterior del metabolismo celular como podría ser la regulación de la disponibilidad ó síntesis del precursor TDP-ramnosa.

Tabla 4. Estructura del lipopolisacárido de cepas de *P. aeruginosa*. Antígenos específicos determinados usando anticuerpos monoclonales en experimentos tipo Western.

Cepa	Antígeno común (Banda A)	Banda B
29-1	+++	++ (largo)
8	-	+ (corto)
8 pUO58	-	++ (largo)

## DISCUSION

Este es el primer reporte de una mutante de *P. aeruginosa* afectada en la producción de mono-ramnolípido y que produce di-ramnolípido. De hecho es el primer reporte de una cepa que sólo sintetice di-ramnolípido. En la mutante IBT8 la pregunta que intriga es cómo puede sintetizarse un producto final en ausencia de su precursor. Surgen entonces tres hipótesis:

**Hipótesis 1)** Según el modelo propuesto por Burger en 1963, el mono-ramnolípido en IBT8 se sintetiza a partir de la expresión del grupo de genes *rhlABRI* y fluye hacia la síntesis de di-ramnolípido por la vía de la Rt2 (Fig. 8). Esta explicación implicaría algún mecanismo de degradación para los mono-ramnolípido. La mutación en IBT8 estaría dada en un gen que participara en la regulación negativa de una enzima degradadora de mono-ramnolípido. Para demostrar la existencia de una enzima degradadora de mono-ramnolípido sería necesaria la medición de esta actividad cuantificando en el espectrofotómetro la proporción de ramnosa libre antes y después de la acción de la enzima.

**Hipótesis 2)** En IBT8 existe una vía metabólica alternativa para sintetizar di-ramnolípido. Éstos no se sintetizan a partir de mono-ramnolípido sino a partir de moléculas de TDP-di-ramnosa y  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato. La reacción estaría catalizada por una di-ramnosil transferasa regulada negativamente en la cepa silvestre. La mutación en IBT8 suprimiría esa regulación negativa resultando en la expresión de la di-ramnosil transferasa. Al mismo tiempo, la mutación en IBT8 implicaría el silenciamiento del cluster *rhlABRI* intacto. Para demostrar la existencia de esta ruta alternativa de biosíntesis de ramnolípido sería necesaria la purificación y medición de actividad de la di-ramnosil transferasa en cuestión, a partir de precursores radiactivos.

**Hipótesis 3)** Para poder plantear la tercera hipótesis es necesario conjuntar algunas evidencias que se describen a continuación:

### Evidencia 1:

Los datos en la última parte de esta tesis en cuanto a la complementación de la mutante IBT8 en la síntesis de la banda B de cadena larga por los genes *rhlABRI*. Estos datos llevan a proponer un papel regulatorio del gen *rhlR* no sólo para los genes *rhlAB* sino también para los genes biosintéticos de la TDP-L-ramnosa.

#### Evidencia 2:

Para poder establecer un papel regulatorio de la proteína RhlR sobre los genes biosintéticos de la TDP-L-ramnosa, se utilizó a la mutante 65E12 de *P. aeruginosa* afectada en el gen *rhlR*, que no produce ramnolípidos. (Koch A, *et al.* 1991). En experimentos recientes Clarita Olvera midió la actividad enzimática del producto del gen *rfbB* (TDP-glucosa 4,6 deshidratasa; ver biosíntesis de precursores) en la 65E12. Encontró que la actividad de esta deshidratasa se encuentra abatida en un 95% con respecto a la de la cepa silvestre PG201. Estos datos sugieren que en la cepa 65E12 el producto del gen *rhlR* está también involucrado directa ó indirectamente en la disponibilidad de TDP-L-ramnosa.

#### Evidencia 3:

La actividad del producto del gen *rfbB* también se midió en la mutante IBT8. Aquí la actividad de esta deshidratasa se abate en un 40% con respecto a la de la cepa 29-1. Estos datos sugieren que la disponibilidad de TDP-L-ramnosa en IBT8 es cuatro veces mayor que en la 65E12 y que esa diferencia haga de alguna manera posible la síntesis de di-ramnolípidos en IBT8.

Se propone entonces que mientras la 65E12 tiene afectado el gen *rhlR*, IBT8 está afectada en un regulador anterior (gen *rhlX*) que regula positivamente al regulador *rhlR* (Fig. 17). En ambos casos la ramnosil transferasa 1 (Rt1) no se está expresando. Sin embargo la ramnosil transferasa 2 (Rt2) para la síntesis de di-ramnolípidos se expresa y es funcional para las dos mutantes. La enzima Rt2 podría tener una actividad residual de Rt1. Es decir, podría tener una capacidad limitada para unir TDP-L-ramnosa a cadenas de ácido graso (además de su actividad establecida de añadir TDP-L-ramnosa a moléculas de mono-ramnolípidos). De esta forma en la mutante IBT8 se podrían utilizar las moléculas disponibles de TDP-L-ramnosa como sustrato para sintetizar pequeñas cantidades de di-ramnolípidos (Fig. 17). En la mutante 65E12 sin embargo, se detiene por completo la síntesis de ramnolípidos al estar casi totalmente abatida la síntesis de TDP-L-ramnosa. Si así fuera, entonces se podría inducir la síntesis de pequeñas cantidades de di-ramnolípidos en la 65E12 al proporcionarle una fuente de TDP-L-ramnosa.

Los genes *rfbABCD* para la síntesis de TDP-L-ramnosa podrían estar sujetos a una transcripción basal durante el crecimiento logarítmico. Al llegar a la fase estacionaria del crecimiento, la proteína RhlR podría regular positivamente la transcripción de los genes *rfb* para aumentar la cantidad intracelular de TDP-L-ramnosa. La proteína RhlR forma entonces un complejo con el autoinductor para regular positivamente a los genes

*rhlABRI* para la síntesis de ramnolípidos. Para poder estudiar la regulación que ejerce la proteína RhlR sobre los genes biosintéticos de la TDP-L-ramnosa sería necesario primero clonar los genes *rfbABCD* en *P. aeruginosa* para luego ver su expresión en ausencia y presencia de RhlR.

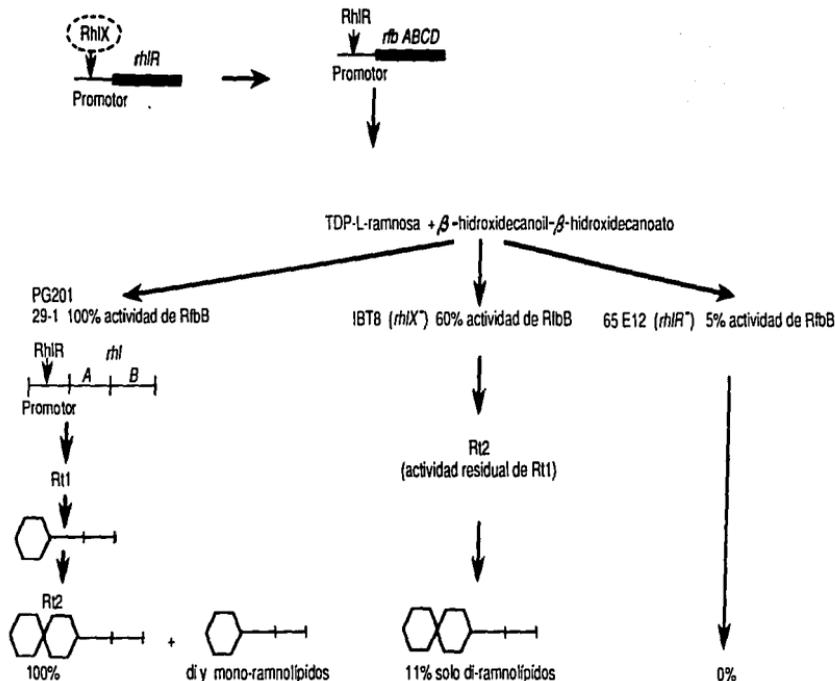


Fig. 17 Diagrama que ilustra una hipótesis para explicar el fenotipo de la mutante IBT8. El producto del gen *rhlX* afectado en IBT8, regula positivamente al gen *rhlR*. Durante la fase estacionaria del crecimiento la proteína *RhIR* participa tanto en la regulación de la síntesis de TDP-L-ramnosa como en la de Rhamnolisil transferasa I.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Aunque originalmente este trabajo surgió ante la inquietud de contribuir a la solución de un problema de producción de tensoactivos mediante la manipulación genética de bacterias, la contribución en ese sentido es más directa en el trabajo doctoral de Urs Ochsner al describir los genes biosintéticos y un gen regulador que participa directamente en esta biosíntesis. Sin embargo, la información recabada en esta tesis sugiere que en la regulación de la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* participan genes aún sin describir, como los contenidos en el plásmido pNH2198 que complementa a la cepa IBT8 de *P. aeruginosa* tanto para la biosíntesis de ramnolípidos como para la síntesis de piocianina y para una proteasa que hidroliza caseína (G. Soberón, Fig. 18).

Para una producción industrial de metabolitos microbianos es necesario conocer los mecanismos de regulación de los microorganismos usados. El estudio de la regulación de la producción de ramnolípidos es entonces importante para lograr su sobreproducción. Para poder establecer la participación del gen afectado en la mutante IBT8 en esta regulación es necesaria una caracterización completa de la mutante IBT8 y del plásmido pNH2198 que la complementa. Esta información permitiría además establecer si la regulación de la biosíntesis de ramnolípidos está sobrelapada con la regulación de la síntesis de otros metabolitos secundarios como son los factores de virulencia. Actualmente, Rafael Díaz en su proyecto de maestría, trabaja con la supuesta región regulatoria contenida en el plásmido pNH2198 para tratar de establecer pasos en común entre la regulación de la biosíntesis de ramnolípidos y la de la síntesis de factores de virulencia como el alginato. Estos estudios serían también de interés clínico.

Para tratar de resolver la pregunta de cómo puede sintetizarse un producto final (di-ramnolípidos) en ausencia de su precursor (mono-ramnolípidos) se propusieron tres hipótesis con experimentos para demostrarlas. Sin embargo, al considerar las dos primeras hipótesis de que exista una enzima degradadora de mono-ramnolípidos ó una ruta alternativa de biosíntesis de di-ramnolípidos podría parecer energeticamente poco favorable dado que se trata de metabolitos secundarios en donde no se justificaría la síntesis de dos enzimas que no sean esenciales para el metabolismo celular.

Las perspectivas que puede ofrecer el presente trabajo dadas las evidencias mencionadas, irían más bien en el sentido de estudiar la tercera hipótesis y sus implicaciones tanto para regulación sincronizada ó secuencial de otros

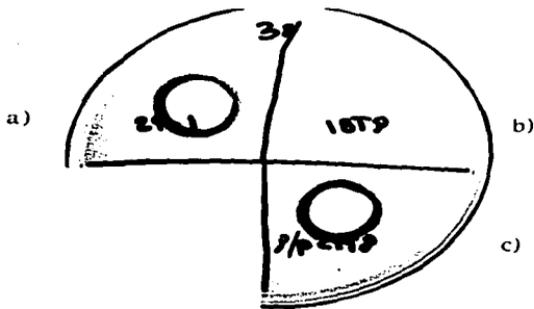


Fig. 18 Cepas de *P. aeruginosa* cultivadas en medio Luria suplementado con leche descremada al 2% donde se observa la formación de halos producto de una proteasa que hidroliza caseína, a) cepa silvestre 29-1 b) mutante IBT8 y c) IBT8pNH2198. La producción de la proteasa afectada en la mutante IBT8 se complementa en presencia del plásmido pNH2198.

metabolitos secundarios ó factores de virulencia, como para esclarecer la participación de la proteína RhIR en la síntesis de TDP-L-ramnosa.

## REFERENCIAS:

- Ainsworth S. Nov.26, 1990. Move to natural cosmetics challenges ingredient suppliers. Chem. Eng. pp 25-48.
- Banerjee S. 1991. Biosurfactant for desludging crude/fuel oil storage tank. Chem. Ind. Digest. 4th quarter '91 (December).
- Boulton C. Ratledge C. 1987. Biosynthesis of lipid precursors to surfactant production. p 47-87. In Kosaric N, Cairns W, Gray N. (ed.) Biosurfactants and Biotechnology. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Brint J, Ohman D. 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII; another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. J. Bacteriol. 177:7155-7163.
- Burger M, Glaser L, Burton RM. 1963. The enzymatic synthesis of rhamnose containing glycolipid by extracts of *P. aeruginosa*. J. Biol. Chem. 238:2595-2602.
- Cain R. 1994. Biodegradation of detergents. Current Opinion in Biotechnology. 5:266-274.
- Chakrabarty A. 1985. Genetically-manipulated microorganisms and their products in the oil service industries. Trends Biotechnol. 3:32-38.
- Chakrabarty A. 1996. Microbial degradation of toxic chemicals: evolutionary insights and practical considerations. ASM News 62:130-137.
- Claiborne W, Winans S, Greenberg P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bact. 176:269-275.
- Darzens A, Chakrabarty AM. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 159:9-18.
- Desai J, Banat I. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:47-64.
- Glaser L, Kornfeld S. 1961. Formation of dTDP-L-rhamnose from dTDP-D-glucose. J. Biol. Chem. 236:302-306.

Guerra-Santos L, Kappeli O, Fiechter A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**:443-448.

Greck, B. 1991. Sales of detergents growing despite recession. Chem. Eng. News **69**:25-52.

Haferburg D, Hommel R, Claus R, Kleber H. 1986. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. p 53-93. In: Fiechter A. (ed.) Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Haumann, B. 1990. Personal care products now include biologically active cosmetics. Inform. **1**:506-516.

Hauser G, Karnovsky M. 1954. Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **68**:645.

Hauser G, Karnovsky M. 1957. Rhamnose and rhamnolipid biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. **224**:91-105

Hisatsuka K, Nakahara T, Yamada K. 1972. Protein-like activator for n-alkane oxidation by S7B1. Agr. Biol. Chem. **36**:1361.

Koch A, Kappeli O, Fiechter A, Reiser J. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J. Bacteriol. **173**:4212-4219.

Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the stationary activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. Mol. Microbiol. **21**:1137-1146.

Latifi A, Winson M, Foglino M, Bycroft B, Stewart G, Lazdunski A, Williams P. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol. Microbiol. **17**:333-343.

Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. 1982. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.

Matsuyama T, Sogawa M, Yano I. 1987. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1186-1188.

Miller R. 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspec.* **103**(Supl. 1):59-62.

Mulligan C, Mahmoudides G, Gibbs B. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* **12**:199-210.

Neugebauer J. 1988. A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry. Calbiochem Biochemicals Corporation. USA p64.

Ochsner U, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**:2044-2054

Ochsner U, Fiechter A, Reiser J. 1994b. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**:19787-19795.

Ochsner U, Reiser J. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:6424-6428.

Palmeros B, Güereca L, Alagón A, Soberón-Chávez G. 1994. Biochemical characterization of the lipolytic activity of *P. aeruginosa* IGB83. *Process Biochem.* **29**:207-212.

Pearson J, Passador L, Iglewski B, Greenberg E. 1995. A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*.. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:1490-1494.

Ramos J. 1990. Manipulación genética de *Pseudomonas*. En: *Microbiología 1990. Manuales universitarios*. (eds.) Casadesús J, Ruiz-Berraquero F. España.

Reiling H, Thuanei-Wyss U, Guerra-Santos L, Hirt R, Kappeli O, Fiechter A. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *P. aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 51:985-989.

Siegmund I, Wagner F. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotech. Technol. 5:265-268.

Stanghellini M, Miller R. 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficiency in the biological control of zoospore plant pathogens. Plant Dis. 81, 4-12.

Sydatk C, Wagner F. 1987. Production of biosurfactants. p 89-120. In Kosaric N, Cairns W, Gray N. (ed.) Biosurfactants and Biotechnology. Marcel Dekker, Inc., New York.

West S, Schweiser H, Dall C, Sample A, Runyen-Janecky L. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 128:81-86.

Zhang L, Al-Hendy A, Toivanen P, Skurnik M. 1993. Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. Mol. Microbiol. 9:309-321.

Zhang Y, Miller R. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol. 58:3276-3282.

**Esta Tesis Doctoral se llevó a cabo con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, del Sistema Nacional de Investigadores (Expediente No. 13186) y del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado. Tesis Doctorales. Proyecto No. 030397.**