



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Uso de proteínas líticas para facilitar la extracción del polihidroxibutirato (PHB)  
producido por *Azotobacter vinelandii***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
FERNANDO LOYOLA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMENEZ  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2022



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.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo tutoría del Dr. Daniel Genaro Segura González. Durante el desarrollo de este proyecto obtuve apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de becario 750530. Para la escritura de la tesis recibí apoyo por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) proyecto IG200219.

## **AGRADECIMIENTOS**

Siempre estaré profundamente agradecido con mi familia, especialmente con mis padres, Elvia y Rodrigo, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, y quienes siempre han hecho lo posible para que no nos falte nada. Con mi hermana Melani, mi compañera de conciertos. A Mali por siempre estar apoyándome y haciendo que todo sea más divertido, mi compañera de vida favorita. Este trabajo va dedicado para ustedes, los amo.

### **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Al Dr. Daniel Genaro Segura González por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de laboratorio y compartir su conocimiento en todo momento.

A la M. en C. Josefina Guzmán Aparicio por todo su apoyo en los experimentos y sus enseñanzas. A la Biol. María Soledad Moreno León por sus consejos y quien en todo momento estuvo dispuesta a ayudarme con el trabajo de laboratorio. Ambas fueron de gran ayuda para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Cinthia Núñez y a la Dra. Guadalupe Espín por todos sus consejos y observaciones en los seminarios de grupo.

A todo el laboratorio 6, en especial al grupo de los espines (a los actuales y quienes ya siguieron su camino) por hacer esta experiencia muy divertida y enriquecedora: Gaby, Jess, Thalía, Andy, Holjes, Leydi, Karen, Alan, Pablito, Juli, Chanty, Citlali, Victor, Leo, Mariana, Cristian, Ricardo, Marce, Frida, Marlen, Clau, Luisfe, José Luis Gama y Denisse García.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1. Generalidades de los polihidroxicanoatos .....	2
1.2. Los PHAs como sustitutos de los plásticos derivados del petróleo .....	3
1.3. El polihidroxibutirato (PHB) .....	4
1.4. Aplicaciones de los PHAs .....	6
1.5. <i>Azotobacter vinelandii</i> , una bacteria productora de PHB .....	6
1.6. Métodos de recuperación de los PHAs .....	8
2. ANTECEDENTES .....	10
2.1. Sistemas líticos como alternativas para mejorar la recuperación de los PHAs .....	10
2.2. Sistemas de lisis de bacteriófagos en hospederos Gram-negativos .....	10
2.3. El sistema holina-endolisina .....	11
2.4. Mecanismo de acción de la holina .....	13
2.5. Mecanismo de acción de la endolisina .....	15
2.6. Mecanismo de acción de las espaninas .....	17
2.7. Bacterias modificadas genéticamente para regular su autólisis .....	19
2.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> posee genes funcionales de tipo holina-endolisina .....	24
3. HIPÓTESIS .....	26
4. OBJETIVOS .....	26
4.1. General .....	26
4.2. Específicos .....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1. Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados .....	27
5.2. Condiciones de crecimiento .....	28
5.3. Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> .....	29
5.4. Transformación de células de <i>A. vinelandii</i> .....	30
5.5. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	30
5.6. Extracción de DNA plasmídico, técnica del perclorato .....	30
5.7. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	31
5.8. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	31
5.9. Extracción de RNA y PCR con transcriptasa inversa (rtPCR) .....	32
5.10. Digestiones de DNA con enzimas de restricción .....	33

5.11.	Reacciones de ligación.....	33
5.12.	Separación de fracciones celulares en gradientes discontinuos de densidad.....	33
5.13.	Cuantificación de proteína por el método de Lowry.....	34
5.14.	Cuantificación de PHB por el método Law & Splecky (1960).....	34
5.15.	Ensayo de viabilidad y estrés osmótico .....	35
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
6.1.	Construcción de <i>A. vinelandii</i> OPLYS, una cepa que expresa una endolisina .....	36
6.1.1.	La expresión simultánea de una endolisina y espaninas es letal en <i>E. coli</i> .....	40
6.2.	Construcción de <i>A. vinelandii</i> OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac, cepas que expresan una holina y una endolisina .....	42
6.3.	Inducción de una holina y una endolisina en las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac... ..	45
6.4.	Efecto de la endolisina en el crecimiento de la cepa OPLYS .....	49
6.5.	Producción de PHB en la cepa OPLYS .....	54
6.6.	Evaluación de la liberación de PHB en la cepa OPLYS .....	56
7.	CONCLUSIONES .....	61
8.	PERSPECTIVAS.....	61
	REFERENCIAS .....	62

<b>Figura 1.</b> Estructura general de los PHAs .....	2
<b>Figura 2.</b> Enzimas que sintetizan el PHB y sus genes en operón en <i>A. vinelandii</i> .....	4
<b>Figura 3.</b> Ruta de síntesis del PHB en <i>A. vinelandii</i> a partir de glucosa .....	5
<b>Figura 4.</b> Micrografía electrónica de transmisión de células de <i>A. vinelandii</i> .....	7
<b>Figura 5.</b> Micrografía electrónica de una célula vegetativa de <i>A. vinelandii</i> formando un quiste .....	8
<b>Figura 6.</b> Organización de los genes de lisis del bacteriófago $\lambda$ y del fago lamboide 21 .....	11
<b>Figura 7.</b> Modelos de lisis holina-endolisina canónico y pinholina-endolisina SAR.....	13
<b>Figura 8.</b> Estructura y función de la holina y pinholina.....	15
<b>Figura 9.</b> Tipos de actividades enzimáticas de la endolisina .....	16
<b>Figura 10.</b> Genes <i>Rz</i> y <i>Rz1</i> y el arreglo de las espaninas en la MI y ME .....	18
<b>Figura 11.</b> Espaninas en las vías de lisis canónico holina-endolisina y pinholina/endolisina SAR ....	19
<b>Figura 12.</b> Producción de PHB e inducción de lisis por agotamiento de sustrato .....	20
<b>Figura 13.</b> Separación de fracciones celulares en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa en cepas de <i>P. putida</i> .....	22
<b>Figura 14.</b> Mediciones de fluorescencia de pellets y sobrenadantes de células de <i>E. coli</i> .....	23
<b>Figura 15.</b> Visualización de la distribución de GFP en el pellet y en el sobrenadante después de la inducción de lisis con cloroformo 1% en las mismas cepas que en la Figura 14 .....	23
<b>Figura 16.</b> Organización génica de las piocinas tipo F y R y de los genes PA0614 y PA0629 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 .....	25
<b>Figura 17.</b> Electroforesis de DNA en gel de agarosa de los genes PA0614 y PA0629 de <i>P. aeruginosa</i> PA01 amplificados por PCR.....	36
<b>Figura 18.</b> Digestiones con BglII de los vectores pJET::holina, pJET::lys y pJET::lysGm .....	37
<b>Figura 19.</b> Construcción del plásmido pUMA::lysGmR2 .....	38
<b>Figura 20.</b> Gel de agarosa donde se muestra el fragmento liberado de 948 pb del vector pJETR2::lysGm de 3876 pb después de haberlo digerido con la enzima BglII .....	39
<b>Figura 21.</b> PCR y rtPCR de la cepa OPLYS .....	40
<b>Figura 22.</b> Genes <i>Rz</i> y <i>Rz1</i> en un gel de agarosa amplificados por PCR desde el fago $\lambda$ .....	41
<b>Figura 23.</b> Construcción del vector pUMATc::lysGm-RzRz1.....	41
<b>Figura 24.</b> Construcción de los plásmido pUC19::PA0614NS y pUC19::holina-endolisina .....	43
<b>Figura 25.</b> Electroforesis de DNA en gel de agarosa de los fragmentos resultantes de la digestión del pUC19::holina-endolisina con las enzimas KpnI y AgeI. ....	44
<b>Figura 26.</b> PCR de colonia de las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac.....	45

<b>Figura 27.</b> Cepas de <i>A. vinelandii</i> construidas en este trabajo. ....	45
<b>Figura 28.</b> Crecimiento y efecto de la inducción de la expresión de una holina y una endolisina en la cepa OPLYS/HOLSac.....	47
<b>Figura 29.</b> Crecimiento y efecto de la inducción de la expresión una endolisina en la cepa OPLYS/HOL .....	48
<b>Figura 30.</b> Fenotipos en BS y BG sólido de las cepas construidas en este trabajo.....	49
<b>Figura 31.</b> Curva de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> pUMATc::lysR2 .....	50
<b>Figura 32.</b> Efecto del cloroformo en el crecimiento de la cepa <i>A. vinelandii</i> OPLYS en medio BS ...	51
<b>Figura 33.</b> Crecimiento de la cepa <i>A. vinelandii</i> OPLYS en medio Burk acetato .....	52
<b>Figura 34.</b> Viabilidad de la cepa OPLYS versus OP después de un choque osmótico .....	53
<b>Figura 35.</b> Visualizaciones al microscopio de las cepas OPLYS y OP antes y después de un choque osmótico.....	54
<b>Figura 36.</b> Producción de PHB y peso seco de las cepas OP y OPLYS.....	56
<b>Figura 37.</b> Separación de fracciones celulares en un gradiente discontinuo de glicerol de las cepas OP y OPLYS .....	57
<b>Figura 38.</b> Imágenes de la interfase del gradiente de glicerol de las cepas OP y OPLYS .....	58



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades de los PHAs en comparación al polietileno y polipropileno.....	3
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de crecimiento y producción de PHA las cepas de <i>P. putida</i> KTHL y BXHL.....	21
<b>Tabla 3.</b> Bacterias modificadas genéticamente para promover su lisis celular. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Cepas bacterianas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados.....	27
<b>Tabla 5.</b> Reactivos utilizados para preparar los medios Burk Sacarosa (BS), Burk Glucosa (BG), Burk Acetato (BA) y CM .....	29
<b>Tabla 6.</b> Reactivos utilizados para medio Luria Bertani (LB).....	29

## RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros que tienen gran interés industrial dadas sus propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad, que los hace aplicables en la industria biomédica. Además, estos bioplásticos representan una opción de remplazo sostenible a los plásticos convencionales derivados de la industria petroquímica que generan gran cantidad de desechos y permanecen muchos años en el ambiente. Distintas bacterias, como *Azotobacter vinelandii*, son productoras de PHAs, almacenándolos como gránulos intracelulares que actúan como fuente de carbono para la célula. Los altos costos de producción de estos polímeros a una escala industrial se presentan como principal inconveniente. Esto es debido en parte a los complejos procesos a los que se someten las células para extraer los PHAs de su citoplasma. Incluso se llegan a utilizar solventes para su extracción, lo cual genera un fuerte impacto ambiental. Por ello, existe un interés en mejorar los procesos de extracción. Una alternativa es utilizar un sistema de autólisis por parte de la misma bacteria productora de PHA que le permita liberar al medio el polímero, sin la necesidad de someterla a otros procesos químicos o mecánicos, o que por lo menos, ayude a reducir estos pasos. Esto facilitaría la extracción de los PHAs y contribuiría a reducir los costos totales de producción. Los genes que codifican proteínas con actividad lítica sobre la pared celular pueden obtenerse de genomas virales o bacterianos y se han presentado como una buena opción para generar cepas bacterianas autolíticas. En este trabajo se probó el efecto de la expresión de dos proteínas de lisis derivadas de *P. aeruginosa*, y de dos proteínas con función de fusión de membranas provenientes del genoma del bacteriófago  $\lambda$  para facilitar la liberación al medio extracelular del PHB producido por *A. vinelandii*. Se encontró que la expresión simultánea de una holina y una endolisina en *A. vinelandii* genera cepas inestables en su crecimiento, y la combinación de una endolisina y las espaninas es letal en *Escherichia coli*. Sin embargo, al expresar solamente una proteína de tipo endolisina en *A. vinelandii* se obtuvieron resultados prometedores. La cepa OPLYS que expresa una endolisina de manera constitutiva mostró valores de crecimiento y de producción de PHB similares a la cepa silvestre. Su viabilidad solo se vio afectada cuando se usó algún agente permeabilizante externo o una condición de estrés osmótico. Además, un ensayo de ultracentrifugación en gradiente de glicerol y el análisis al microscopio nos indicaron que en esta cepa la combinación de la expresión de la endolisina más una condición externa que comprometa la estabilidad de la membrana celular, resulta en la liberación facilitada de los gránulos de PHB al medio.



con tejidos humanos no tienen efectos agudos o crónicos sobre la salud, pues son biocompatibles (Khanna & Srivastava, 2005).

## 1.2. Los PHAs como sustitutos de los plásticos derivados del petróleo

Los plásticos derivados del petróleo son materiales muy versátiles, pero tienen la gran desventaja de generar enormes cantidades de desechos que permanecen en el ambiente por muchos años. Debido a que estos plásticos son sintéticos, se dificulta su biodegradación en el ambiente, siendo su acumulación un problema actual para los ecosistemas acuáticos y terrestres por sus efectos nocivos en muchos organismos, incluyendo el humano (Raza *et al.*, 2018). Por ello es importante la búsqueda de materiales alternativos sostenibles que puedan sustituir a los plásticos convencionales (Akaraonye *et al.*, 2010).

Una vez que los PHAs se extraen de las células, presentan propiedades físicas similares a los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y el polietileno, por lo que representan un recurso renovable y sostenible (Tabla 1). Los PHAs son insolubles en agua, tienen buena resistencia al ataque hidrolítico, resisten rayos UV, y se hunden en el agua, lo que facilita su biodegradación en los sedimentos (Raza *et al.*, 2018). Por ello actualmente son una familia de polímeros con gran potencial para su uso como plásticos biodegradables o bioplásticos. El conocimiento para la utilización de estos polímeros como materiales biodegradables se tiene desde la década de 1920, y a partir de la década de 1980 han sido estudiados intensivamente (Madison & Huisman, 1999).

**Tabla 1.** Propiedades de los PHAs en comparación al polietileno y polipropileno (Tomado y modificado de Akaraonye *et al.*, 2010).

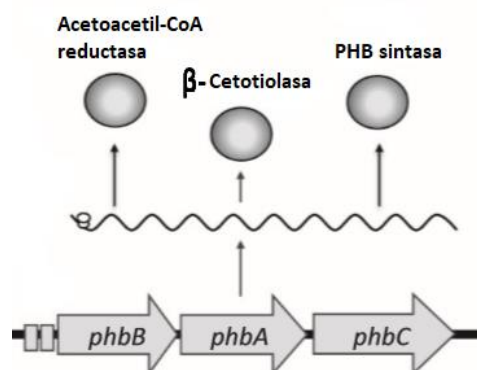
Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Temperatura de transición vítrea (°C)	Módulo de Young (GPa)	Elongación a la ruptura (%)	Resistencia de tracción (MPa)
P(3HB)	180	4	3.5	5	40
P(4HB)	53	-48	149	1000	104
P(3HB-co-20% 3HV)	145	-1	1.2	50	20
P(3HB-co-16% 4HB)	150	-7	-	444	26
P(3HB-co-10% 3HHx)	127	-1	-	400	21
P(3HB-co-6% 3HD)	130	-8	-	680	17
Polipropileno	176	-10	1.7	400	34.5
Poliestireno	240	100	3.1	-	50

A pesar de que el costo de la biosíntesis de los PHAs suele ser un factor limitante, su producción a partir de fuentes de carbono renovables permite que los PHAs actualmente sigan siendo un tema de investigación importante como sustitutos de los plásticos de origen petroquímico (González *et al.*, 2013; Raza *et al.*, 2018). La biodegradación de estos polímeros depende de varios factores, entre ellos: la población microbiana presente, temperatura, nivel de humedad, pH, nutrientes, cristalinidad del PHA y el área ocupada por los propios PHAs. Las moléculas de PHAs no pueden ser transportadas a través de la pared

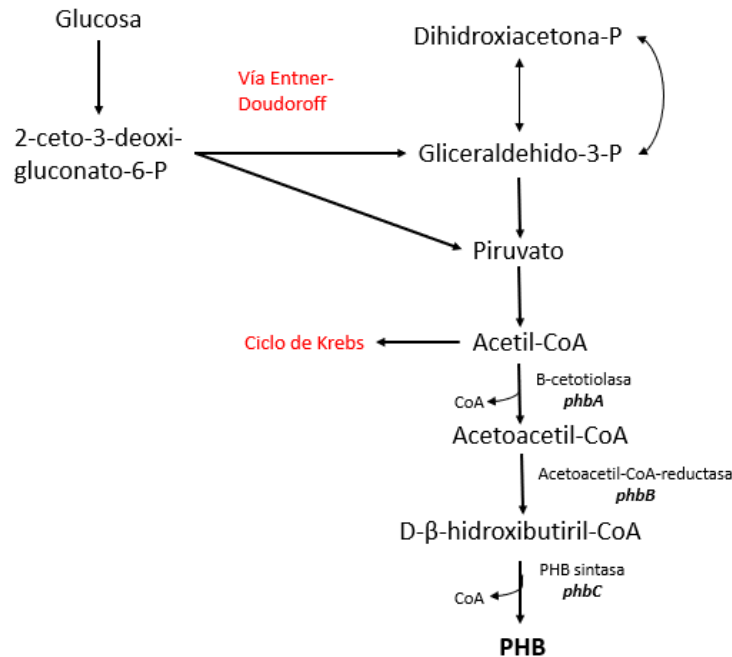
celular, por lo que varios microorganismos, entre ellos bacterias y hongos, excretan las enzimas denominadas depolimerasas de PHA que hidrolizan el polímero en oligómeros y monómeros solubles en agua y posteriormente los utilizan como nutrientes (Khanna & Srivastava, 2005).

### 1.3. El polihidroxitirato (PHB)

El PHB es el miembro más común de la familia de los polihidroxicanoatos. Este es acumulado intracelularmente a partir de una gran variedad de fuentes de carbono por un amplio número de géneros bacterianos, tales como *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y además *Escherichia coli* recombinante, expresando los genes para la biosíntesis del PHB de *Cupriavidus necator* o *Azotobacter vinelandii* (López *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2014; Gouda *et al.*, 2001; Yoneyama *et al.*, 2015). El PHB también es el PHA más estudiado, por lo que la ruta de biosíntesis ha sido descrita a detalle en *A. vinelandii*. El proceso metabólico para su producción se resume a tres reacciones catalizadas por tres enzimas diferentes (Figura 2 y 3). La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil conezima A (acetil-CoA) en acetoacetil-CoA por la  $\beta$ -cetotiolasa (codificada por *phbA*). La segunda reacción es la reducción de acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxitiril-CoA por una acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (codificada por *phbB*). La reacción final consiste en la polimerización de los monómeros de (R)-3-hidroxitiril-CoA en poli(3-hidroxitirato) por la PHB sintasa (codificada por *phbC*) (Figura 3) (Segura *et al.*, 2003; González *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Enzimas que sintetizan el PHB y sus genes en operón en *A. vinelandii* (Tomado y modificado de Peña *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Ruta de síntesis del PHB en *A. vinelandii* a partir de glucosa (Tomado y modificado de Segura *et al.*, 2003).

Además del homopolímero PHB, algunas bacterias pueden sintetizar PHAs con monómeros diferentes (copolímeros), formados a partir de una fuente de carbono que puede dar los diferentes monómeros, o bien, a partir del catabolismo de diferentes fuentes de carbono. Por ejemplo, se pueden obtener polímeros que además de 3-hidroxi-butirato contienen monómeros de 3-hidroxi-valerato (3HV) o 4-hidroxi-butirato (4HB). Los polímeros que contienen monómeros de menos de 6 carbonos pertenecen a la clase de PHAs llamados PHAs de cadena corta (scl-PHAs, por *short-chain-length PHAs*), en contraste con los PHAs de cadena media (mcl-PHAs, por *medium-chain-length PHAs*) compuestos de hidroxiácidos con 6 hasta 16 átomos de carbono (Madison & Huisman, 1999).

El PHB es comparable al polipropileno en propiedades mecánicas como el módulo de Young y resistencia a la tracción, muestra una buena resistencia a la humedad y adquiere excelentes propiedades de barrera a los gases, aunque la extensión de rotura es bastante menor a la del polipropileno (Raza *et al.*, 2018). El peso molecular del PHB producido por bacterias está en el rango de 10,000 – 3,000,000 Da, con una temperatura de transición vítrea cercana a 180 °C. Sus propiedades físicas como su cristalinidad, punto de fusión y rigidez, se pueden mejorar debido a la incorporación de otras unidades de hidroxiácidos para formar sus distintos copolímeros (Khanna & Srivastava, 2005). Además del potencial del PHB como bioplástico, con base en sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, nuevas aplicaciones para este polímero han sido propuestas en el campo médico y farmacéutico, donde su composición química y pureza son críticos (Williams & Martin, 2005). En tales aplicaciones, la masa molecular del PHB es una característica muy

importante para considerar, debido a que junto con la composición monomérica determina sus propiedades mecánicas (Peña *et al.*, 2014).

#### 1.4. Aplicaciones de los PHAs

Debido a las propiedades de biodegradación y biocompatibilidad de los PHAs, sus aplicaciones son muy amplias, que van desde aquellos usos que sustituyen a los plásticos convencionales, como artículos desechables, tales como envases, bolsas, botellas, pañales, materiales cosméticos y utensilios domésticos, hasta aplicaciones en las industrias médica y farmacéutica (Sing *et al.*, 2019).

En la industria farmacéutica los PHAs pueden usarse como material para la creación de micro y nanoesferas para la administración de fármacos. En el campo médico los polímeros también se han probado como dispositivos de reparación de menisco, varillas de fijación de fracturas, placas óseas, implantes de médula ósea, injertos de ligamentos y tendones e incluso como válvulas cardíacas. También se está considerando desarrollar telas hechas a partir de fibras de PHAs que sirvan como apósito para heridas (Valappil *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2019). Además, debido a que los PHAs son piezoeléctricos, pueden usarse para reparar nervios dañados (Bugnicourt *et al.*, 2014). Otros usos prometedores de estos polímeros es que pueden ser una fuente de pequeñas moléculas con aplicación como solventes biodegradables o como moléculas transportadoras para la liberación lenta a largo plazo de insecticidas y herbicidas (Akaraonye *et al.*, 2010).

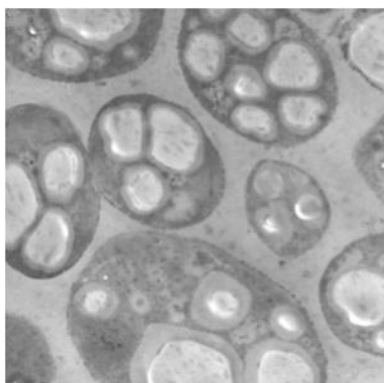
Si bien los PHAs tiene diversas aplicaciones bastante interesantes, el factor limitante para su producción a nivel industrial son sus costos de producción. De hecho, la única ventaja que los plásticos convencionales tienen sobre los PHAs es que son de 5 a diez veces más baratos de producir. Los diversos factores que aumentan los costos de producción de los PHAs incluyen el tipo de fuente de carbono, sus rendimientos, contenido de PHA en la biomasa total, tipo de microorganismo y el procesamiento para la recuperación del polímero (Chaudhry *et al.*, 2011). Hay mucha investigación centrada en el uso de materiales de desecho a partir de las cuales los microorganismos puedan producir los PHAs (Raza *et al.*, 2018).

#### 1.5. *Azotobacter vinelandii*, una bacteria productora de PHB

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria Gram-negativa de vida libre, organotrófica y fijadora de nitrógeno. Posee un metabolismo aeróbico estricto, pero puede crecer bajo condiciones de limitación de oxígeno. A pesar de tener una de las más altas tasas respiratorias conocidas en Bacteria, una característica peculiar es que puede mantener niveles bajos de oxígeno citoplásmico, un mecanismo llamado “protección respiratoria”, cuya función es mantener a salvo los procesos de fijación de nitrógeno sensibles al oxígeno (Segura *et al.*, 2014). Posee tres tipos de nitrogenasas con diferentes metales como cofactores centrales. Estas enzimas pueden sustituirse mutuamente para permitir el crecimiento fijando nitrógeno atmosférico cuando algún metal esencial está ausente o cuando hay variaciones en la temperatura (Noar

& Bruno-Bárcena, 2018). Posee flagelos peritricos que le permiten motilidad. Otra característica singular es que es una bacteria poliploide, es decir, que posee múltiples copias de un mismo cromosoma, habiéndose reportado hasta 40 u 80 copias por célula (Walmsley & Kennedy, 1991).

*A. vinelandii* es productora natural de PHB y puede ser cultivada en diversos sustratos, como melaza de caña o de remolacha, peptona de pescado y desechos de la crianza de cerdos. Es capaz de almacenar una gran cantidad de polímero y dependiendo de la fuente de carbono suministrada puede sintetizar el copolímero PHBV (Chen & Page, 1994; Chen & Page, 1997). Puede acumular hasta un 85-90 % del total de peso seco celular en forma de PHB (Figura 4). En condiciones más controladas, la limitación de oxígeno induce la producción de PHB en especies de *Azotobacter*. Las células pueden utilizar el PHB que produjeron si la limitación del oxígeno termina. La limitación de hierro también puede inducir la producción de PHB (Senior *et al.*, 1972; Pyla *et al.*, 2009; Muriel-Millan *et al.*, 2014). La fuente de carbono también juega un papel importante: el acetato y el etanol permiten una poca o nula producción de PHB, comparada con la producción a partir de azúcares o butanol (Page & Knosp, 1989; Stevenson & Socolofsky, 1966; Segura & Espín, 1998). En cultivos en biorreactores, *A. vinelandii* puede producir PHB de ultra alto peso molecular de 4800 kDa durante el crecimiento de fase exponencial, sin embargo, durante la fase estacionaria, su peso molecular decrece a 3600 kDa, coincidiendo además con un incremento en la actividad de PHB depolimerasas (Millán *et al.*, 2017). Lo anterior fue solucionado con la inactivación del gen de una PHB depolimerasa para mantener la producción de un PHB de peso molecular ultra alto (Adaya *et al.*, 2018).

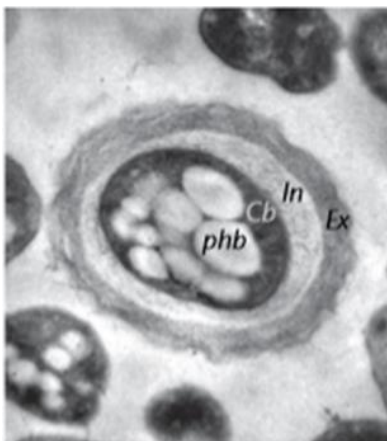


**Figura 4.** Micrografía electrónica de transmisión de células de *A. vinelandii* (Tomado de Peña *et al.*, 2014).

En algunas cepas hay una relación entre la producción de PHB y la formación de quistes resistentes a la desecación (Figura 5). Las bacterias del género *Azotobacter* pueden formar este tipo de células a través de un proceso de diferenciación celular, el enquistamiento, el cual comienza durante la fase de crecimiento estacionaria bajo condiciones adversas, o bien, se puede inducir y sincronizar cambiando la fuente de carbono en el cultivo por *n*-butanol o  $\beta$ -hidroxibutirato. Cada quiste es producido desde una célula vegetativa y posee



numerosos gránulos de PHB. Los quistes consisten en una célula que se torna en una forma oval, y conforma el cuerpo central, el cual contiene gránulos de PHB. El cuerpo central está rodeado por una cápsula, compuesta a su vez por una lámina en su parte más externa llamada exina, y por otra capa interna llamada intina. Un componente importante de los quistes es el alginato, un polisacárido extracelular, el cual abarca un 13% de la exina y un 32% de la intina (Stevenson & Socolofsky, 1966; Segura *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Micrografía electrónica de una célula vegetativa de *A. vinelandii* formando un quiste. Ex, exina; In, intina; Cb, cuerpo central; phb, gránulos de polihidroxi-butilato (Tomado de Segura *et al.*, 2014).

Como se describió en la sección 1.3, los aspectos genéticos de la biosíntesis del PHB y sus elementos reguladores son muy bien conocidos en *A. vinelandii* (Castañeda *et al.*, 2000; Peralta-Gil *et al.*, 2002; Segura & Espín, 2004; Hernández-Eligio *et al.*, 2011, 2012; Muriel-Millan *et al.*, 2014). En cuanto a la degradación o movilización del PHB en *A. vinelandii*, se han identificado siete genes que posiblemente codifican para PHB depolimerasas, pero la evidencia del papel de sus productos es pobre. El producto de uno de dichos genes ya ha sido caracterizado y se ha demostrado su actividad hidrolítica de gránulos de PHB (Adaya *et al.*, 2018).

## 1.6. Métodos de recuperación de los PHAs

El proceso de recuperación de PHAs a partir de las células que han acumulado el polímero a través del cultivo, incluye operaciones como la centrifugación, la extracción con solventes, la filtración y procesos mecánicos como presión hidrodinámica para inducir lisis celular. Estos métodos suelen ser complejos y costosos, especialmente a una escala industrial. El método más utilizado para extraer los PHAs a partir de la biomasa involucra el uso de solventes. Entre los solventes empleados en gran cantidad se incluyen el cloroformo, carbonato de etileno, acetona, carbonato de 1,2-propileno, 1,2-dicloroetano e hipoclorito (Lee, 1995; Martínez *et al.*, 2011). Este método de extracción con solventes incluye los siguientes pasos: un pretratamiento para romper las células para que los gránulos de PHA

sean accesibles y hacer que estos gránulos sean solubles en un disolvente, seguido de precipitación con un no disolvente (Raza *et al.*, 2018).

Un método alternativo es la digestión de la biomasa celular, que puede ser química o enzimática. En el método químico, se puede usar hipoclorito de sodio o tensioactivos para facilitar la recuperación de los PHAs. Tritón X-100, palmitoil carnitina, dodecil sulfato de sodio (SDS) y betaína se han usado con el hipoclorito de sodio para la digestión química. La digestión solo con hipoclorito de sodio puede romper o disminuir el peso molecular del polímero hasta en un 50% y el uso por separado de los tensioactivos tiene un bajo rendimiento (Raza *et al.*, 2018).

En el método enzimático, se hace uso de varias clases de enzimas hidrolíticas, principalmente proteasas. Es un método atractivo debido a sus condiciones de operación moderadas y debido a que las enzimas son altamente específicas a su sustrato, por lo que no representan un peligro para las características del polímero, como su pureza y su peso molecular. Sin embargo, se presentan los inconvenientes de que los costos de las enzimas son muy elevados, y que se requiere de un tratamiento adicional para su recuperación, sobre todo si el polímero tiene aplicación médica (Tripathi *et al.*, 2016).

A una escala industrial, los métodos empleados comúnmente requieren grandes cantidades de reactivos químicos y/o enzimas, lo cual se presenta como un obstáculo para reducir el costo de recuperación, además de que el uso de solventes es poco amigable con el ambiente (Hori *et al.*, 2002). Otra desventaja de usar solventes o detergentes es que se requieren varios pasos de lavado para poder deshacerse de los residuos de esos reactivos, lo que provoca una reducción del peso molecular del polímero. Así mismo, los procesos mecánicos para lisar células también afectan las propiedades de los PHAs (Resch *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2011).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Sistemas líticos como alternativas para mejorar la recuperación de los PHAs

En la actualidad, la investigación sobre PHAs gira en torno a desarrollar productores eficientes de estos polímeros, incrementando la concentración intracelular de los mismos, y también en optimizar el crecimiento para alcanzar una alta densidad celular (Peña *et al.*, 2014; Mozejko-Ciesielska *et al.*, 2019). Además, debido a que los PHAs son acumulados en el citoplasma, y a que los métodos de recuperación actuales presentan varios inconvenientes ya descritos, el desarrollo de un proceso de recuperación eficiente es indispensable para reducir el costo total de producción de estos bioplásticos. La regulación de la expresión de proteínas líticas en las bacterias productoras se ha propuesto como una buena opción para mejorar la liberación al medio de diversos productos que se acumulan en el citoplasma de las bacterias, por ejemplo, proteínas recombinantes, lípidos para producir biocombustibles, y por supuesto, los PHAs (Salazar & Asenjo, 2007; Liu & Curtiss, 2009).

El método de digestión enzimática para extraer PHAs es demasiado caro debido a las cantidades de proteínas exógenas que tienen que utilizarse y a que representa pasos adicionales en los procesos de purificación. El hecho de que el microorganismo exprese sus propias proteínas líticas y se autodestruya presenta varias ventajas: significa una disminución en los costos de la recuperación del polímero, ya que ayuda a liberar el producto al medio sin intervención de algún agente químico/enzimático añadido, por lo tanto, se reducen los pasos de lavado para adquirir un polímero limpio y el impacto al ambiente disminuye.

### 2.2. Sistemas de lisis de bacteriófagos en hospederos Gram-negativos

Los sistemas de lisis que utilizan los bacteriófagos que infectan a bacterias Gram-negativas se han planteado como una alternativa para la liberación y purificación de los PHAs. Esto debido a la alta especificidad que las proteínas involucradas tienen por su sustrato (Catalão *et al.*, 2012), teniendo nulo efecto sobre los PHAs. El último paso en el ciclo de infección de los bacteriófagos es la lisis del hospedero. Los fagos de DNA de doble cadena requieren de diversas proteínas para conseguirlo y es un proceso regulado cuidadosamente y programado temporalmente. En los huéspedes Gram-negativos este proceso de lisis se divide en tres pasos: permeabilización de la membrana interna, degradación del peptidoglicano y degradación de la membrana externa. Cada uno de estos pasos es llevado a cabo por al menos una proteína diferente y en algunos casos son partícipes hasta 5 enzimas (Young, 2014).

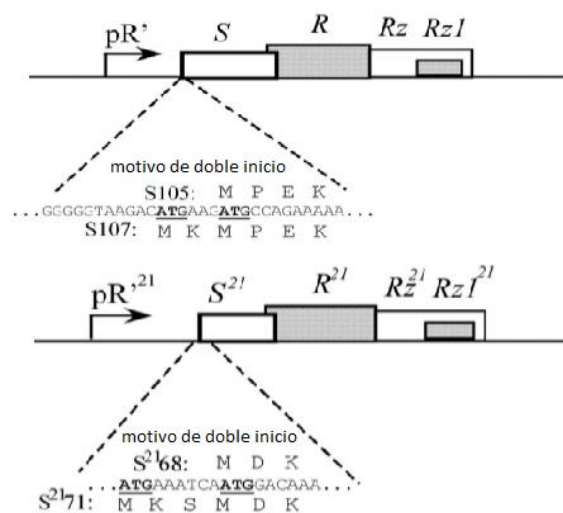
Se han estudiado diversas proteínas involucradas en la lisis celular provenientes de bacteriófagos para conseguir bacterias productoras de PHAs autolíticas, y dos de estas

proteínas han dado resultados prometedores: las enzimas holina y endolisina. Los genes se han obtenido de diversos bacteriófagos y se han construido cepas autodestructivas en las cuales se ha facilitado la expulsión del polímero al medio extracelular. El porcentaje de producto recuperado depende de diversos factores, entre ellos están: el tipo de holina y endolisina que se usen, la molécula inductora y el promotor elegido en cada caso, y el método para recuperar el polímero una vez lisadas las células (Díaz-Barrera & Soto, 2010; Hori *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2011).

### 2.3. El sistema holina-endolisina

El sistema de lisis holina-endolisina fue descrito por primera vez en 1992 a partir de estudios hechos en el bacteriófago  $\lambda$  (Young, 1992). El término endolisina fue acuñado para la proteína que mostró actividad de degradación del peptidoglicano, y el término holina para aquella proteína que se acumula en la membrana interna formando “balsas” y regula el momento de lisis al perforar la membrana interna (Young, 2014).

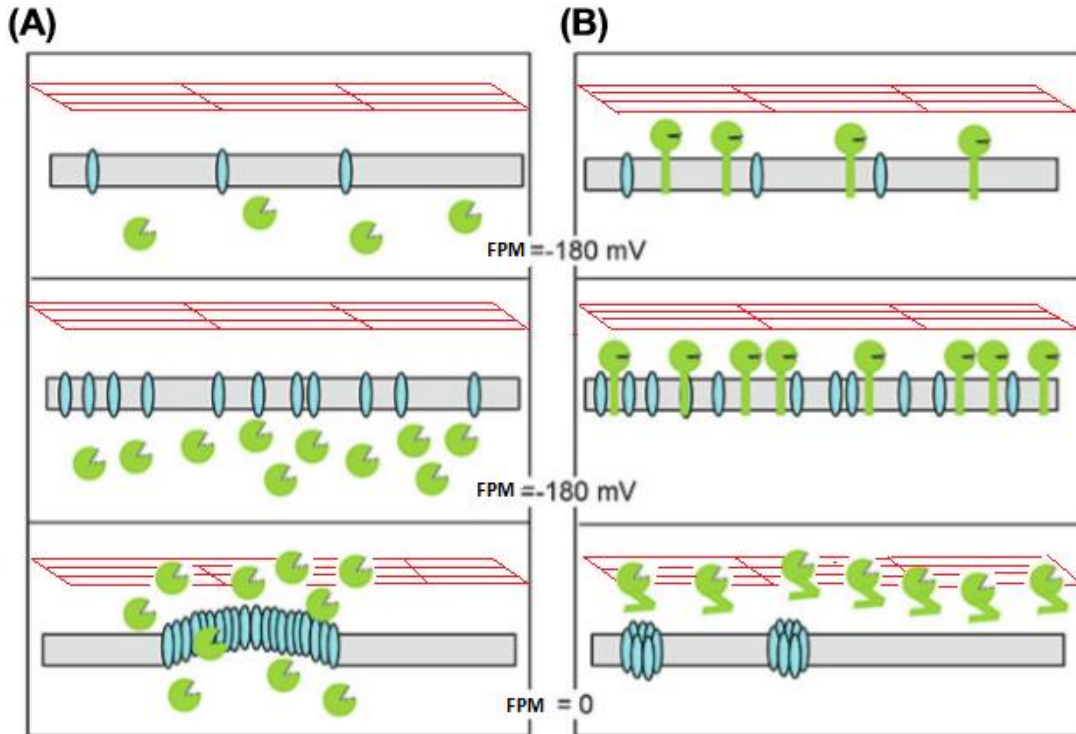
Posteriormente se describió que el fago  $\lambda$  posee 5 enzimas involucradas en la lisis celular en un casete de 1242 pb que consta de varios genes. El gen S (Figura 6, arriba) se traduce en dos proteínas distintas; S105, que corresponde a la proteína holina, que forma agujeros microscópicos en la membrana interna (MI); y S107, que se traduce en una proteína que se llama antiholina, que es un regulador negativo de S105. Su ATG está solo tres bases arriba del de S105. El gen R codifica para la endolisina, enzima que degrada el peptidoglicano; los genes *Rz* y *Rz1* (sobrelapado dentro de *Rz*) codifican unas proteínas llamadas espaninas. Se ha probado que su función es degradar la membrana externa. Otro ejemplo similar es el casete de lisis del fago lamboide 21 (Figura 6, abajo). También posee 5 enzimas en un arreglo muy similar al de lambda. Codifica proteínas muy similares a las arriba descritas, pero su antiholina, S<sup>21</sup>71, tiene 9 bases más que la holina, en lugar de 6.



**Figura 6.** Organización de los genes de lisis del bacteriófago  $\lambda$  y del fago lamboide 21. (Tomado y modificado de Cahill & Young, 2018).

En el fago  $\lambda$  una vez activado el promotor Pr después de 8-10 minutos del comienzo de la infección, las moléculas de holina (S105) se acumulan como homodímeros móviles y distribuidos uniformemente en la membrana citoplásmica o membrana interna (MI). Mientras tanto, la endolisina (R) se acumula en el citoplasma como una enzima monomérica, plegada adecuadamente y activa. Después de 50 minutos, la holina desencadena la lisis celular, mediante un proceso llamado “activación de la lisis” (*triggering* en inglés), con una redistribución repentina de sus moléculas formando un número relativamente pequeño de agregados en la MI que provocan agujeros a nivel microscópico ( $>1 \mu\text{m}$ ) (White *et al.*, 2011). Cuando no está presente la endolisina, la holina provoca una interrupción repentina en el crecimiento bacteriano por un colapso de la fuerza protón-motriz (FPM). Los micro agujeros, provocan una expulsión de todo el contenido citoplásmico incluyendo las moléculas de endolisina acumuladas, las cuales hidrolizan la malla de peptidoglicano que se encuentra en el periplasma y que da estabilidad y forma a la célula de la bacteria (Figura 7, panel A) (Young, 2014).

Posteriormente se describió una segunda vía para la lisis celular, por lo que la primera vía descrita arriba se denominó modelo de lisis holina-endolisina canónico, y al nuevo, modelo de lisis pinholina-endolisina SAR (Figura 7, panel B). En ambos casos la holina y la pinholina son proteínas de membrana y son las que regulan el desencadenamiento de la lisis. A diferencia de las endolisinas del sistema de lisis canónico, las endolisinas SAR se exportan al periplasma independientemente de la holina pero quedan ancladas a la membrana por una secuencia señal (dominio SAR). Una vez que la holina comienza a despolarizar la membrana, las endolisinas SAR escapan de la MI, se pliegan en su forma catalíticamente activa y comienzan a degradar el peptidoglicano (Young, 2014). En los paneles inferiores de la figura 7 se observa como la membrana interna ha sido despolarizada y la holina ha formado un agujero grande a escala de la célula, mientras que las pinholinas han formado pequeños agujeros heptaméricos.



**Figura 7.** Modelos de lisis holina-endolisina canónico (A) y pinholina-endolisina SAR (B). Rectángulo gris=membrana interna; cuadrícula roja=malla de peptidoglicano; óvalos azules=moléculas de holina y pinholina; círculos verdes con abertura=endolisinas; en el caso de las endolisinas SAR tienen un dominio SAR anclado a la MI; FPM = fuerza protón motriz. El orden de los eventos es de arriba hacia abajo (Tomado y modificado de Young, 2014).

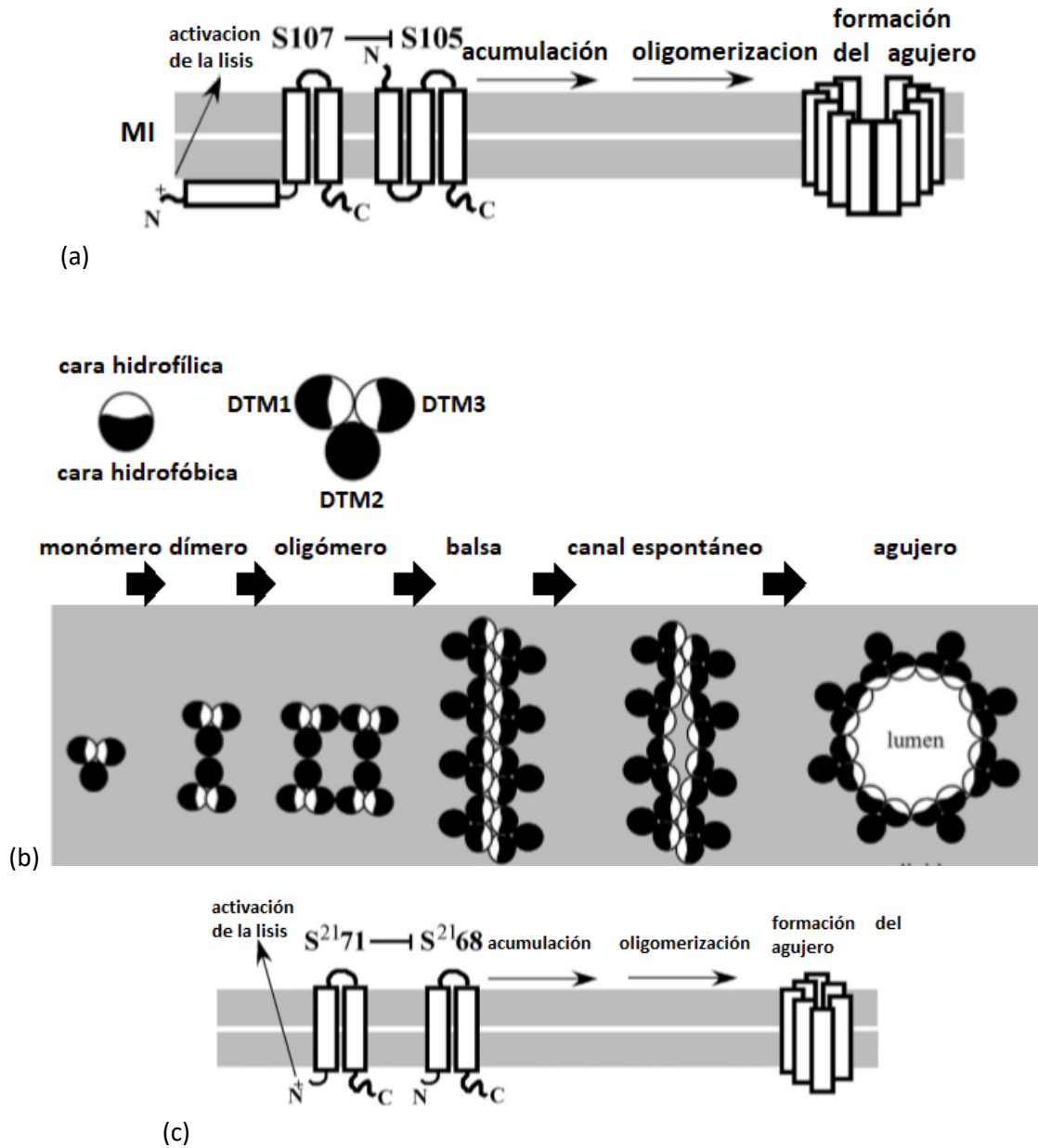
#### 2.4. Mecanismo de acción de la holina

La holina del fago  $\lambda$  (S105) posee tres dominios transmembranales (TMDs) con el extremo N-terminal de cara al periplasma y el C-terminal al citoplasma. Dos de los dominios TMDs, 1 y 3, tienen caras moderadamente hidrofílicas. Desde el inicio de la expresión génica tardía, alrededor de 10 minutos después del comienzo del ciclo de infección, la holina se acumula como un homodímero en la membrana, con las caras hidrofílicas “secuestradas” unas a otras. Una vez que los homodímeros alcanzan una concentración crítica, forman agregados bidimensionales (Figura 8a y b). Probablemente estos agregados carecen de lípidos, debido a la naturaleza de su formación y por lo tanto son aislantes pobres, llevando a la reducción o colapso de la FPM. Esto lleva a alteraciones en la orientación de uno o más de los TMDs, y a su vez esto lleva a una mayor fuga de protones. Una reorganización final de las holinas provoca una lesión a micro-escala con las caras hidrofílicas de los TMDs 1 y 3 bordeando el lumen del agujero. El tiempo de activación de la lisis está directamente ligado a la concentración de las moléculas de holina y, por lo tanto, a un tiempo particular después del inicio de la síntesis tardía de proteínas. Como podemos ver, la manera de actuar de la holina es sensible a la FPM, por lo que si se añade algún agente externo que la desestabilice causará una lisis prematura debido a que se induce la formación de agujeros en la MI. El

número de moléculas en el momento en que se activa la lisis es de 1000-3000. El mecanismo de la holina canónica se ha descrito en fagos como T4 y P2, además de lambda (White *et al.*, 2011; Zagotta y Wilson, 1990; Young, 2014; Cahill & Young, 2019).

Como se mencionó en la sección 2.3, se ha descrito una segunda vía de lisis en el cual hay unas proteínas similares a las holinas, que se llamaron pinholinas (Figura 8c). El primer gen de pinholina estudiado, denominado  $S^{21}$ , fue el del fago lamboide 21 (Park *et al.*, 2007). Tiene una longitud de 68 aa y posee solo dos TMDs, con los extremos N-terminal y C-terminal hacia el citoplasma, y al igual que la holina de lambda, se acumula como homodímeros en la MI (Pang *et al.*, 2009). Tanto las holinas canónicas como las pinholinas tienen la misma función de desencadenar o activar la lisis celular, pero su mecanismo molecular es diferente. En las pinholinas, el TMD1 no es capaz de activar la lisis, y en su lugar, actúa como un regulador negativo de TMD2, que es el dominio que se encarga de la formación de los agujeros. Las moléculas del TMD1 deben salir de la MI para permitir la formación de homodímeros, estabilizados por las interacciones en la membrana TMD2-TMD2 y por las interacciones periplásmicas TMD1-TMD1. Las balsas formadas por las pinholinas son mucho más pequeñas y numerosas en comparación a las holinas canónicas. Se forman alrededor de 100 agujeros de 2 nm cada uno. Estos canales permiten la liberación de las endolisinas SAR (Cahill & Young 2019).

Es importante mencionar que tanto el gen de la holina canónica como el de la pinholina (Figura 6) poseen un doble inicio de traducción, traduciendo dos proteínas con solo 2 y 3 aminoácidos de diferencia respectivamente, en comparación a la holina. A esas proteínas apenas más grandes se les llamó antiholinas, por su función como reguladoras de las holinas o pinholinas (Bläsi *et al.*, 1989; Bonovich & Young, 1991). En ambos casos, la tasa de holina/antiholina es de 2:1, con una estructura de bucle en el tallo del mRNA que determina la frecuencia relativa de iniciación (Barenboim *et al.*, 1999). En ambos casos, una carga positiva extra en el extremo N-terminal de la antiholina bloquea el TMD1 por un cambio topológico. TMD1 en S107 (antiholina de lambda) es incapaz de entrar a la membrana mientras que TMD1 en  $S^{2171}$  (antiholina en el fago 21) es incapaz de salir de la MI (Figura 8a y 8c). En ambos casos el heterodímero entre la holina y la antiholina es incapaz de participar en la activación de la lisis creando agujeros, y en ambos casos, la activación de la lisis despolariza la membrana, por lo tanto, remueve el bloqueo de las antiholinas, permitiendo que estas asuman una conformación estructural que las hace participar en la formación de agujeros, igual que una holina. En consecuencia, dado que solo 1/3 del total de productos del gen se acumula como homodímeros de holina-holina y que 2/3 se acumulan como heterodímeros de holina-antiholina, en el instante de la activación de la lisis la cantidad de moléculas formadoras de agujeros se triplica (Cahill & Young, 2019).



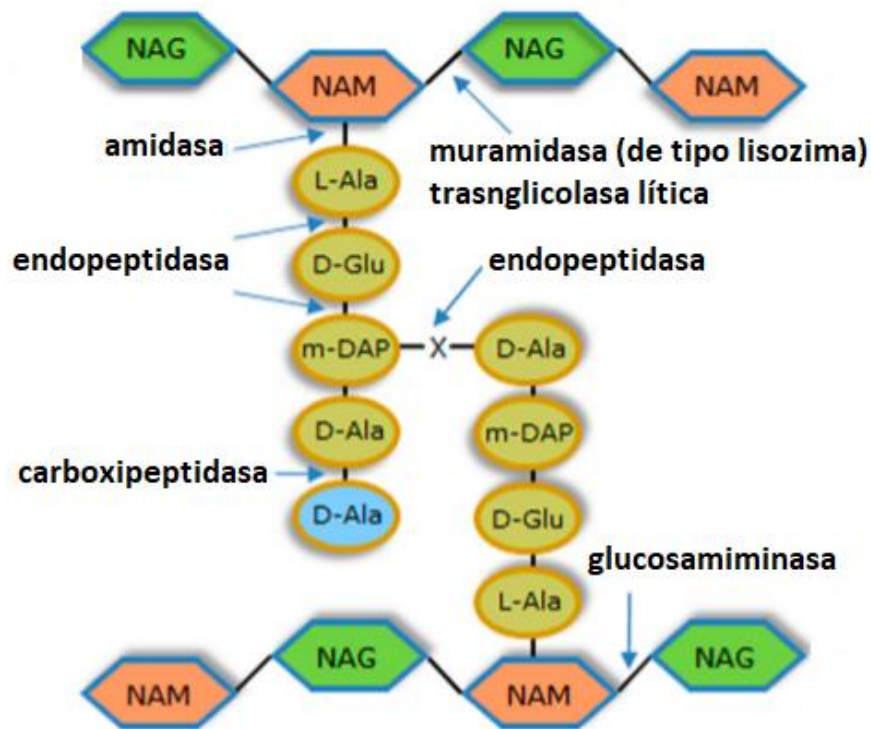
**Figura 8.** Estructura y función de la holina y pinholina. (a) Topología de la holina (S105) y antiholina (S107) del fago  $\lambda$ . (b). Modelo de la función de la holina en el fago  $\lambda$ . (c) Topología de las pinholinas del fago lambdaoide 21 (S<sup>2171</sup> y S<sup>2168</sup>) (Tomado y modificado de Cahill & Young, 2019).

## 2.5. Mecanismo de acción de la endolisina

Las holinas canónicas presentan un pequeño dominio citoplásmico, generalmente en el extremo C-terminal y altamente hidrofílico con carácter básico. Es posible que la endolisina no se distribuya uniformemente dentro del citoplasma y que las interacciones débiles con el pequeño dominio de la holina puedan afectar su localización, acercándolas a las balsas formadas por las holinas y así hacer más eficiente su escape al periplasma una vez formados los agujeros (Cahill & Young, 2019). Las cantidades de endolisina canónica acumuladas en



el citoplasma son excesivas, de alrededor de 1000-3000 moléculas (Altman *et al*, 1985). Las endolisinas de casi todos los fagos con hospederos Gram-negativos tienen un solo dominio que combina la unión al peptidoglicano y su actividad enzimática (las endolisinas de fagos con hospederos Gram-positivos tienen tres dominios, y su mecanismo de acción es diferente) (Briers *et al.*, 2007). Las endolisinas destruyen los enlaces esenciales del peptidoglicano, y esta actividad muralítica no implica un mecanismo bioquímico común. Por ejemplo, en los fagos T4, T5, T7 y  $\lambda$ , las endolisinas comprenden cuatro actividades enzimáticas diferentes: glicosilasa (o muramidasa, como la lisozima), endopeptidasa, amidasa y transglicosilasa, respectivamente (Figura 9) (Oliveira *et al.*, 2013).



**Figura 9.** Tipos de actividades enzimáticas de la endolisina. La red de peptidoglicano consiste en cadenas lineares que tienen unidades repetidas de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM), ligado por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4). (Tomado y modificado de Fernandes & São-José, 2018).

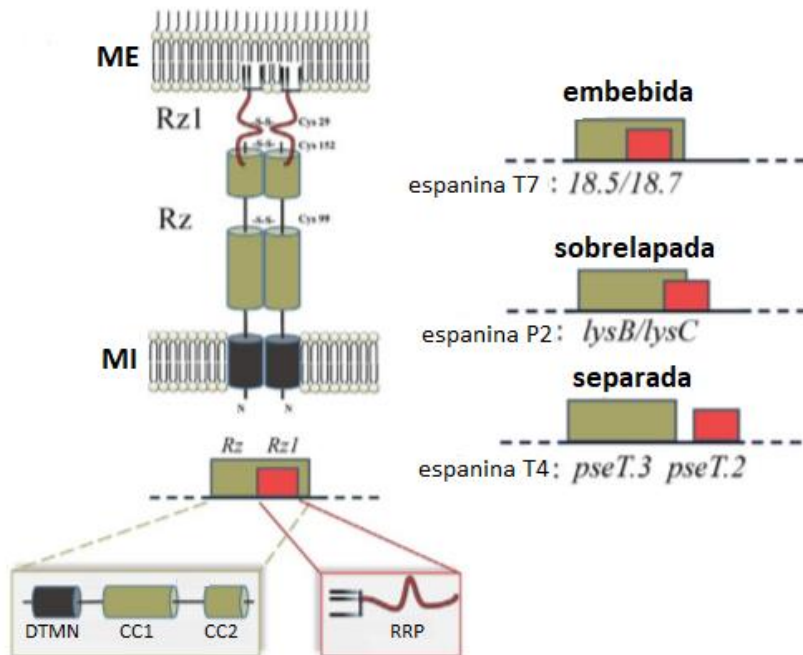
Las endolisinas SAR, presentes en fagos como P1 (que curiosamente posee una holina canónica) y el lamboide 21, poseen una secuencia señal N-terminal (SAR, de señal anchor release) que involucra al sistema de secreción *Sec*, por lo que se exporta al periplasma independientemente de la holina y se quedan ancladas catalíticamente inactivas en la MI. Su activación ocurre hasta que se escapan de la MI por su depolarización, provocado por la pinholina, y es entonces cuando ataca al peptidoglicano. Por ello se ha dicho que el dominio SAR es un TMD inestable que depende de la FPM de la membrana. Además, el dominio SAR juega un papel en el plegamiento de la enzima, proporcionando interacciones covalentes

(por enlaces disulfuro) o no covalentes en la secuencia de la proteína (Young, 2014). Estudios en las endolisinas SAR de los fagos P1 y  $\phi$ 21, llamadas R21 y Lyz respectivamente, indican que los dominios SAR tienen un contenido enriquecido de residuos no cargados pero hidrofílicos, Ala, Gly, Ser y Thr a expensas de los residuos hidrofóbicos como Leu e Ile que típicamente están en los TMDs (Oliveira *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2004). Se desconoce cómo esa diferencia de residuos está involucrada en la capacidad del dominio SAR para salir cuantitativamente de la membrana una vez que se ha despolarizado, pero se ha observado que existe un nivel basal de escape al periplasma (Cahill & Young, 2019).

## 2.6. Mecanismo de acción de las espaninas

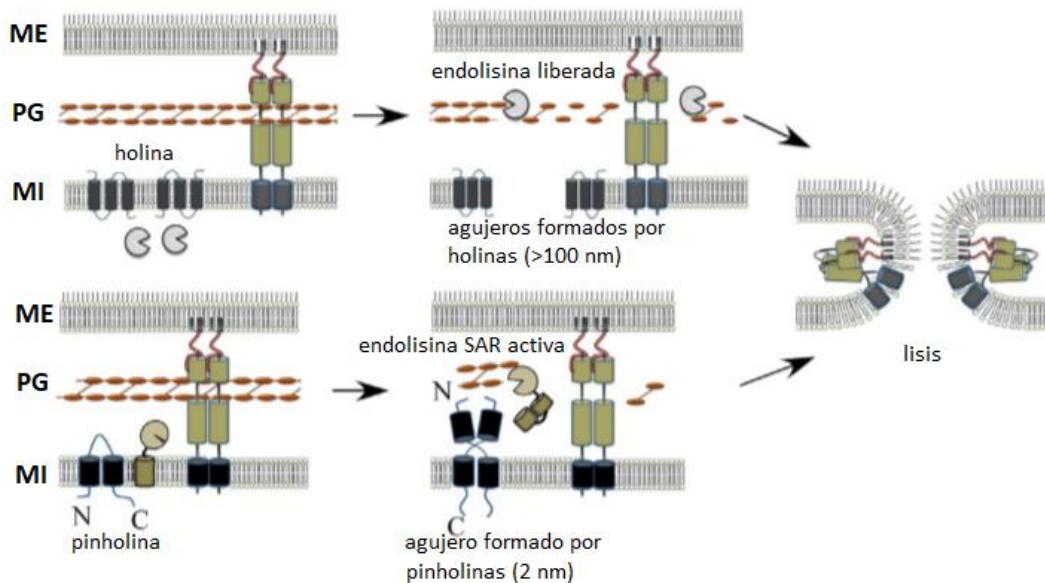
En un principio se creía que las proteínas holina-endolisina o pinholina-endolisina SAR bastaban para provocar el estallido eficiente de la célula, dando lugar al escape de los viriones para que pudieran infectar a otras células. Sin embargo, investigaciones posteriores han demostrado que otras proteínas son necesarias en el último paso de la lisis celular (Rajaure *et al.*, 2015). En el fago lambda se demostró que las mutaciones en los genes *Rz* y/o *Rz1* (que comparten la misma secuencia de DNA, pues están solapados, Figura 6) ubicados río abajo de los genes *S* y *R*, bloqueaban la lisis en células inducidas. Sin embargo, estas células bacilares que habían sido inducidas adquirieron una forma esferoide, sugiriendo que el PG había sido degradado pero no habían sufrido daño en la membrana externa. A los productos de estos genes se les llamó espaninas (*spanins*, por *span* en inglés) porque “abarcaban” o se “extendían” a través del periplasma ancladas a la membrana interna y a la membrana externa (Berry *et al.*, 2008; Berry *et al.*, 2012).

La proteína *Rz*, producto del gen *Rz*, es una proteína integral de membrana de tipo II con 153 aa, 130 de ellos en el periplasma (Figura 10). El dominio periplásmico se organiza en dos hélices alfa unidas cola-cola y denominadas CC1 y CC2. *Rz* se acumula como un dímero ligado por dos enlaces disulfuro intermoleculares, inusuales en bacterias. La importancia del TMD de *Rz* radica únicamente en su función de anclaje a la MI. La proteína *Rz1*, codificada por el gen *Rz1*, tiene 60 aa y está anclada a la ME (Figura 10). Se acumula como dímero por enlaces disulfuro intermoleculares en la posición Cys29. *Rz1* tiene un alto contenido en prolina, que juega un papel esencial en su función (Cahill *et al.*, 2017). Las dimensiones de *Rz* y *Rz1* permiten formar un complejo que puede atravesar todo el periplasma: los 130 aa del dominio periplásmico de *Rz*, podría abarcar 20 nm y los 40 aa de *Rz1* podría abarcar 10 nm, coincidiendo con los reportes por Berry y colaboradores (2010), de que el periplasma tiene un ancho de 25 nm (Cahill & Young, 2019).



**Figura 10.** Genes *Rz* y *Rz1* y el arreglo de las espaninas en la MI y ME. DTMN = dominio transmembrana N-terminal; CC1 y CC2 = hélices alfa con los dominios cola acola; RRP = región rica en prolina. A la derecha se muestran ejemplos de diferentes arreglos de genes que codifican espaninas, clasificados por su grado de empalme (Tomado y modificado de Cahill & Young, 2019).

El complejo formado por *Rz* y *Rz1* tienen la capacidad de fusionar ambas membranas a las cuales están ancladas, sin embargo, quedan “atrapadas” por la malla de peptidoglicano, evitando su oligomerización (Figura 11). Así, la degradación del peptidoglicano por la endolisina, que a su vez llega al periplasma con ayuda de la holina, dan lugar a la oligomerización de las espaninas y a los cambios conformacionales que causan la fusión de las membranas, el paso final de la lisis celular (Rajaure *et al.*, 2015).



**Figura 11.** Espaninas en las vías de lisis canónico holina-endolisina y pinholina/endolisina SAR. En ambas vías, las espaninas se activan después de la degradación del PG y se someten a un cambio conformacional que causa la fusión de la MI y ME, permitiendo el escape de los viriones (Tomado y modificado de Cahill & Young, 2019).

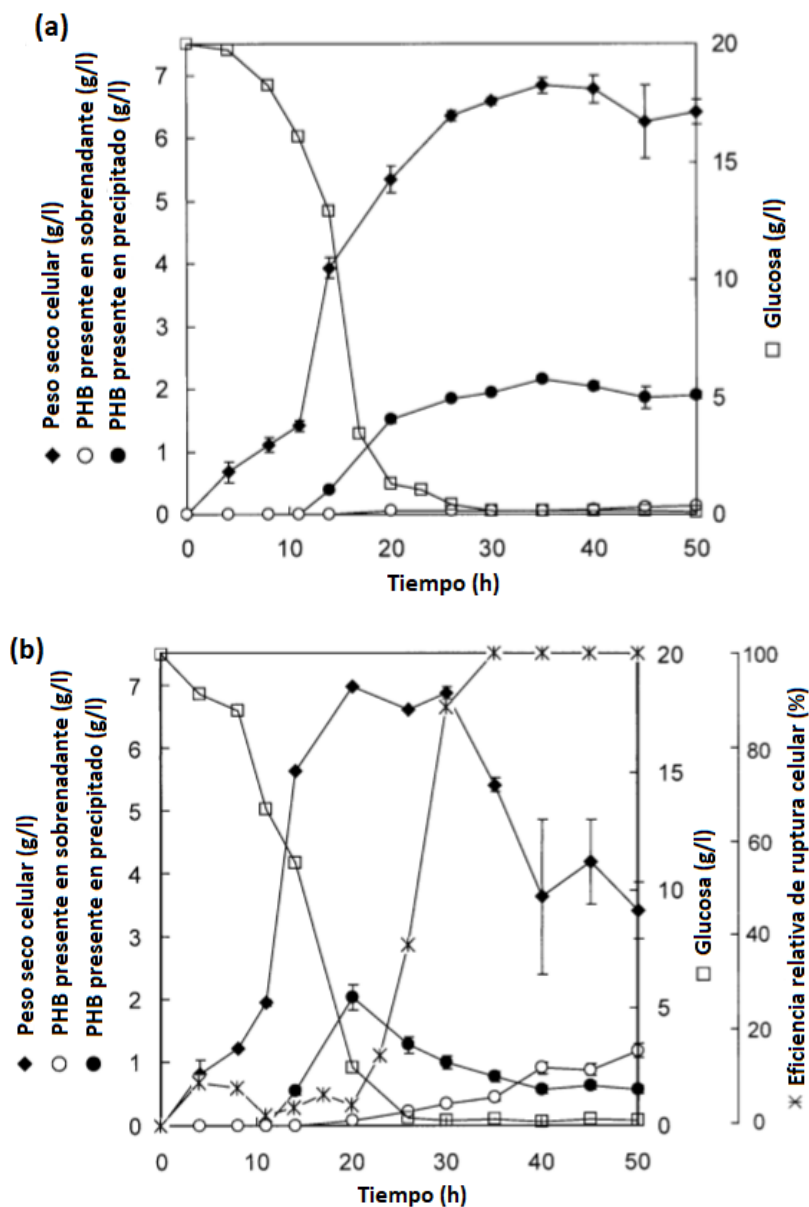
## 2.7. Bacterias modificadas genéticamente para regular su autólisis

Se ha estudiado en diversas cepas productoras de PHAs el efecto de proteínas líticas codificadas por genes de distintos bacteriófagos. Los diferentes mecanismos de inducción han arrojado resultados interesantes (ver Tabla 3).

Un ejemplo es el trabajo de Yu y colaboradores (2000), quienes construyeron la cepa *E. coli* VG1 (pTU14) que expresa desde el plásmido pTU14 el operón de biosíntesis de PHB *phbCAB* de *C. necator* y los genes de lisis del fago  $\lambda$  *S*<sup>-</sup>, *R* y *Rz* de forma constitutiva. Para promover la lisis de las células durante la fase estacionaria (24 hrs) usaron un tratamiento con buffer EDTA/Tris 50 mM (pH 8.0), aunque también observaron que después de que la célula acumuló grandes cantidades de PHB se autolisó sin necesidad de tratamiento. Por microscopía electrónica de transmisión lograron observar una liberación de la mayoría de los gránulos de PHB al medio.

Por otra parte, Hori y colaboradores (2002) construyeron una cepa autolítica de *Bacillus megaterium* para mejorar la liberación del PHB. Usaron dos genes de *Bacillus amyloliquefaciens* que codifican una holina y una endolisina, y los integraron en el cromosoma de la bacteria. Utilizaron el promotor *xyIR-xyIA'*, que es inducible por xilosa e inhibido por glucosa en un medio con ambos sustratos. Al crecer la cepa transformada en un medio con glucosa y xilosa como fuentes de carbono, la expresión de los genes fue inducida al agotarse la glucosa, por lo que se desencadenó la lisis celular y el PHB fue

liberado al medio (Figura 12a y b). Con este sistema se lograron lisar las células una vez que alcanzaron la máxima acumulación de PHB en el citoplasma, aunque una tercera parte del total quedó asociado a los restos celulares.



**Figura 12.** Producción de PHB e inducción de lisis por agotamiento de sustrato. (a) Cepa silvestre de *B. megaterium*. (b) Cepa transformada con genes que codifican una holina y una endolisina bajo regulación de un promotor inducible por xilosa. El medio tiene como fuente de carbono glucosa (20 g/L) y xilosa (8g/L) (Tomado de Hori *et al.*, 2002).

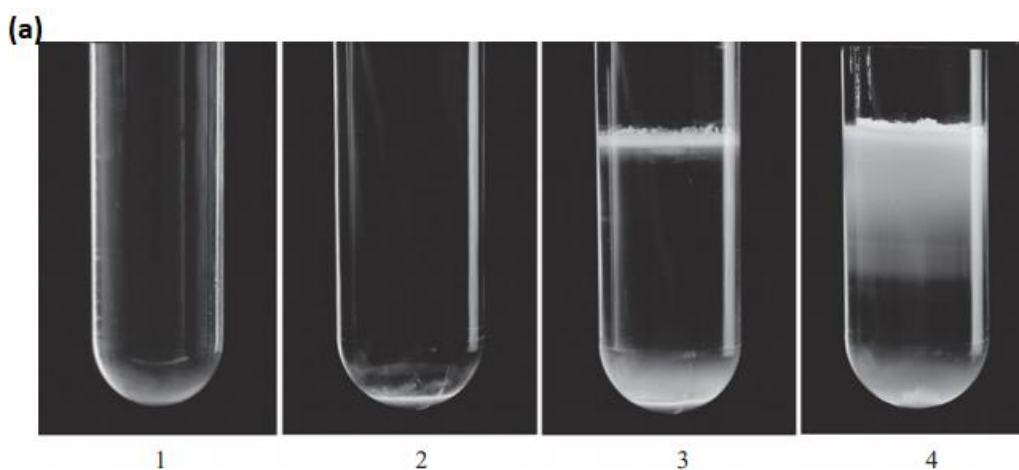
Otro trabajo interesante es el de Martínez y colaboradores (2011), quienes construyeron la cepa *Pseudomonas putida* BXHL, cuya característica es que posee la capacidad de autólisis gracias a la expresión de una holina (Ejh) y una endolisina (Ejl). Ambos genes fueron expresados por el sistema *XylS/Pm*, donde la transcripción del promotor *Pm* es inducida por

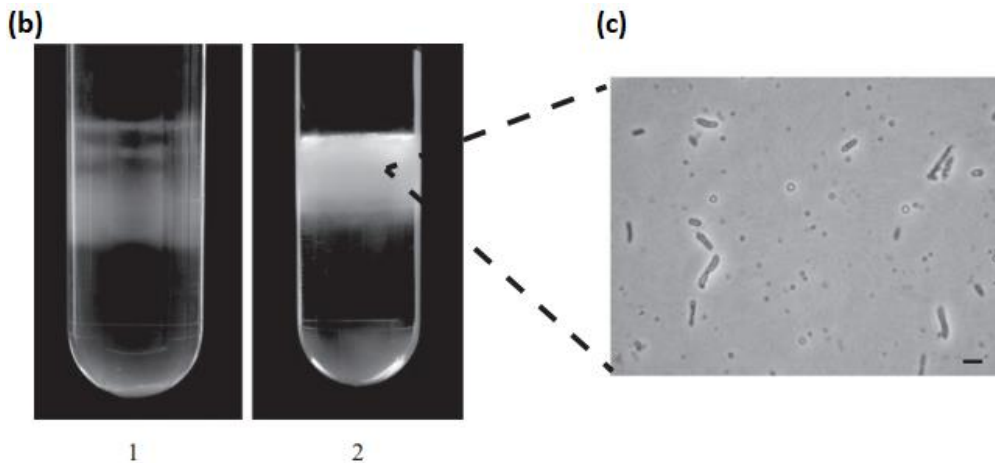
el producto del gen *xyIS* después de su activación por moléculas de benzoato de metilo. Los genes (*ejl* y *ejh*) fueron amplificados desde el bacteriófago EJ-1 y se insertaron en el cromosoma de la bacteria. Además, introdujeron en la cepa BXHL una mutación en el gen *tolB*, cuyo producto pertenece al sistema de proteínas Tol-Pal, un complejo involucrado en la estabilización de las membranas. Cuando crecieron la cepa BXHL en un sistema de cultivo de dos pasos y después procedieron a extraer el PHA en combinación con EDTA y SDS, recuperaron hasta un 93% de PHA del total del peso seco celular (Figura 13).

Para evaluar la recuperación de PHA en combinación con otros métodos, probaron la extracción directa del PHA desde las células con un solvente orgánico, acetato de etilo. Esto se hizo directo de la biomasa húmeda sin tratamientos adicionales. Y como se puede observar en la Tabla 2, en la cepa silvestre no hubo recuperación de PHA aun con inductor, en la cepa KTHL (sin la mutación del gen *tolB*) se logró recuperar 0.13 gL<sup>-1</sup> con inductor, y en la cepa BXHL hubo una mayor recuperación en presencia del inductor, recuperándose hasta 0.28 g/L de polímero con una pureza de 97.65% +- 2.16. En resumen, demostraron que, en una cepa con un sistema autolítico y sensible a la lisis, puede facilitarse la extracción de PHA cuando se combina con algún otro método tradicional, como lo es el uso de detergentes o solventes orgánicos.

**Tabla 2.** Parámetros de crecimiento y producción de PHA las cepas de *P. putida* KTHL y BXHL (Tomado y modificado de Martínez *et al.* 2011).

Cepas <i>P. putida</i>	DO <sub>600</sub> (24 h)	Contenido total de PHA (g/l)	Biomasa (g/l)	Viabilidad (10 <sup>-9</sup> células/ml)	PHA recuperado de la biomasa con etil acetato (g/l)
KT2440	7.52 ± 0.13	0.84 ± 0.05	2.38 ± 0.04	2.33 ± 0.04	0
KT2440 + 3MB	7.66 ± 0.37	0.78 ± 0.04	2.26 ± 0.02	3.16 ± 1.19	0
KTHL	7.71 ± 0.03	0.88 ± 0.03	2.45 ± 0.04	3.33 ± 0.82	0
KTHL + 3MB	6.53 ± 0.18	0.79 ± 0.15	2.28 ± 0.14	0.51 ± 0.02	0.13 ± 0.01
BXHL	7.83 ± 0.36	0.86 ± 0.09	2.00 ± 0.01	1.05 ± 0.03	0.1 ± 0.07
BXHL + 3MB	7.1 ± 0.67	0.68 ± 0.01	1.52 ± 0.1	0.1 ± 0.4	0.28 ± 0.08



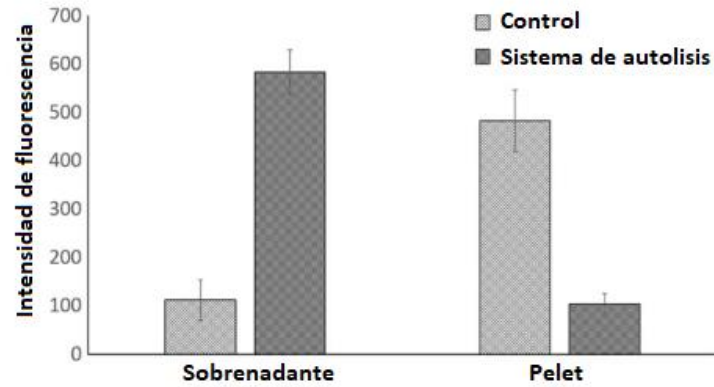


**Figura 13.** Separación de fracciones celulares en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa en cepas de *P. putida*. (a) Tubo 1, cepa silvestre *P. putida* KT2440 crecida con 3-metilbenzoato (3MB); tubo 2, *P. putida* KTHL crecida sin 3MB; tubo 3, *P. putida* KTHL crecida con inductor; tubo 4, *P. putida* KTHL crecida con 3MB y tratada con una prensa French. Las bandas blancas observadas en los tubos 3 y 4 corresponden a PHA liberado al medio. (b) Tubo 1, cepa silvestre *P. putida* KT2440; tubo 2, *P. putida* BXHL. Al igual que en las cepas anteriores, la banda blanca del tubo 2 corresponde a PHA liberado al medio. (c) Células del tubo 2 vistas al microscopio (Tomado y modificado de Martínez *et al.*, 2011).

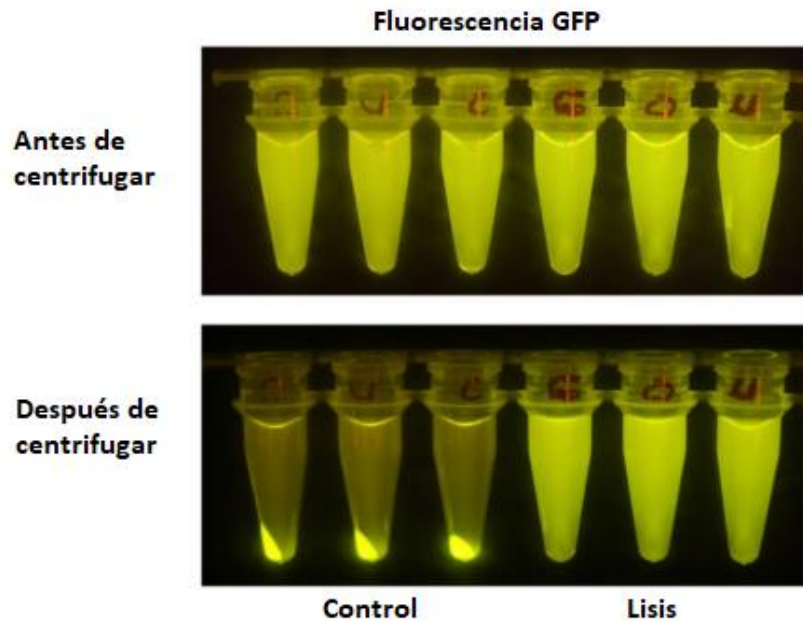
Por su parte Hajnal y colaboradores (2016), aunque su objetivo no fue la liberación facilitada de PHAs, diseñaron un plásmido (pSEVA331-SLO) donde integraron los genes de lisis *S*, *R* y *Rz* del fago  $\lambda$  bajo regulación del promotor constitutivo CAT. Intercambiaron el sitio Shine-Dalgarno propio del caset de lisis de  $\lambda$  por uno que funciona en *E. coli*. Al amplificar el caset de lisis incluyeron las seis bases de S107 (Figura 6) y cambiaron el tercer residuo de metionina (que actúa como codón de inicio para S105) por un residuo de leucina (Recordemos que el gen *S* codifica para dos proteínas diferentes, S105 y S107, con solo dos aminoácidos de diferencia al inicio de la cadena peptídica). Esta modificación tuvo como objetivo evitar que las moléculas de S105 (moléculas de holina) que están plegadas de manera que pueden perforar la membrana interna, desencadenen una lisis prematura. De esta forma, las moléculas S107 (moléculas de antiholina) únicamente tendrán la capacidad de lisar células si existe algo que desestabilice el potencial de membrana. En el vector pSEVA331-SLO también integraron un casete para expresar la proteína fluorescente GFP (*green fluorescent protein*).

En la cepa de *E. coli* que lleva el vector pSEVA331-SLO después de 24 horas de crecimiento añadieron cloroformo 1% para inducir la lisis celular y a través de mediciones de intensidad de la fluorescencia lograron observar una mayor caída en la densidad óptica y liberación de GFP al sobrenadante en comparación a las células control que solo tienen el vector con el casete para la proteína GFP (pSEVA331) (Figura 14 y 15), lo que indica que el sistema de lisis de lambda es eficiente cuando únicamente se expresa el producto más largo (S107) del gen *S* en presencia de algún agente que altere el potencial de membrana.





**Figura 14.** Mediciones de fluorescencia de pellets y sobrenadantes de células de *E. coli* con un vector que tiene el caset de lisis con los genes *S*, *R*, y *Rz* (pSEVA331-SLO) y de células de *E. coli* con el vector control (pSEVA331-GFP) después de 5 minutos en contacto con cloroformo 1% (Tomado de Hajnal *et al.*, 2016).



**Figura 15.** Visualización de la distribución de GFP en el pellet y en el sobrenadante después de la inducción de lisis con cloroformo 1% en las mismas cepas que en la Figura 14 (Tomado de Hajnal *et al.*, 2016).



**Tabla 3.** Bacterias modificadas genéticamente para promover su lisis celular.

Cepa	Sistema de lisis	Mecanismo de inducción	Fase de inducción (medio)	% de producto recuperado	Otras observaciones	Referencia
<i>Escherichia coli</i> VG1 (pTU14)	Holina-endolisina	Tratamiento con buffer Tris/EDTA	Estacionaria (LB)	N.e.	Expresión constitutiva de los genes. Inserción de una mutación sin sentido en S.	Yu <i>et al.</i> , 2000.
<i>Bacillus megaterium</i>	Holina-endolisina	Xilosa	Estacionaria (M4, glucosa y xilosa)	66% de PHB	Uso de promotor inducible por xilosa	Hori <i>et al.</i> , 2002.
<i>Pseudomonas putida</i> BXHL	Holina-endolisina	Benzoato de metilo	Exponencial (MM con ácido octanoico)	41.17% de PHA	La cepa posee una mutación en el gen <i>tolB</i> . Para la extracción de PHA usaron acetato de etilo.	Martínez <i>et al.</i> , 2011.
<i>E. coli</i> / <i>Halomonas</i> DL	Antiholina-endolisina	Centrifugación	Estacionaria (Lysogeny broth/ NaCl 40 g/L)	N.e.	El gen S únicamente expresa la antiholina.	Hajnal <i>et al.</i> , 2016.

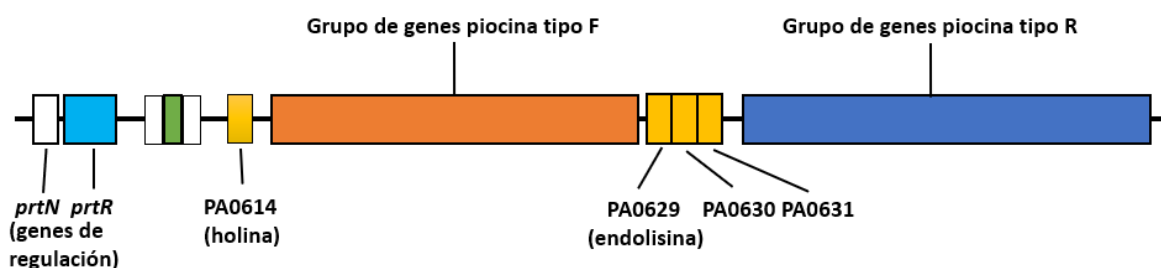
### 2.8. *Pseudomonas aeruginosa* posee genes funcionales de tipo holina-endolisina

Se sabe que en ocasiones los bacteriófagos se quedan permanentemente en genomas bacterianos después de integrarse como profagos y son una fuente importante de nuevos genes o nuevas funciones para las bacterias (Saussereau & Debarbieux, 2011). Ejemplo de ello son distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que producen varios tipos de piocinas (proteínas bacteriocinas que funcionan como “armas químicas”) que cumplen una función de defensa frente a otras bacterias relacionadas. Las piocinas forman poros que provocan una despolarización de la membrana llevando a la muerte celular de la bacteria. Las secuencias que codifican las moléculas de piocinas en *P. aeruginosa* PAO1 han sido relacionadas a secuencias de bacteriófagos como  $\lambda$  y P2 (Nakayama *et al.*, 2000) y se ha descrito que la estructura de las piocinas se asemeja a la estructura de las colas de bacteriófagos (Michel-Briand & Baysse, 2002). Estas moléculas son un ejemplo de secuencias de fagos que no solamente han quedado “atrapadas” en el genoma de esta bacteria, sino que además han adquirido una función especializada.

Interesantemente, en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 se encontró que en las regiones codificantes de las piocinas, existen dos genes, PA0614 y PA0629, con similitud de secuencia

a aquellos que codifican las enzimas holina y endolisina en los fagos  $\lambda$  y P2 (Figura 16). La actividad enzimática de las proteínas que expresan dichos genes fue demostrada, observando actividad lítica cuando promovieron la expresión de ambos genes con un promotor inducible (Nakayama *et al.*, 2000). En ese mismo trabajo propusieron que el sistema lítico compuesto por el producto de los genes PA0614 y PA0629, son los intermediarios para llevar al exterior de la célula las moléculas de las piocinas. Posteriormente se describió que estos genes están bajo regulación del sistema *recA* que responde a agentes mutágenos, y si bien no se ha demostrado que las proteínas codificadas por dichos genes estén involucradas en la liberación de las piocinas al medio, sí se ha comprobado que están involucradas en la formación de biofilms en *P. aeruginosa*, lisando las células cuando estas necesitan liberar distintos componentes al medio para la formación de estas estructuras (Michel-Briand & Baysse, 2002; Turnbull *et al.*, 2016).

El producto de los genes PA0614 y PA0629 despertaron nuestro interés ya que *A. vinelandii* es muy cercana al género *Pseudomonas*, e incluso podría considerarse miembro de ese género (Özen & Ussery, 2012). Dada la similitud entre estas bacterias, no solamente creemos que la actividad de las proteínas codificadas por dichos genes puede ser replicada en nuestro modelo de estudio, *A. vinelandii*, sino que puede ser aprovechada para nuestro objetivo de construir una cepa capaz de autolisarse y liberar los gránulos de PHB al medio.



**Figura 16.** Organización génica de las piocinas tipo F y R y de los genes PA0614 y PA0629 en *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Tomado y modificado de Michel-Briand & Baysse, 2002).

### 3. HIPÓTESIS

- 1) La expresión de las enzimas holina y endolisina provenientes de *P. aeruginosa* provocará una lisis de las células de *A. vinelandii* permitiendo liberar al medio el PHB acumulado en las células, ya que la actividad de esas proteínas ha sido demostrada en bacterias Gram-negativas.
- 2) La expresión adicional de los genes *Rz* y *Rz1* del fago  $\lambda$  en las transformaciones construidas promoverá una lisis más eficiente de las células.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. General

1. Obtener una cepa de *A. vinelandii* capaz de realizar su autólisis por acción de proteínas que promueven la lisis celular para permitir una liberación de los gránulos de PHB al medio extracelular.

#### 4.2. Específicos

1. Construir cepas de *A. vinelandii* que expresen los genes PA0614 (holina), PA0629 (endolisina) y *RzRz1* (espaninas) bajo control de un promotor inducible (PscrX) y uno constitutivo (Pc).
2. Evaluar el crecimiento e inducción de la lisis celular en las cepas construidas de *A. vinelandii*.
3. Evaluar la producción de PHB de las cepas obtenidas.
4. Valorar la liberación del PHB al medio extracelular en las cepas construidas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados

Las características de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo tanto de *E. coli* como de *A. vinelandii* se resumen en la Tabla 4. También se presentan las características y nombres de los vectores de expresión y clonación utilizados, y de los oligonucleótidos usados para amplificar los genes de interés.

**Tabla 4.** Cepas bacterianas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados. Las negritas resaltadas en los oligonucleótidos corresponden a los sitios de restricción usados. Tc, tetraciclina; Amp, ampicilina; Gm, gentamicina; Nal, nalidíxico; Sm, estreptomina; Pc, promotor constitutivo; PscrX, promotor inducible por sacarosa; ATG, codón de inicio; SD, sitio Shine-Dalgarno.

CEPAS BACTERIANAS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
<i>Azotobacter vinelandii</i> OP	Cepa parental; alta acumulación de PHB; no mucoide; Nal <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
<i>A. vinelandii</i> OPLYS	Porta el gen PA0629 bajo regulación de Pc; Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i> OPLYS/HOL	Derivada de la OPLYS; porta los genes PA0614 y PA0629 bajo regulación de PscrX y Pc respectivamente; Tc <sup>r</sup> y Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i> OPLYS/HOLsac	Porta los genes PA0614 y PA0629 bajo regulación de PscrX; Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Cepa para clonación; Sm <sup>r</sup>	Invitrogen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Fuente de obtención de los genes PA0614 y PA0629	Donación del Dr. Miguel Cocotl Yanez, IIBM-UNAM
PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
pJET1.2/blunt	Vector de clonación	Thermo Fisher Scientific
pJET::holina	Posee el gen PA0614 con su ATG y SD	Este trabajo
pJET::lys	Posee el gen PA0629 con su ATG y SD	Este trabajo
pJET::lysGm	Posee el gen PA0629 sin su ATG ni SD	Este trabajo
pJETR200420	Posee promotor Pc; Amp <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
pUMATc	Posee locus "neutro" <i>melA</i> para recombinar en el genoma de <i>A. vinelandii</i> ; Tc <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
pUC19upscrx-phaG-PA3924loxGm-downscrx*	Contiene locus "neutro" <i>scrX</i> para recombinar en el genoma de <i>A. vinelandii</i> ; Gm <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
pUMATc::lysGmR2	Posee el gen PA0629; locus "neutro" <i>melA</i> para recombinación en <i>A. vinelandii</i> ; Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pUC19::PA0614NS	Deriva del pUC19scrx; contiene el gen PA0614; Gm <sup>r</sup> ; locus "neutro" <i>scrX</i> de recombinación en <i>A. vinelandii</i>	Este trabajo
pUC19::holina-lisina	Deriva del pUC19::PA0614NS; contiene los genes PA0614 y PA0629 bajo regulación de PscrX; Gm <sup>r</sup> ; locus "neutro" <i>scrX</i> de recombinación en <i>A. vinelandii</i>	Este trabajo
OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA 5' -> 3'	USO
UP629GM	CATGGGATCCAAACTGACCGAGCAGC	Amplificación del gen PA0629

DW629GM	ATTCTCTAGAGCCGGCTCATGACAGCAC	Amplificación del gen PA0629
UP629	GATCATCGATATCGGAGTGCAGGAGGAT	Amplificación del gen PA0629
DW629	TACTATCGATGCCGGCTCATGACAGCAC	Amplificación del gen PA0629
UP0614	GGTCGGTACC GCGTCCCCAGGGAGGCAC	Amplificación del gen PA0614
DW0614	GGTCGGATCCCTTCGATCAGTTTCAATG	Amplificación del gen PA0614
MelAI-F	GGCCTTCTACCTGTCCTTC	Comprobación de recombinación en <i>A. vinelandii</i>
MelAI -R	TGGCGCTTGATGAACCAGG	Comprobación de recombinación en <i>A. vinelandii</i>
scrX-F	TTTCGCTCTGCTCCAGAAG	Comprobación de recombinación en <i>A. vinelandii</i>
scrX-R	CTTACAACGGCCACCTAGA	Comprobación de recombinación en <i>A. vinelandii</i>
F-LYSc-Rz	GCAGTCTAGACAGAGAGATTGATGTATGAGC	Amplificación de los genes <i>Rz</i> y <i>Rz1</i> del fago $\lambda$
R-LYSc-Rz	CTATCTAGACTAGATCTTATGGGCAACTCTATCTGC	Amplificación de los genes <i>Rz</i> y <i>Rz1</i> del fago $\lambda$
FwlysGm	AGGCGATTGCCGACAACA	rtPCR del RNA total de la cepa OPLYS
RvlysGm	GCCCGGTGATTGTAGCAAG	rtPCR del RNA total de la cepa OPLYS

\*Para más practicidad, en el texto y en la tabla anterior se menciona como pUC19scrx

## 5.2. Condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de *A. vinelandii* en medio sólido y líquido se utilizó medio Burk Sacarosa (BS) o Burk Glucosa (Tabla 5). El medio BG se usó para aquellas cepas que poseen los genes que codifican proteínas con actividad lítica y cuya expresión es inducida con sacarosa. Para promover condiciones de no producción de PHB, se utilizó medio Burk Acetato (BA), teniendo como fuente de carbono acetato en lugar de sacarosa o glucosa. En medio sólido, la concentración de agar fue 1.5% y después de añadirle agua se esterilizó en autoclave. Todas las soluciones se esterilizaron también en autoclave. La concentración de los reactivos para los tres medios se encuentra en la Tabla 3.

La concentración de antibiótico utilizado para seleccionar las células transformadas en las que ocurrió recombinación y remplazo alélico fue la siguiente: 1  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina (Gm) y 30 y 60  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina (Tc). Las cepas de *A. vinelandii* usadas en cada experimento fueron sembradas con un asa bacteriológica en esterilidad e incubadas a 30 °C de 24 a 48

horas. Cuando las cepas eran crecidas en medio líquido, se incubaron a 30°C con una agitación de 200 rpm.

Para la preparación de células competentes de *A. vinelandii* se crecieron en cajas de medio sólido CM, el cual se prepara con todas las sales de los medios BS y BG con la excepción de NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O y FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O. El protocolo para preparar células competentes se describe en la sección 5.3.

**Tabla 5.** Reactivos utilizados para preparar los medios Burk Sacarosa (BS), Burk Glucosa (BG), Burk Acetato (BA) y CM.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN EN g/L
Sacarosa (BS) o Glucosa (BG) o C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	20
Amortiguador fosfatos (pH = 7.2)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.073
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.183
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.160
NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (excepto en CM)	0.0002
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (excepto en CM)	0.005

*E. coli* fue crecida en medio Luria Bertani (LB) (Tabla 6), tanto en líquido como en sólido con agar 1.5%. Dependiendo del vector que tuviera la cepa, la concentración de antibiótico fue la siguiente: 200 µg/ml de ampicilina (Amp), 10 µg/ml de Gm y 15 µg/ml de Tc. En la Tabla 6 se muestran la composición del medio LB. Igual que en *A. vinelandii*, antes de cada experimento las cepas utilizadas fueron sembradas y crecidas “overnight” a 37°C. En medio líquido se incubaron a la misma temperatura, pero con agitación a 200 rpm.

**Tabla 6.** Reactivos utilizados para medio Luria Bertani (LB)

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN EN g/L
Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agua destilada	

### 5.3. Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

Para que ocurrieran los eventos de transformación y recombinación en las cepas de *A. vinelandii* a partir de los vectores utilizados en este trabajo, se prepararon células competentes de *A. vinelandii*. El protocolo consistió en los siguientes pasos: se creció *A. vinelandii* OP en medio sólido BS por 48 horas a 30°C. Las células se sembraron 2 veces en medio sólido CM y se incubaron por 24 hrs a 30°C. En un tubo de centrifuga estéril se recogieron todas las células y se resuspendieron en solución acuosa de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Se centrifugó 7 minutos a 7,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla

en 250 µl de CM líquido. Se almacenaron las células en tubos eppendorf en refrigeración a -4°C hasta su uso. Todas las cepas de *A. vinelandii* que se construyeron en este trabajo se sometieron previamente a este protocolo para hacerlas competentes.

#### 5.4. Transformación de células de *A. vinelandii*

Para transformar las células competentes de *A. vinelandii*, primero, con una enzima de restricción de sitio único se procedió a digerir el vector correspondiente para hacerlo lineal. Dicho vector contenía el gen o genes de interés, un casete de resistencia a antibiótico y la región neutra de remplazo alélico para permitir el evento de doble recombinación en el genoma de *A. vinelandii*. El protocolo es el siguiente: en un tubo Eppendorf 1.5 ml se mezclaron 150 µl de la suspensión de células competentes de *A. vinelandii* OP y el plásmido linearizado (una cantidad de DNA >50 ng/µl) que lleva el gen o genes que se querían recombinar en el genoma bacteriano. Se incubó 10 minutos en hielo. La mezcla de células competentes/plásmido se colocó en cajas con medio CM sólido y con un asa bacteriológica se esparció en forma circular, sin extenderse demasiado en la caja. Se incubó a 30°C de 24 a 48 horas para favorecer la transformación y permitir la recombinación genética. Con un asa se recogieron todas las células y se resuspendieron en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se centrifugó 1 minuto a 13,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 500 µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Se sembró con ayuda de perlas estériles en cajas de BS sólido con el antibiótico o antibióticos para seleccionar las células transformantes en donde ocurrió el remplazo alélico. Se incubó a 30°C por 48 horas.

#### 5.5. Preparación de células competentes de *E. coli*

Se siguió el siguiente protocolo para obtener células competentes de *E. coli* TOP 10: se transfirió una colonia crecida en medio LB sólido a otra caja con el mismo medio y se incubaron 16-20 horas a 37°C. Se inocularon a partir de esta caja 5 ml de LB líquido en un tubo de ensayo, y se incubaron 16-20 horas en agitación a 200 rpm. Posteriormente, se inocularon 100 ml de LB con 1 ml del cultivo previo y se incubó por aproximadamente 3 horas a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una D.O. a 650 nm de 0.4-0.5. Para recuperar las células se transfirió el cultivo a tubos de propileno enfriados previamente en hielo durante 10 minutos. Se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min a 4°C, y se resuspendieron las células en 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y se dejó reposar 15 min en hielo. Después se volvieron a centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y 14 % de glicerol por cada 50 ml de cultivo original. Finalmente, se separaron alícuotas de 0.4 ml/tubo Eppendorf de 1 ml y se almacenaron a -70°C.

#### 5.6. Extracción de DNA plasmídico, técnica del perclorato

Se extrajo DNA plasmídico de las células de *E. coli* para todas las reacciones de digestión, ligación, y transformación. Se siguió el método de extracción por perclorato: de un cultivo de 12 a 16 horas de *E. coli* se tomó 1.5 ml y se centrifugó 5 min a 7000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 175 µl de TES (15% sacarosa, 50 mM TROS Ph 8.5, 50 Mm EDTA pH 8.0). La muestra

se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadió 25 µl de lisozima (10 mg/ml). Se incubó la muestra 20 minutos en hielo. Se añadieron 400 µl de agua helada y se incubó 15 min a 73°C. Después de centrifugó 15 min a 13,000 rpm. Se descartó el pellet y a la fase acuosa se añadió 60 µl de NaClO<sub>4</sub> 5M y 600 µl de isopropanol. Se mezcló bien y se centrifugó 15 min a 13,000. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó 10 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar y se resuspendió el pellet en 50 µl de RNasa 20 µg/ml.

### 5.7. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para transformar *E. coli* con los diferentes plásmidos utilizados en este trabajo se siguió el siguiente protocolo: en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se colocaron 200 µl de la suspensión de células competentes *E. coli* TOP10 y se añadieron aproximadamente 50-100 µl de DNA plasmídico purificado con los genes de interés. Se mezclaron suavemente con una micropipeta y se incubó la mezcla 30 minutos en hielo. Se aplicó un choque térmico durante 5 minutos a 37°C. En tubos de ensayo se colocó toda la mezcla y se añadió 1 ml de LB. Se incubaron por 1 hora a 37°C a 200 rpm. Finalmente se sembró en cajas Petri con LB con el antibiótico correspondiente para seleccionar y se incubaron 12-16 horas a 37°C.

### 5.8. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar los genes que se querían clonar a partir de DNA purificado de *P. aeruginosa* se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su nombre en inglés, Polymerase Chain Reaction). Ya que *A. vinelandii* es una bacteria poliploide, también se utilizó PCR de colonia para demostrar que en las cepas construidas, la totalidad de los cromosomas contenían el alelo mutante. Para las reacciones se utilizaron cualquiera de estas dos enzimas de alta fidelidad: Taq DNA polymerase y Phusion High-Fidelity, ambas de Thermo Fisher Scientific. Los oligonucleótidos usados (Tabla 4) para todas las reacciones fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Las condiciones de la reacción de PCR de los genes PA0614 (holina) y PA0629 (endolisina) de *Pseudomonas aeruginosa* fueron: 10 µl de Buffer GC, 5 µl de dNTPs, 2.5 µl de cada oligonucleótido, 2 µl de DMSO, 1 µl de DNA de *P. aeruginosa* PAO1, 0.2 µl de enzima Phusion, completando a 50 µl con H<sub>2</sub>O. Se realizaron 30 ciclos de: 98 °C 30 segundos en la desnaturalización, un gradiente de 58, 60 y 62°C 30 segundos en alineamiento, y 72°C 30 segundos en extensión. Una vez confirmados los tamaños de los genes amplificados por PCR en un gel de electroforesis, se procedió a purificar los fragmentos de la PCR. Las muestras elegidas fueron: PA0614 a 58°C, PA0629 a 62°C, y PA0629Gm a 62°C. Una vez corrida la electroforesis en gel de agarosa, se cortó la banda y se siguió el protocolo de Thermo Fisher Scientific con el "GeneJET PCR Purification Kit". Los fragmentos fueron clonados en el vector pJET1.2/blunt de Thermo Fisher Scientific con el protocolo mencionado abajo, y para confirmar que no hubiera mutaciones, los fragmentos clonados se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, del Instituto de Biotecnología. Los plásmidos derivados del pJET1.2/blunt que tienen los genes PA0614 y



PA0629 fueron almacenados en LB/glicerol 40% a  $-70^{\circ}\text{C}$ , con los nombres pJET::holina, pJET::lysGm y pJET::lys.

Para las reacciones de PCR de colonia se utilizó la enzima Taq DNA Polymerase. El DNA cromosomal molde para la reacción se obtuvo por lisado celular con el siguiente protocolo: desde una caja con la o las colonias candidatas elegidas se recogieron las células con un asa bacteriológica y se mezclaron con 50  $\mu\text{l}$  de agua Mili-Q estéril. Posteriormente se incubaron a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Después se centrifugaron a 13000 rpm por 20 min. El DNA liberado quedó en el sobrenadante y fue el que se usó como molde. Se tomaron 5  $\mu\text{l}$  de este sobrenadante para la reacción.

### 5.9. Extracción de RNA y PCR con transcriptasa inversa (rtPCR)

El RNA total de las células de *A. vinelandii* se utilizó para comprobar la presencia de transcritos del gen PA0629 mediante PCR con transcriptasa inversa. Para ello, se extrajo el RNA de las células mediante el protocolo de extracción con trizol: se recuperaron las células de cultivos de 48 horas obteniendo un pellet de células entre 50 y 100  $\mu\text{l}$ . Dicho pellet se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de trizol y se congelaron rápidamente en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los tubos se descongelaron en hielo y se centrifugaron 5 minutos a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se desechó el pellet. Se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo al sobrenadante y la muestra se agitó en un equipo vórtex por 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase acuosa (fase superior) se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol y se mezcló invirtiendo el tubo. Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos. Después, se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante con una pipeta. En este punto, se obtuvo un pellet blanco, que corresponde al RNA. Para lavar el RNA se agregaron 700  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% y se invirtió el tubo 3 veces. Se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm y a  $4^{\circ}\text{C}$  y se retiró el sobrenadante con una pipeta. Este paso de lavado se repitió por segunda ocasión retirando el etanol. El etanol restante se dejó que se evaporara por completo colocando los tubos hacia abajo sobre una toalla de papel por 7 minutos. El RNA se resuspendió en 20 a 40  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAsas y se cuantificó en un equipo nanodrop. La presencia de RNA en la muestra también se comprobó en un gel de agarosa. El RNA se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Antes de usar las muestras de RNA extraído, se colocaron en hielo para descongelar lentamente. Una vez que se descongeló lo suficiente, se removió el DNA presente en las muestras de RNA con el kit "DNase I, RNase-free" de Thermo Scientific siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez tratada la muestra se hizo una PCR punto final para comprobar que no existieran remanentes de DNA. Una vez comprobado esto, se procedió a hacer el cDNA con la muestra, siguiendo el protocolo "Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptase" con las indicaciones del fabricante. Una vez que se obtuvo el

cDNA se hizo una PCR con los oligos FwlysGm RvlysGm para comprobar la transcripción del gen de interés.

#### 5.10. Digestiones de DNA con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: XbaI, BamHI, BglII, AgeI, XhoI, NdeI, Sall, EcoRI, EcoRV, ClaI, KpnI. Todas de Thermo Fisher Scientific y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Cuando se realizaron dobles digestiones se utilizó la página web del fabricante en la sección de herramientas "Double digest".

Cuando se requirió hacer reacciones de digestión parciales con KpnI se hizo una dilución 1:10 de la enzima con agua Mili-Q. En 5 tubos Eppendorf se añadieron 5 µl del plásmido purificado por perclorato. Se añadió una cantidad escalonada de la mezcla agua/enzima, comenzando desde 1 µl hasta 5 µl, se añadió 2.5 µl del buffer KpnI y con agua Mili-Q se llevó a 20 µl. Se incubaban a 37°C por 30 minutos. Pasado el tiempo se checó por electroforesis en gel de agarosa, y si se observaba la banda deseada, se procedió a inactivar la enzima según las recomendaciones del fabricante y después se purificó la banda del tubo o tubos que se habían digerido mejor.

#### 5.11. Reacciones de ligación

En las reacciones de ligación de fragmentos de DNA se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific). Cuando se ligaron fragmentos de DNA en el vector pJET se usó el PCR Cloning Kit de Thermo Scientific siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se ligaron fragmentos de DNA con otros plásmidos, la concentración de DNA utilizada era de 50 ng del vector por 100 ng del fragmento si eran extremos cohesivos, y 50:150 si eran extremos rasurados, siguiendo este protocolo: 2-4 µl de Buffer ligasa, 1 µl de ATP y 1 µl ligasa en un volumen final de 20 µl. Se incubó la ligación 12-16 horas a 21°C y posteriormente se transformaron células de *E. coli* TOP 10 con el protocolo descrito arriba.

#### 5.12. Separación de fracciones celulares en gradientes discontinuos de densidad

Para comprobar la liberación de gránulos de PHB de la célula después de un tratamiento de choque osmótico, se realizó la técnica de ultracentrifugación en gradiente discontinuo de glicerol, siguiendo este protocolo: las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en medio BS por 48 horas en agitación a 30°C en matraces de 250 ml. Se colectó todo el cultivo en tubos falcon de 50 ml y centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y los controles se resuspendieron en el mismo volumen con una solución isotónica de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, y los cultivos problema en el mismo volumen de H<sub>2</sub>O milli-Q para someterlas a un estrés osmótico. Se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y se centrifugaron los tubos 5 minutos a 5000 rpm. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

Las fracciones resultantes del tratamiento anterior se separaron en gradientes discontinuos de densidad de la siguiente manera: en tubos de centrifuga Beckman 25x89 mm se

colocaron 5 ml de glicerol al 87%. Después se añadieron 10 ml de glicerol al 50% teniendo cuidado de no mezclar ambas soluciones. El pellet resuspendido con  $\text{MgSO}_4$  10 mM se colocó en la parte superior de los tubos con las soluciones de glicerol. Los tubos se colocaron en un rotor SW 28 Swinging-Bucket y se centrifugaron en una ultracentrífuga Ultra-Clear (Beckman) a 68589 g a 4°C durante 40 min.

### 5.13. Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Los valores de PHB se expresaron en  $\mu\text{g}$  de PHB por miligramo de proteína, por lo que se cuantificó proteína por el método de Lowry (1951). Para ello, se obtuvo 1 ml de los cultivos celulares de 48 horas de *A. vinelandii* y se centrifugaron 5 minutos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 200  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q. Se añadió 1 ml de solución reactiva (49 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en  $\text{NaOH}$  0.1 N; 0.5 ml tartrato de Na y K 2%; 0.5 ml  $\text{CuSO}_4$ ) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Folin diluido con 1 volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se cuantificó la absorbancia a 625 nm en un espectrofotómetro. Simultáneamente se realizó una curva de calibración usando diferentes concentraciones de albúmina sérica Sigma (stock 1 mg/ml) sometiéndola al mismo procedimiento que las muestras problema.

### 5.14. Cuantificación de PHB por el método Law & Splecky (1960)

El contenido de PHB de las cepas de *A. vinelandii* se cuantificó a partir de muestras de 1 ml de cultivos de 48 horas. Estas muestras se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm. Las células resultantes se lavaron con 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Después se agregó 1 ml de hipoclorito de sodio comercial al 30 % (concentración final aproximada 2%) y se resuspendió e incubó una hora a 30 °C. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se decantó la muestra. Las células se lavaron con 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q y se centrifugaron 5 minutos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol absoluto y se resuspendió. Se centrifugó por 3 minutos a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de acetona y se resuspendió el precipitado. Se centrifugó por 3 minutos a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante con el mismo cuidado. Se dejaron secar las muestras toda la noche y después el PHB obtenido se disolvió en 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calentaron los tubos a 95°C durante 10 minutos, lo que convierte el PHB en ácido crotónico. Se dejaron reposar las muestras por 10 minutos y se procedió a hacer las diluciones necesarias con ácido sulfúrico concentrado. Por último, se procedió a leer en el espectrofotómetro a 235 nm en celdas de cuarzo con ácido sulfúrico como blanco. Los resultados de la cuantificación de PHB se obtuvieron mediante la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \Sigma C l$$

donde:

A = absorbancia

C = concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )

$\Sigma$  = coeficiente de extinción molar del ácido crotónico ( $15600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

l = longitud de la celda (1 cm)

De los mismos cultivos de donde se obtuvo la muestra para cuantificar el PHB y proteína, se tomó 1 ml para determinar la biomasa mediante el peso seco celular. Las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante se secaron las muestras en un horno a 70°C por 24 horas, o hasta que el peso fuera constante. Antes de tomar la muestra, todos los tubos utilizados fueron pesados previamente en una balanza analítica.

### 5.15. Ensayo de viabilidad y estrés osmótico

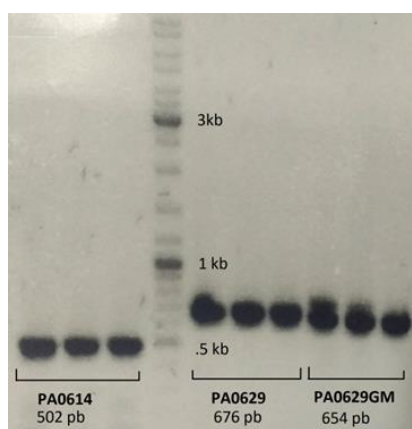
Para evaluar la reacción de las cepas que portan los genes que expresan productos líticos a un choque osmótico se realizó el siguiente ensayo: se crecieron cultivos de *A. vinelandii* en matraces de 250 ml con 50 ml de medio BS hasta las 48 horas a 30°C en agitación. Se tomó 1 ml como muestra del cultivo, se hicieron diluciones y se sembró en cajas con medio BS sólido para determinar las cuentas viables. El cultivo restante se centrifugó por 7 minutos a 7000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en agua Milli-Q para someter a las células a un estrés osmótico. Se dejaron a temperatura ambiente en esta condición durante 1 hora, y posteriormente se tomaron muestras de 1 ml. Se hicieron diluciones y se sembró en cajas de BS para determinar las cuentas viables. Para evaluar si el factor tiempo afecta la viabilidad de las células al permanecer en esta condición de estrés osmótico, el cultivo restante se dejó por otra hora en agua, y se volvió a tomar 1 ml para hacer diluciones y sembrar en cajas de medio BS. Todas las cajas se incubaron a 30°C por aproximadamente 48 horas y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Construcción de *A. vinelandii* OPLYS, una cepa que expresa una endolisina

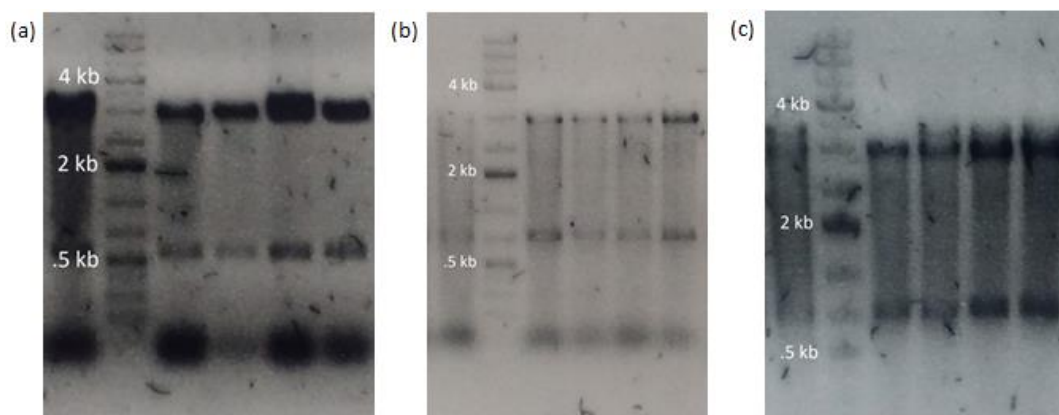
Con la finalidad de construir cepas de *A. vinelandii* productoras de PHB que expresen un sistema lítico que facilite la extracción de este bioplástico, se analizó el efecto de la expresión de los genes PA0614 (holina) y PA0629 (endolisina) de *P. aeruginosa* sobre *A. vinelandii*, cuyos productos participan en procesos que implican la lisis celular: para la formación de biofilms y posiblemente cuando libera pirocinas al medio extracelular (ver sección 2.8). Estos genes fueron seleccionados debido a que *A. vinelandii* es una bacteria filogenéticamente muy cercana al género *Pseudomonas* (Özen & Ussery, 2012), y tomando en cuenta los resultados de la actividad de sus productos (Nakayama *et al.*, 2000; Turnbull *et al.*, 2016), decidimos clonar estos genes para recombinarlos en el genoma de *A. vinelandii* OP bajo regulación de dos promotores, uno inducible con sacarosa (Pscrx) y uno constitutivo (Pc), y estudiar su actividad lítica. Pscrx es un promotor propio de *A. vinelandii*, del cual ya se ha estudiado su función (Johnson *et al.*, 2006). Pc es un promotor fuerte que se obtuvo a partir de un caset de resistencia a gentamicina.

Para ello, los genes PA0629 y PA0614 (el primero para construir la cepa OPLYS y el segundo para las cepas de la sección 6.2) se amplificaron por PCR desde DNA cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1 con los oligonucleótidos UP629GM DW629GM, UP629, DW629, UP0614 y DW0614 (Tabla 4). Los tamaños de los genes desde el codón de inicio al codón de término son de 450 pb (PA0614) y 630 pb (PA0629). El gen PA0629 se amplificó sin tomar su ATG (Figura 17, carriles PA0629) para colocarlo bajo regulación del promotor Pc, que tiene su propio ATG y sitio Shine-Dalgarno (SD), y también se amplificó tomando tanto su ATG como su sitio Shine-Dalgarno (Figura 17, carriles PA0629GM) para colocarlo bajo el promotor Pscrx. Por electroforesis en gel de agarosa se corroboró el producto amplificado por la PCR (Figura 17).



**Figura 17.** Electroforesis de DNA en gel de agarosa de los genes PA0614 y PA0629 de *P. aeruginosa* PAO1 amplificados por PCR.

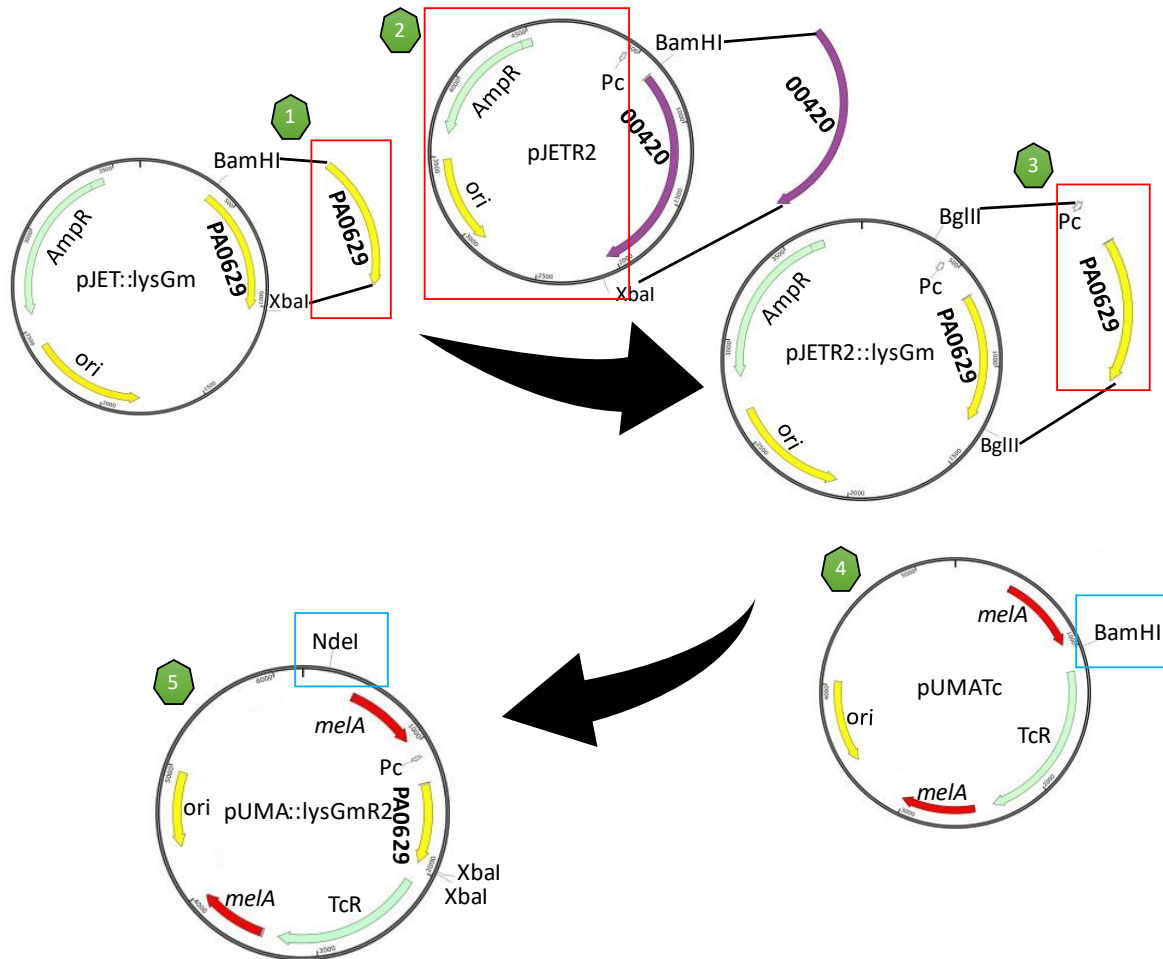
Después se procedió a purificar los fragmentos de DNA que contienen los genes amplificados por PCR desde un gel de agarosa con el “GeneJET PCR Purification Kit” de Thermo Scientific. Los fragmentos de DNA purificados fueron clonados en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Fisher) con el “PCR Cloning Kit” de Thermo Scientific y se transformaron células de *E. coli* TOP10 en cajas Petri con medio LB/ampicilina para seleccionar. A los vectores les llamamos pJET::holina (con el gen PA0614, incluyendo SD y ATG), pJET::lys (con el gen PA0629, incluyendo SD y ATG) y pJET::lysGm (con el gen PA0629, sin su SD ni ATG). Posteriormente se purificaron los 3 plásmidos por la técnica del perclorato y se realizó digestión enzimática con BglII. El pJET1.2/blunt posee dos sitios BglII que flanquean los genes. Por electroforesis en gel se comprobó la liberación de los genes después de la digestión (Figura 18) y se secuenciaron para confirmar que no se introdujeron mutaciones durante la amplificación-clonación.



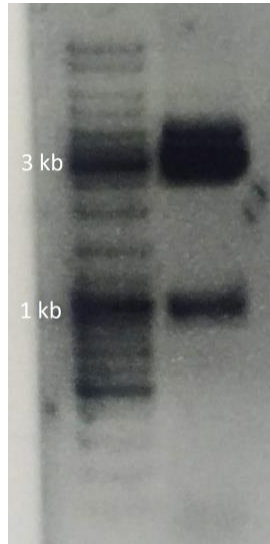
**Figura 18.** Digestiones con BglII de los vectores pJET::holina, pJET::lys y pJET::lysGm. (a) Gen PA0614; los cuatro carriles después del marcador muestran una banda de 548 pb. (b) y (c) Gen PA0629; en los carriles después del marcador se muestra una banda de 722 y 699 pb respectivamente.

Para construir la cepa *A. vinelandii* OPLYS, cuya característica es que expresa el gen PA0629 bajo el promotor constitutivo Pc, primero generamos el vector pUMA::lysGmR2, el cual posee las regiones que recombinan en el locus de *melA* de *A. vinelandii*. Para ello utilizamos los siguientes vectores: pJETR2, del cual obtuvimos el promotor Pc, cuyo origen es de un casete de resistencia a gentamicina; pJET::lysGm (Figura 19), el cual fue construido con el gen PA0629 amplificado por PCR sin su ATG (debido a que el vector pJETR2 posee tanto el promotor Pc como su propio codón de inicio); y el pUMATc, el cual posee las secuencias del locus de *melA* de *A. vinelandii*. Los pasos para la generación del vector pUMA::lysGmR2 son los siguientes (la Figura 19 resume todos los pasos): 1) extracción del plásmido pJET::lysGm desde células de *E. coli* y su digestión enzimática con BamHI y XbaI para escindir el gen PA0629; 2) extracción del plásmido pJETR2 desde células de *E. coli* y su digestión enzimática con BamHI y XbaI para escindir el gen 00420 y poder utilizar el vector para nuestro gen de interés; 3) reacción de ligación de los fragmentos de DNA obtenidos en los pasos 1 y 2 y transformación de células de *E. coli* para generar el vector pJETR2::lysGm. Posteriormente dicho vector se sometió a digestión enzimática con BglII para escindir un fragmento de DNA

que contiene el promotor Pc seguido del gen PA0629 (Figura 20); 4) extracción del plásmido pUMATc desde células de *E. coli* y digestión enzimática con BamHI para abrir su secuencia y poder hacer la reacción de ligación con el fragmento del paso 3; 5) reacción de ligación de los fragmentos de DNA obtenidos en los pasos 3 y 4 y transformación de células de *E. coli* para obtener el vector pUMA::lysGmR2.



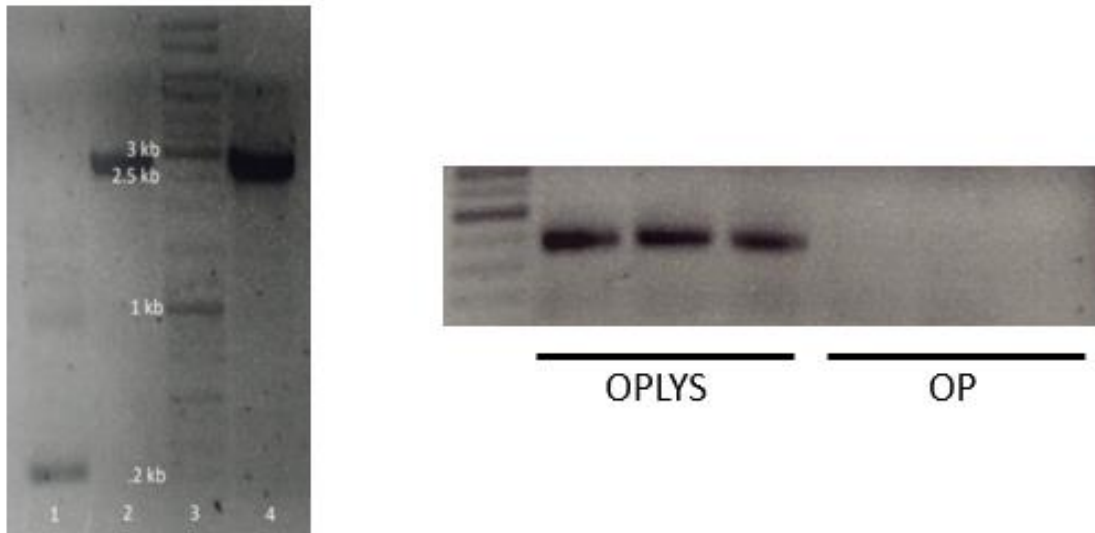
**Figura 19.** Construcción del plásmido pUMA::lysGmR2. Los fragmentos en recuadros rojos son los segmentos de interés que se usaron en cada reacción de ligación posterior. Los recuadros azules muestran los sitios de restricción que se usaron para abrir la secuencia del plásmido.



**Figura 20.** Gel de agarosa donde se muestra el fragmento liberado de 948 pb del vector pJETR2::lysGm de 3876 pb después de haberlo digerido con la enzima BglIII. El fragmento contiene el promotor Pc seguido del gen PA0629.

Para permitir los eventos de recombinación en el genoma de *A. vinelandii* con el vector pUMA::lysGmR2, este se colocó en una reacción de digestión con la enzima NdeI para obtener su secuencia lineal. Con dicho vector lineal se realizó la transformación de células de *A. vinelandii* OP. Las células en donde ocurrió el remplazo alélico por doble recombinación del gen *melA* por la región Pc/PA0629/casete de resistencia a tetraciclina (Pc/PA0629/Tc) se seleccionaron en cajas con medio BS/tetraciclina 60 µg/ml. La cepa resultante, denominada OPLYS, se subcultivó al menos 3 veces en esas condiciones para que la región Pc/PA0629/Tc segregara por completo en todos los cromosomas de la bacteria. Recordemos que *A. vinelandii* es una bacteria poliploide, por lo que al transformarla nos interesa que la bacteria no posea el alelo silvestre. Se comprobó por PCR de colonia con los oligonucleótidos MelAI-F y MelAI-R que la región Pc/PA0629/Tc segregó por completo en el genoma, ya que no pudo observarse el alelo silvestre (Figura 21, izquierda). Para comprobar la transcripción del gen PA0629 en la cepa OPLYS, se extrajo RNA total con trizol, para posteriormente tratarlo con DNasa y utilizarlo para hacer rtPCR. En un gel de agarosa se comprobó la existencia de dichos transcritos (Figura 21, derecha).





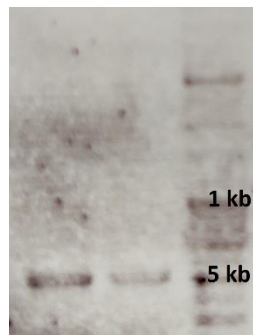
**Figura 21.** PCR y rtPCR de la cepa OPLYS. Izquierda: electroforesis de DNA en gel de agarosa de la PCR de la cepa OPLYS con los oligos MeIAI-F y MeIAI-R. Carril 1: tamaño silvestre, 201 pb de la cepa OP. Carriles 2 y 4: tamaño de la cepa OPLYS con 2668 pb. Derecha: gel de agarosa de la rtPCR de la cepa OPLYS. La banda de 300 pb indica la existencia de transcritos, no presentes en la OP.

#### 6.1.1. La expresión simultánea de una endolisina y espaninas es letal en *E. coli*

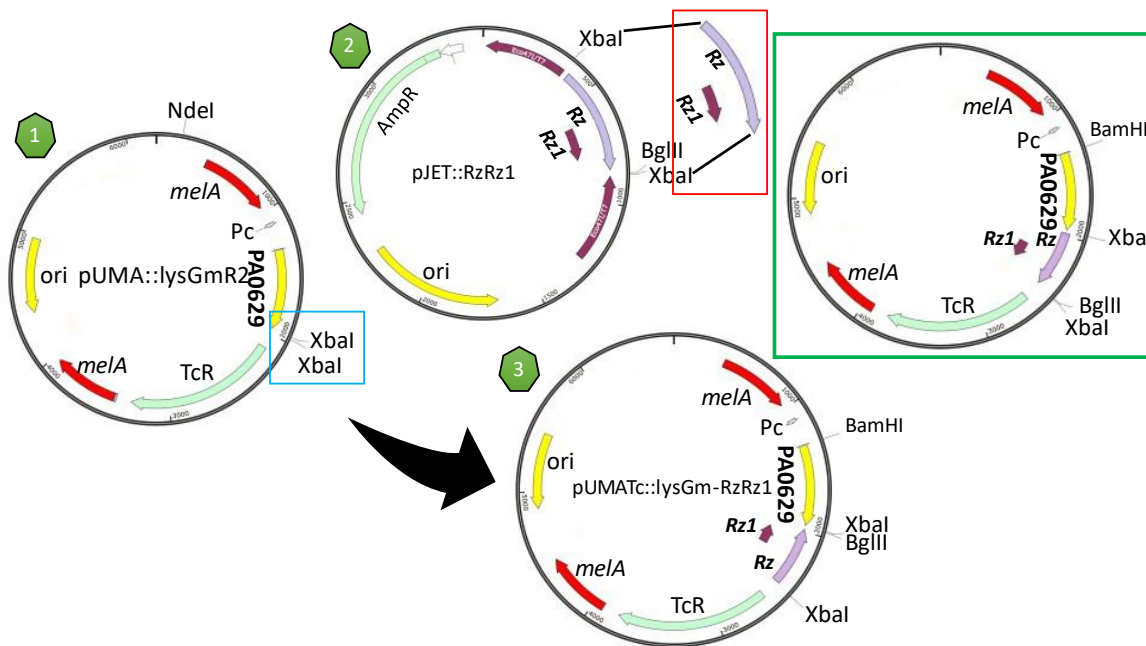
Para evaluar el efecto de la expresión en *A. vinelandii* de las moléculas de espaninas en combinación de las de endolisina, se decidió seguir una estrategia en la cual los genes PA0629 y *RzRz1* son regulados por el promotor constitutivo Pc. El primer paso para ello fue construir una cepa de *E. coli* que contuviera un vector con dichos genes regulados por Pc, para después permitir los eventos de recombinación en el genoma de *A. vinelandii*.

Con esta finalidad, se amplificaron los genes *RzRz1* por PCR usando DNA del fago lambda, obtenido en Thermo Scientific, con los oligos F-LYSc-Rz y R-LYSc-Rz (Tabla 4) (Figura 22). Posteriormente, el fragmento *RzRz1* se clonó en el vector pJET1.2/blunt, dando origen al vector pJET::RzRz1, el cual se secuenció para comprobar que no existieran mutaciones. Además también se usó el vector pUMA::lysGmR2, descrito en la sección 6.1. Los pasos para la construcción del plásmido pUMATc::lysGm-RzRz1 fueron los siguientes (Figura 23): 1) extracción del plásmido pUMA::lysGmR2 desde células de *E. coli* y su digestión enzimática con XbaI para obtener su secuencia abierta; 2) extracción del plásmido pJET::RzRz1 desde células de *E. coli* y su digestión con XbaI para extraer los genes *RzRz1*; 3) reacción de ligación de los fragmentos de DNA obtenidos en los pasos 1 y 2 y transformación de células de *E. coli*. Al diseñar el oligo R-LYSc-Rz (Tabla 4) que se usó para amplificar los genes *RzRz1*, se colocó el sitio de restricción BglII para comprobar la orientación de los genes una vez insertados en el vector pUMA::lysGmR2. Después de haber generado las cepas candidatas de *E. coli* portadoras del plásmido pUMATc::lysGm-RzRz1 se incubaron 12-16 horas a 37°C. Se eligieron 24 candidatas. Se extrajo plásmido por el método de perclorato de cada candidata y se realizaron reacciones de digestión con las enzimas BamHI y BglII. El resultado

de dichas digestiones arrojó el patrón de digestión en donde los genes *RzRz1* se ligaron en la orientación contraria a la transcripción del gen PA0629 (ver mapa del paso 3 de la Figura 23) o solo el vector religado. Ya que nuestro objetivo es que el promotor Pc regule la transcripción tanto de PA0629 como de *RzRz1*, es esencial que su transcripción esté en la misma orientación (ver plásmido en recuadro verde la de Figura 23). Esta reacción de ligación de los fragmentos de los pasos 1 y 2 y transformación de células de *E. coli* se realizó en 3 ocasiones, tomando 24 candidatas en cada una de ellas. Interesantemente todas las candidatas seleccionadas mostraron la misma orientación contraria a la dirección de la transcripción.



**Figura 22.** Genes *Rz* y *Rz1* en un gel de agarosa amplificados por PCR desde el fago  $\lambda$ .



**Figura 23.** Construcción del vector pUMATc::lysGm-RzRz1. El fragmento encerrado en un recuadro rojo es la secuencia de interés usada en la siguiente reacción de ligación. El sitio de restricción encerrado en azul es el sitio que se usó para hacer lineal la secuencia del vector pUMA::lysGmR2.

Tomando en cuenta la actividad muramidasa del peptidoglicano de la endolisina (Figura 9) y de fusión de las membranas de las espaninas (Figura 11), sumado a la incapacidad de

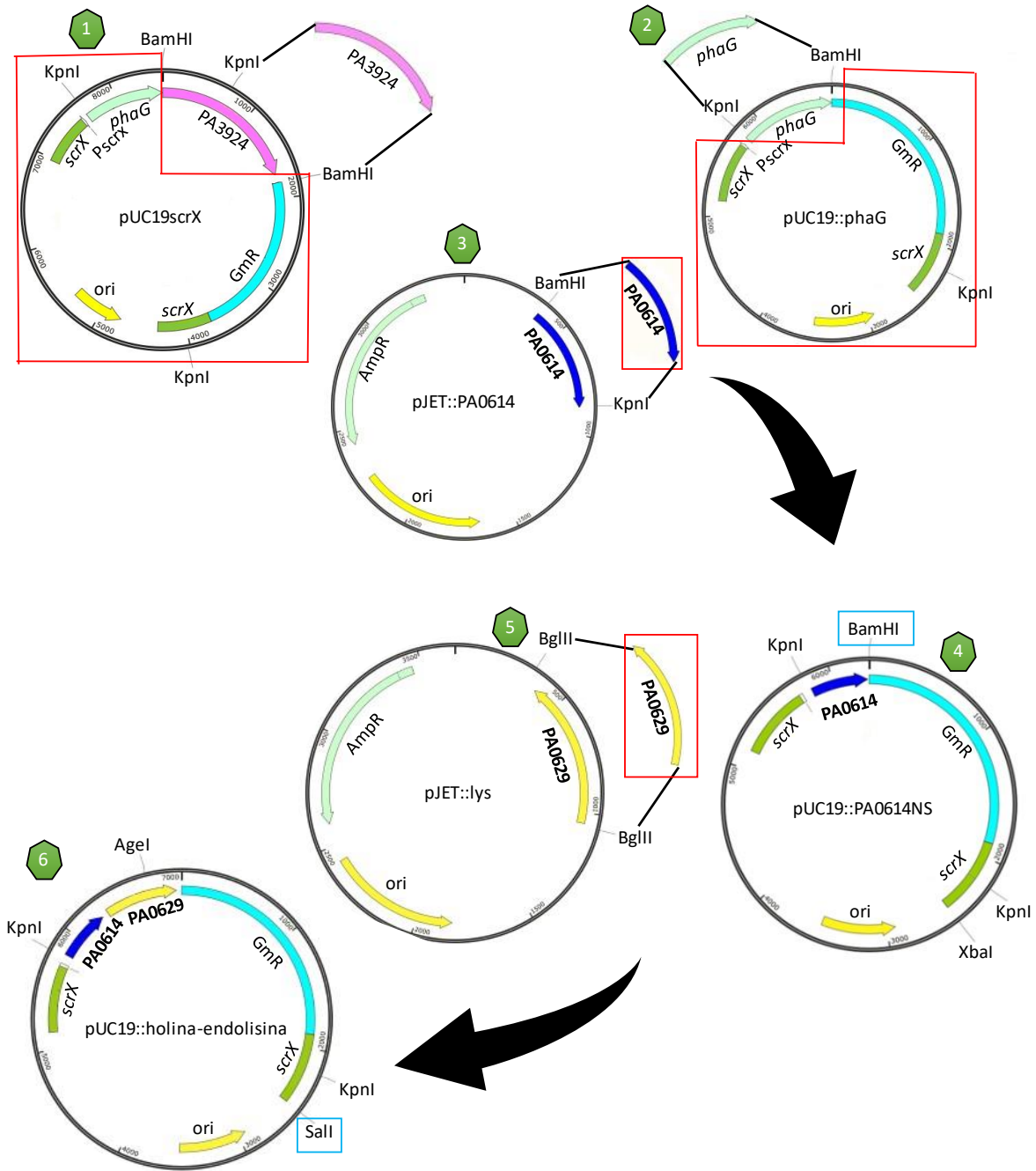
obtener una cepa de *E. coli* que porte un vector con los genes PA0629 y *RzRz1* en el mismo sentido de la transcripción, se dedujo que la combinación de la expresión de estos genes es letal cuando están regulados por un promotor constitutivo como Pc. En el laboratorio se ha reportado una alta generación de transcritos de genes que controla el promotor Pc (Ventura, 2021), por lo que consideramos que lo ideal sería utilizar un promotor en el que se pueda controlar de manera eficiente su activación. La razón de que no hayamos optado por usar el promotor Pscrx para regular los genes PA0629 y *RzRz1*, fue porque las cepas de *A. vinelandii* en las que se logró recombinar los genes PA0614 y PA0629 bajo control de Pscrx, después de varias resiembras en medio sólido o líquido perdieron viabilidad (ver sección 6.3).

## 6.2. Construcción de *A. vinelandii* OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac, cepas que expresan una holina y una endolisina

Para observar cual es la diferencia de la actividad de las proteínas holina (PA0614) y endolisina (PA0629) en células de *A. vinelandii* si las expresamos de diferente manera, construimos otras dos cepas. La primera construcción, la cepa OPLYS/HOL, regula la expresión de moléculas de endolisina (PA0629) bajo el promotor Pc constitutivo y la expresión de las moléculas de holina (PA0614) bajo el promotor inducible por sacarosa Pscrx. En esta cepa, se buscó acumular las moléculas de endolisina en el citoplasma durante el crecimiento, para inducir posteriormente la expresión de la holina a tiempos tardíos para que entonces se permitiera la hidrólisis del peptidoglicano por la endolisina. La segunda cepa, OPLYS/HOLsac, regula ambos genes con el promotor Pscrx, por lo que su expresión ocurre cuando se añade sacarosa al medio.

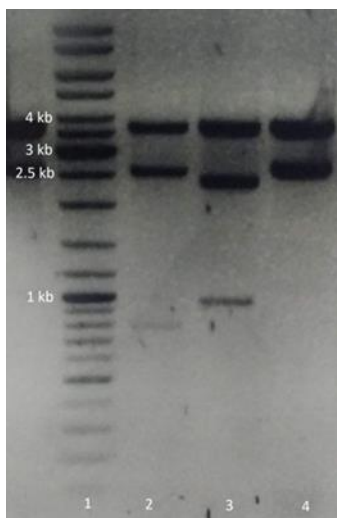
El primer paso para obtener las cepas descritas en el párrafo anterior fue construir los vectores pUC19:PA0614NS y el pUC19::holina-endolisina. Para ello, utilizamos los siguientes plásmidos: el pUC19scrx (Tabla 4) que contiene la región “neutra” *scrX* (Avin\_51780) de *A. vinelandii* la cual sirve para recombinar en el DNA cromosomal de esta bacteria (Figura 24). Al igual que *melA*, *scrX* no codifica productos esenciales para la bacteria, por ello son sitios ideales para hacer inserciones génicas a la bacteria; también se usó el pJET::PA0614, el cual contiene el gen PA0614 que codifica una holina. El orden de las reacciones fue la siguiente (Figura 24): 1) extracción del pUC19:scrX desde células de *E. coli* y su digestión con BamHI para escindir el gen PA3924 que no es de nuestro interés; 2) reacción de ligación del vector resultante en el paso 1 y transformación de células de *E. coli*, generando el vector pUC19::phaG. Después se extrajo este plásmido desde las células portadoras y se hizo una digestión con BamHI y KpnI (parcial) para escindir el otro gen que no es de nuestro interés, *phaG*; 3) extracción del plásmido pJET::PA0614 desde células de *E. coli* y su digestión con BamHI y KpnI para escindir el gen PA0614; 4) reacción de ligación de los fragmentos de DNA obtenidos en los pasos 2 y 3 y transformación de células de *E. coli*, generando el vector pUC19::PA0614NS. Después la secuencia de este último vector se abrió en una reacción de

digestión con la enzima BamHI; 5) extracción del plásmido pJET::lys desde células de *E. coli* y su digestión con BglII para escindir el gen PA0629; 6) reacción de ligación de los fragmentos de DNA obtenidos en los pasos 4 y 5 y transformación de células de *E. coli* para obtener el vector pUC19::holina-endolisina. Para comprobar que la transcripción de los genes PA0614 y PA0629 estén en la misma orientación, se realizó una digestión del vector pUC19::holina-endolisina con las enzimas KpnI y AgeI (Figura 25).



**Figura 24.** Construcción de los plásmido pUC19::PA0614NS y pUC19::holina-endolisina. Los fragmentos de DNA encerrados en recuadros rojos son los que se usaron en las reacciones de

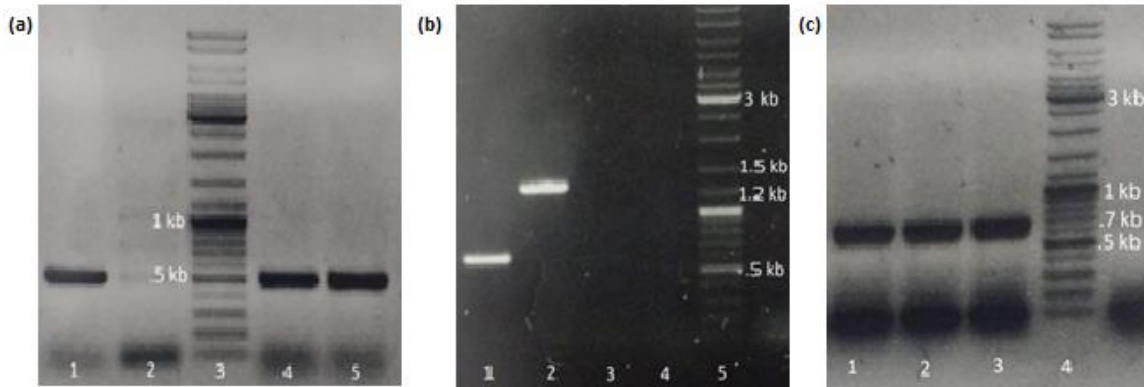
ligación descritas en el texto. Los sitios de restricción encerrados en azul se usaron para abrir los plásmidos.



**Figura 25.** Electroforesis de DNA en gel de agarosa de los fragmentos resultantes de la digestión del pUC19::holina-endolisina con las enzimas KpnI y AgeI.

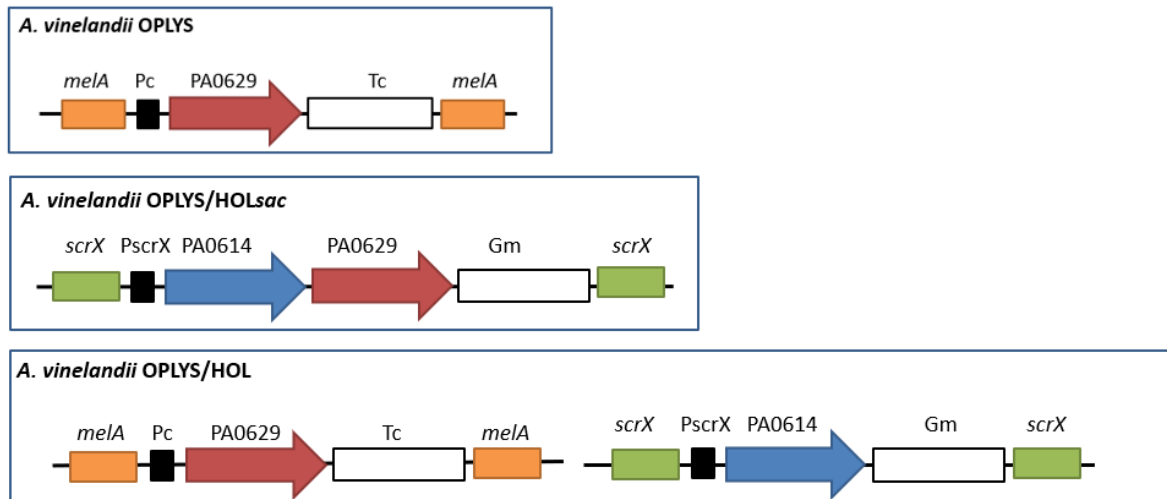
Una vez conseguidas las cepas de *E. coli* que portan los vectores pUC19::PA0614NS y pUC19::holina-endolisina, la cepa *A. vinelandii* OPLYS previamente construida (Sección 6.1) se sometió al protocolo de preparación de células competentes de *A. vinelandii*. Después se extrajo el plásmido pUC19::PA0614NS (Figura 24) desde células de *E. coli* y se sometió a una reacción de digestión con la enzima XbaI para hacer lineal su secuencia. Con este vector se transformaron las células competentes de la cepa OPLYS. Una vez obtenidas colonias candidatas fueron sometidas a PCR de colonia para comprobar que el evento de recombinación y remplazo alélico ocurrió exitosamente en el DNA cromosomal de *A. vinelandii* (Figura 26a). La cepa resultante, resistente a gentamicina y a tetraciclina se denominó *A. vinelandii* OPLYS/HOL.

Posteriormente para la construcción de la cepa OPLYS/HOLsac se utilizó el vector pUC19::holina-endolisina (Figura 24). El vector se extrajo desde células de *E. coli* y se hizo lineal con una reacción de digestión con la enzima Sall para poder transformar células de *A. vinelandii* OP previamente sometidas al protocolo de células competentes. Se sembró y seleccionó en cajas petri con medio BG/gentamicina. Las células elegidas que se transformaron exitosamente se subcultivaron varias veces en esas condiciones. Por PCR de colonia se confirmó que por doble recombinación los genes PA0629 y PA0614 se insertaron en el genoma de *A. vinelandii* (Figura 26). La cepa resultante se denominó *A. vinelandii* OPLYS/HOLsac.



**Figura 26.** PCR de colonia de las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLSac. (a) En los carriles 4 (OPLYS/HOL) y 5 (OPLYS/HOLSac) se muestra la banda del gen PA0614, resultado de la PCR de colonia con los oligonucleótidos UP0614 y DW0614. El carril 1 muestra el control positivo en la bacteria *P. aeruginosa* PAO1. (b) PCR de la cepa OPLYS/HOLSac. Los oligos utilizados fueron: scrX-F y DW0614 (634 pb, carril 1); scrX-F y DW629 (1327 pb, carril 2); UP629 y scrX-R (2736 pb, carril 3) y UP0614 y scrX-R (3241 pb, carril 4). (c) PCR de la cepa OPLYS/HOLSac. Los oligos utilizados fueron UP629 y DW629 (676).

En la Figura 27 se muestra el nombre de las cepas de *A. vinelandii* generadas en este trabajo, así como la organización y contexto génico.



**Figura 27.** Cepas de *A. vinelandii* construidas en este trabajo.

### 6.3. Inducción de una holina y una endolisina en las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLSac

Las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLSac se construyeron con el objetivo de ver si eran capaces de lisarse de manera más eficiente cuando expresaban de distinta manera las proteínas holina (PA0614) y endolisina (PA0629). Por un lado, la cepa OPLYS/HOL lleva a cabo la expresión del gen PA0629 de forma constitutiva, mientras que la expresión del gen PA0614 ocurre al inducir con sacarosa el promotor Pscrx. En cambio, en la cepa

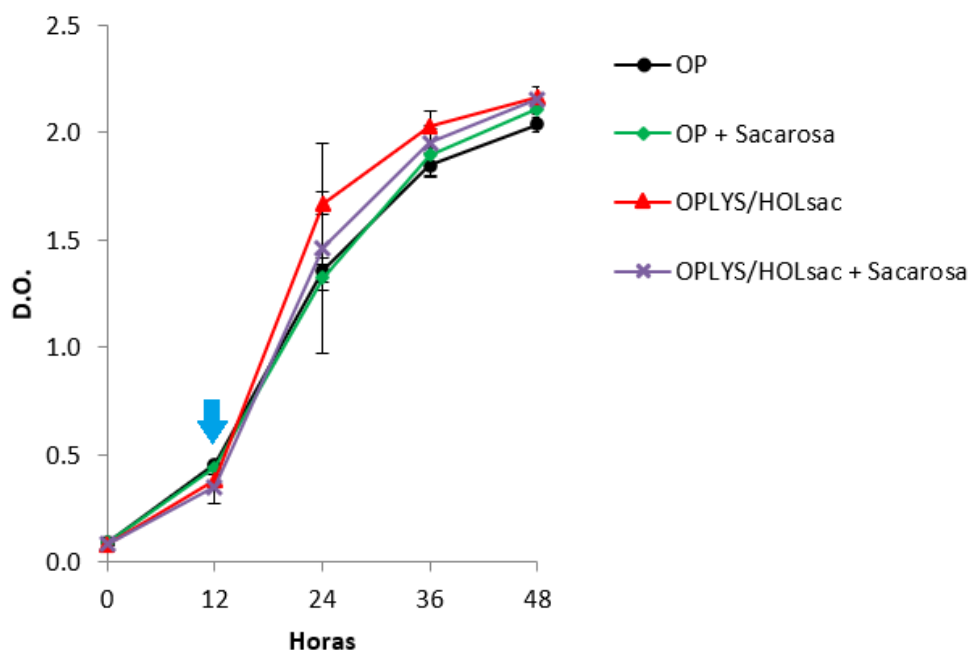
OPLYS/HOLsac ambos genes está bajo regulación de Pscrx, por lo que su expresión está sujeta a la inducción con sacarosa.

Es importante mencionar que las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac perdieron la resistencia a gentamicina después de varios eventos de resiembra en medio sólido con antibiótico, hasta el punto de no crecer en lo absoluto. Su crecimiento en medio líquido sin antibiótico también fue inestable. Esto nos hizo pensar que la presencia de los genes PA0614 y PA0629 en el DNA de *A. vinelandii* genera células inviables, incluso sin haber inducción del promotor Pscrx con sacarosa. Se ha observado que los promotores inducibles presentan un nivel de expresión basal (Heiss *et al.*, 2016; Wolf & Mascher, 2016). Es probable que esta “fuga” en la expresión de los genes PA0614 y PA0629 en estas cepas provoque que las células se lisen de manera prematura, seleccionando mutantes que pierdan la expresión de estos genes, o aquellas cepas en las cuales hubo una reversión de genotipo, un evento común observado en cepas mutantes del laboratorio. Por ello, cuando las crecemos en un medio sin gentamicina, como BG, es probable que solo se seleccionen células que no poseen la región genómica Pscrx/PA0614/Gm, en el caso de la OPLYS/HOL o la región Pscrx/PA0614/PA0629/Gm, en el caso de la OPLYS/HOLsac. Para probar esto se requieren más estudios sobre este fenómeno con algún gen reportero que permita evaluar el nivel de expresión de fuga de este promotor, sin embargo, esto está fuera de los objetivos de este proyecto.

A pesar de las observaciones anteriores, se realizaron cinéticas de crecimiento en las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac en medio BG líquido (glucosa como fuente de carbono) sin antibiótico para evaluar su crecimiento después de la inducción de la expresión de los genes PA0614 y PA0629. En estos experimentos se esperaba una disminución en los valores de crecimiento alcanzados por ambas cepas una vez que se añadiera la sacarosa, ya que, al expresar una holina y una endolisina, se debería provocar lisis celular en el cultivo. Es importante mencionar que los experimentos no se pudieron replicar más de 2 veces dada la inestabilidad en el crecimiento de las cepas. La inducción fue hecha con sacarosa a una concentración de 15 g/L a las 12 horas de crecimiento, ya que según lo reportado por Morales (2019), a esta concentración de sacarosa es donde se observa un mayor nivel de producción de transcritos en genes regulados por Pscrx.

Como puede observarse en el gráfico de la Figura 28, al añadir sacarosa no hubo diferencias notables en el crecimiento de la cepa OPLYS/HOLsac, e incluso esta cepa alcanzó valores ligeramente más altos que la OP. Lo anterior nos indica que la expresión de las moléculas de holina y endolisina no tiene efecto deletéreo en el crecimiento de esta cepa. De acuerdo con lo encontrado por Ventura (2021) y Morales (2019), Pscrx es un promotor con una fuerza relativa de expresión baja en comparación al promotor Pc, por lo que una posible explicación de que no se vea un efecto en el crecimiento después de inducir Pscrx con sacarosa en esta cepa es que no se transcriben y/o traducen las suficientes moléculas de holina y endolisina para que puedan llevar a cabo su actividad lítica. Tomando en cuenta el

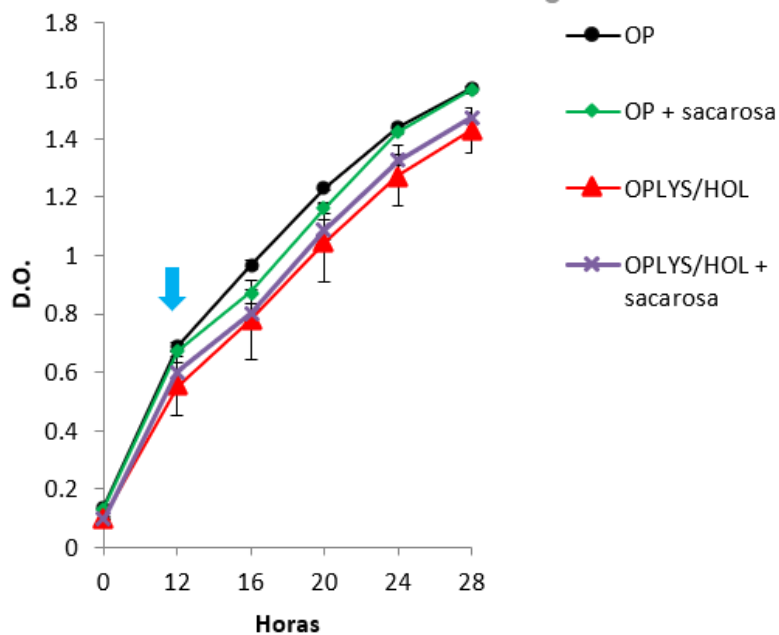
hecho de que la cepa pierde resistencia al antibiótico de selección (gentamicina) la explicación por la que más nos inclinamos es que hubo una reversión de genotipo, es decir, que el genoma de la bacteria recuperó el alelo silvestre. Ya que el experimento se hizo sin antibiótico (para poder comparar con la parental OP) es difícil saber si las células aun portan o no los genes PA014 y PA0629. Para ello se necesitaría hacer una PCR de las células al final del cultivo que amplifique la secuencia de los genes de interés, aunque esto ya no se realizó en este trabajo.



**Figura 28.** Crecimiento y efecto de la inducción de la expresión de una holina y una endolisina en la cepa OPLYS/HOLsac. Se utilizó medio BG y se indujo con sacarosa (15g/L) a las 12 horas como lo indica la flecha azul. Cada medición corresponde al promedio de triplicados y de dos experimentos independientes.

En cuanto a la cepa OPLYS/HOL (Figura 29), aun sin la adición de sacarosa, se observó una ligera disminución del crecimiento al compararla con la OP. Sin embargo, al añadir sacarosa tanto a la OP como a la OPLYS/HOL, y compararlos con los cultivos sin sacarosa, esta molécula inductora no causó un efecto después de más de 12 horas de crecimiento. Esta ligera disminución del crecimiento observada en la cepa OPLYS/HOL fue similar al observado en la cepa OPLYS (ver siguiente sección, 6.4), lo que puede significar que la expresión constitutiva de la endolisina es la causante de ello, ya que recordemos que la OPLYS/HOL deriva de la OPLYS, por lo que ambas expresan el gen de la endolisina (PA0629) de manera constitutiva por el promotor Pc. Probablemente, en la cepa OPLYS/HOL, en la cual el gen de la holina (PA0614) está regulado por Pscrx, ocurra algo similar a lo que pasó en la cepa OPLYS/HOLsac: no se transcriben y/o traducen las suficientes moléculas de holina para que puedan perforar la membrana interna, o las células del cultivo son aquellas en las que hubo una reversión de genotipo.



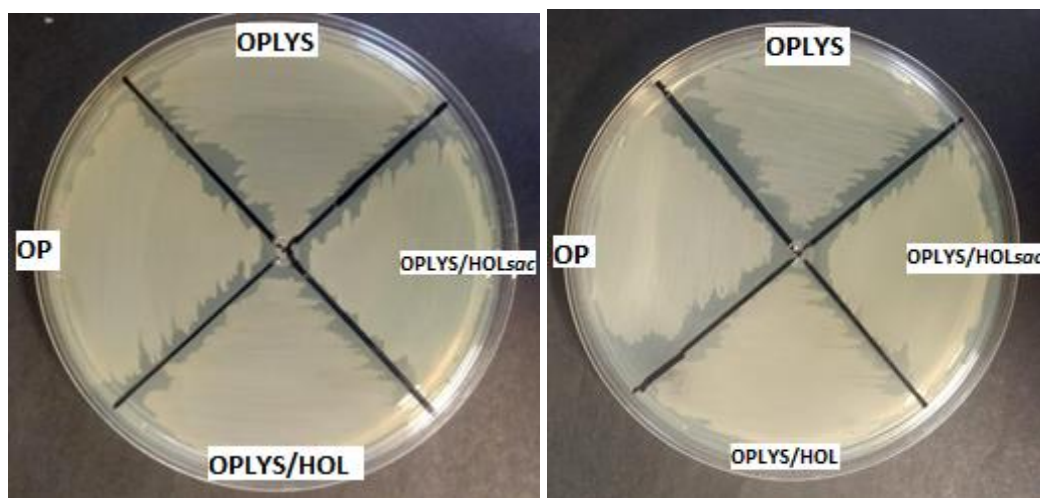


**Figura 29.** Crecimiento y efecto de la inducción de la expresión una endolisina en la cepa OPLYS/HOL. Se usó medio BG y se indujo con sacarosa (15g/L) a las 12 horas como lo indica la flecha azul. Cada medición corresponde al promedio de triplicados y de dos experimentos independientes.

Tomando en cuenta la pérdida gradual de la capacidad de crecer en medio con el antibiótico de selección en las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac, es probable que después de varias resiembras ocurra una reversión de la región mutante por la región silvestre en el genoma de la bacteria. El fenómeno de reversión de genotipo ha sido observado cuando se hacen otras modificaciones en *A. vinelandii* (Ambrosio y Curati, 2021). Este fenómeno no es bien conocido y se desconoce la razón por la que ocurre. En nuestro caso, como las moléculas de holina y de endolisina son proteínas que afectan la estabilidad de la célula, es probable que en el transcurso de las generaciones que suceden a través de las resiembras, sobrevivan únicamente las células que aun portan la secuencia silvestre del locus que se usó para recombinar, dando como resultado un nulo crecimiento en medio BG con el antibiótico de selección, además de que explicaría el por qué sí hay crecimiento en un medio sin antibiótico. Para comprobar si se lleva a cabo la transcripción y traducción en las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac, es necesario realizar otros estudios, como qrtPCR, geles de proteínas y ensayos donde pueda ser medida la actividad de las proteínas.

En la Figura 30 podemos observar el fenotipo en medio sólido (BS y BG) de las tres cepas construidas (OPLYS, OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac) comparadas con la parental OP. En medio BG, como era de esperarse, las 3 cepas crecieron bien al igual que la silvestre OP (Figura 30, derecha). Dado que el medio BS tiene sacarosa como fuente de carbono, y esta molécula es inductora de Pscrx en las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac, se esperaba ver una reducción del crecimiento en estas cepas, ya que al inducir la expresión de una holina y una endolisina

desde el comienzo del crecimiento, debería desencadenar una lisis celular prematura. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 30 (izquierda), ninguna de las cepas construidas en este trabajo presentó diferencias en medio BS. La cepa OPLYS no mostró diferencia versus OP en medio sólido (BS y BG). Como se discute en la siguiente sección, lo observado en la cepa OPLYS tanto en medio líquido como en sólido nos sugiere que la expresión constitutiva de la endolisina, aunque pudiera tener efecto en la estabilidad de la cepa, no es letal para la bacteria. Debido a las observaciones en las cepas OPLYS/HOL y OPLYS/HOLsac en cuanto a su inestabilidad del crecimiento, decidimos enfocarnos en estudiar la cepa OPLYS, la cual mostró características más favorables de crecimiento (ver siguiente sección, Figura 32).



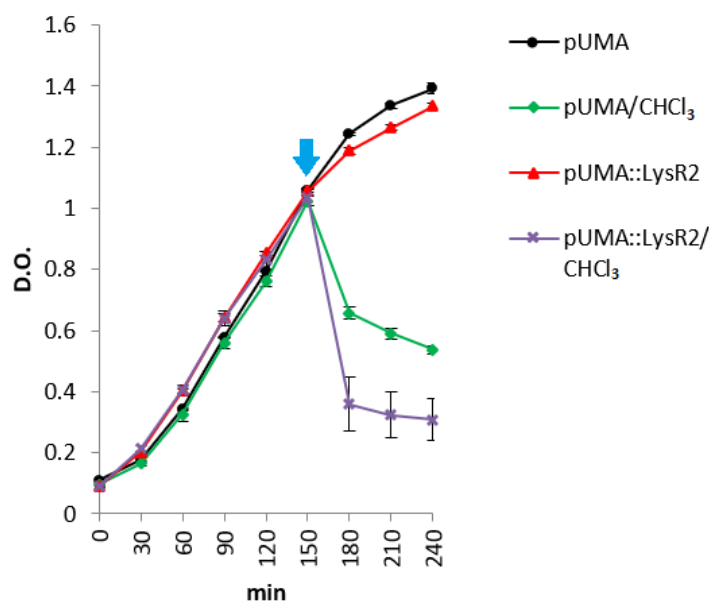
**Figura 30.** Fenotipos en BS (izquierda) y BG (derecha) sólido de las cepas construidas en este trabajo. Ambas cajas se incubaron a 30°C por 72 horas.

#### 6.4. Efecto de la endolisina en el crecimiento de la cepa OPLYS

Para probar el efecto de la actividad muralítica de la endolisina codificada por el gen PA0629 en la cepa de *E. coli* que porta el pUMA::LysR2 y la cepa OPLYS, se realizó una cinética de crecimiento en medio LB y BS líquido, respectivamente. Se decidió utilizar un agente permeabilizante en muy baja concentración (CHCl<sub>3</sub> 0.5% c/v) para promover la rotura parcial de las membranas y así permitir que las moléculas de endolisina acumuladas en el citoplasma entren en contacto con el periplasma y lo degraden. Esta estrategia se siguió dado que se ha descrito que las moléculas de endolisina se acumulan inofensivamente en el citoplasma de la bacteria (Young, 2014) ya que su sustrato, el peptidoglicano, se encuentra en el periplasma. Primero en la cepa de *E. coli* que lleva el plásmido pUMA::LysR2 (expresa la endolisina de manera constitutiva) se realizó una cinética en LB y a los 150 min se añadió el cloroformo esperando ver este efecto (Figura 31).

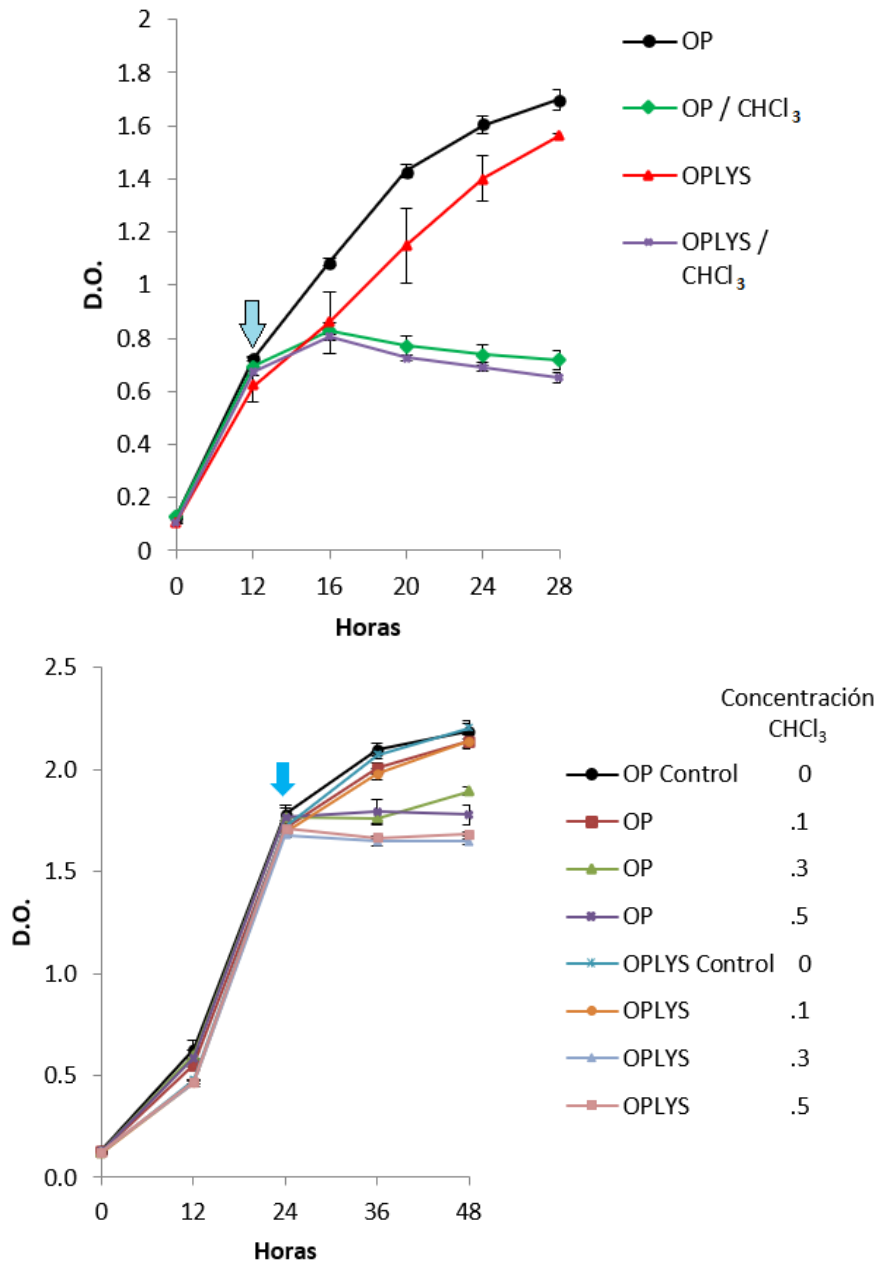
Cuando se añadió cloroformo al cultivo de *E. coli* se observó un efecto negativo más notorio en el crecimiento de la cepa que expresa el gen PA0629 (la que tiene el vector pUMA::LysR2) en comparación al control que tiene el vector pUMATc vacío (Figura 31). La disminución en

las mediciones de la D.O. en la cepa con el pUMATc vacío 90 minutos después de añadir el cloroformo fue de 61%, mientras que en la cepa que tiene el pUMA::LysR2 disminuyó un 77% respecto a los controles. Al igual que lo reportado por Nakayama y colaboradores (2000), lo anterior nos sugiere que la actividad de la endolisina sobre el peptidoglicano hace que la lisis sea más significativa cuando se combina con algún agente que permeabilice ligeramente las membranas.



**Figura 31.** Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* pUMATc::lysR2. Se usó medio LB tetraciclina (15 µg/ml). Se usaron matraces de 125 ml y fueron incubados a 37 °C en agitación. Flecha azul: adición de cloroformo 0.5%. Cada medición corresponde al promedio de triplicados y de 3 experimentos independientes.

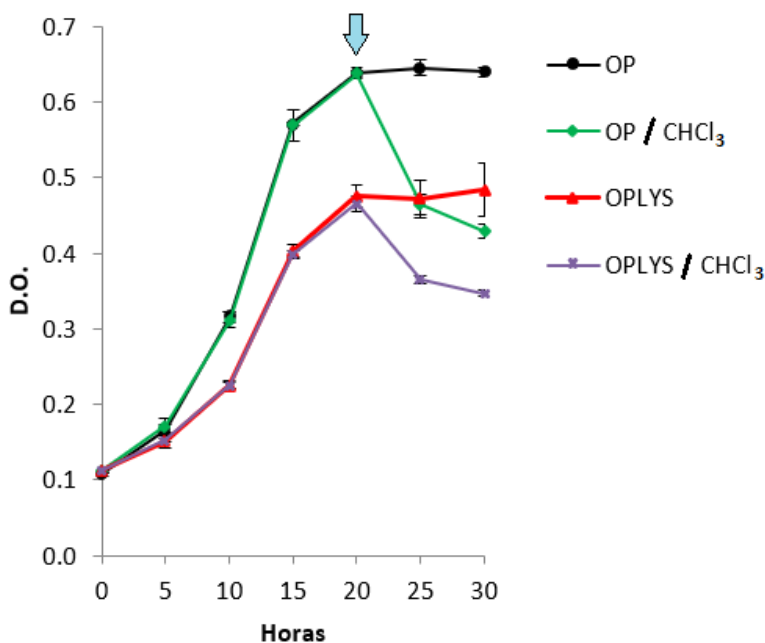
Se extrapoló el experimento en *A. vinelandii* OPLYS, y al añadir cloroformo al cultivo a las 12 horas no se observaron diferencias en la disminución en las mediciones de la D.O. entre ambas cepas, cayendo un 58% en cada una (Figura 32, arriba). Posteriormente, para observar una diferencia más clara entre la cepa OPLYS y la parental OP con este tratamiento, probamos distintas concentraciones de cloroformo (Figura 32, abajo). Se observó una mayor disminución en la D.O. en la cepa OPLYS en comparación a la OP cuando se usaron concentraciones de 0.3 y 0.5% de cloroformo.



**Figura 32.** Efecto del cloroformo en el crecimiento de la cepa *A. vinelandii* OPLYS en medio BS. Arriba: crecimiento de la cepa OPLYS comparada con la parental OP. El cloroformo fue añadido a las 12 horas (flecha azul) a una concentración de 0.5 %. Abajo: distintas concentraciones de cloroformo (0.1, 0.3 y 0.5 %) fueron añadidas a las 24 horas (flecha negra). Cada medición corresponde al promedio de triplicados y de 2 experimentos independientes.

Los datos de las cinéticas anteriores en medio BS nos hicieron pensar que los gránulos de PHB, que contribuyen a la turbidez del cultivo, pueden interferir con las mediciones de la D.O. en los cultivos de la cepa OPLYS, y por ello no observamos un efecto tan notorio como en *E. coli*. Por ello se decidió estudiar su crecimiento en una condición en la que *A. vinelandii* produce muy bajas cantidades de PHB. Se ha reportado que en medio líquido con acetato

como fuente de carbono *A. vinelandii* produce muy poco PHB (Espín & Segura, 1998). Se realizó una cinética de crecimiento con acetato de sodio como fuente de carbono y a las 20 horas se añadió cloroformo 0.3%. Sin embargo, como puede verse en la Figura 33, encontramos que el crecimiento de la cepa OPLYS no fue favorecido en este medio comparada con la parental, por lo que no fue posible observar una diferencia entre las cepas OPLYS y OP al añadir el cloroformo al medio. A pesar de esto, se puede destacar que la expresión de una endolisina de manera constitutiva en *A. vinelandii* puede llegar a ser negativo, pero no letal, para el crecimiento de la bacteria bajo ciertas condiciones.

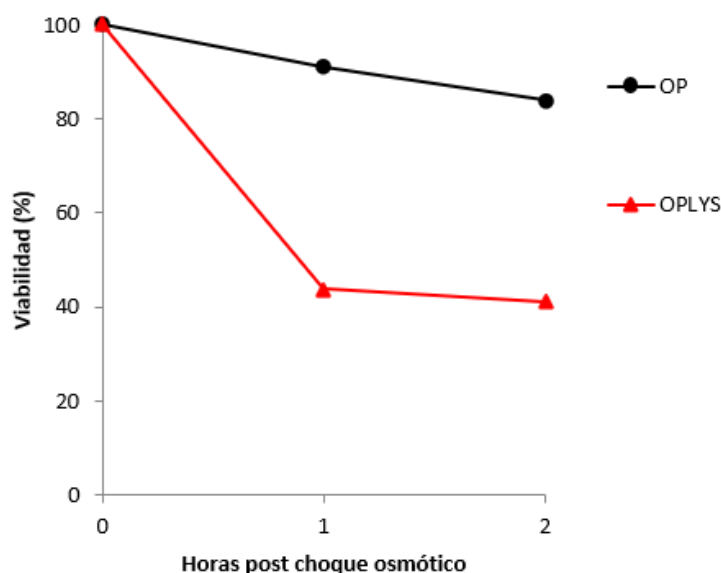


**Figura 33.** Crecimiento de la cepa *A. vinelandii* OPLYS en medio Burk acetato. Se añadió cloroformo a las 20 horas como lo indica la flecha azul. Cada medición corresponde al promedio de triplicados y de 2 experimentos independientes.

Aunque sabemos que la proteína endolisina se expresa de manera constitutiva en la cepa OPLYS ya que su gen PA0629 está regulado por un promotor constitutivo, los datos de las cinéticas anteriores nos indican que de dicha enzima no es letal para *A. vinelandii*, ya que en medio BS líquido se alcanzan valores de crecimiento similares a los de la cepa silvestre OP. Además, al utilizar bajas concentraciones de cloroformo para permeabilizar las membranas se observó un efecto negativo en el crecimiento en la cepa OPLYS en comparación a la cepa OP, probablemente debido a que las moléculas de endolisina están teniendo actividad de degradación del peptidoglicano y lisaron parte de la población.

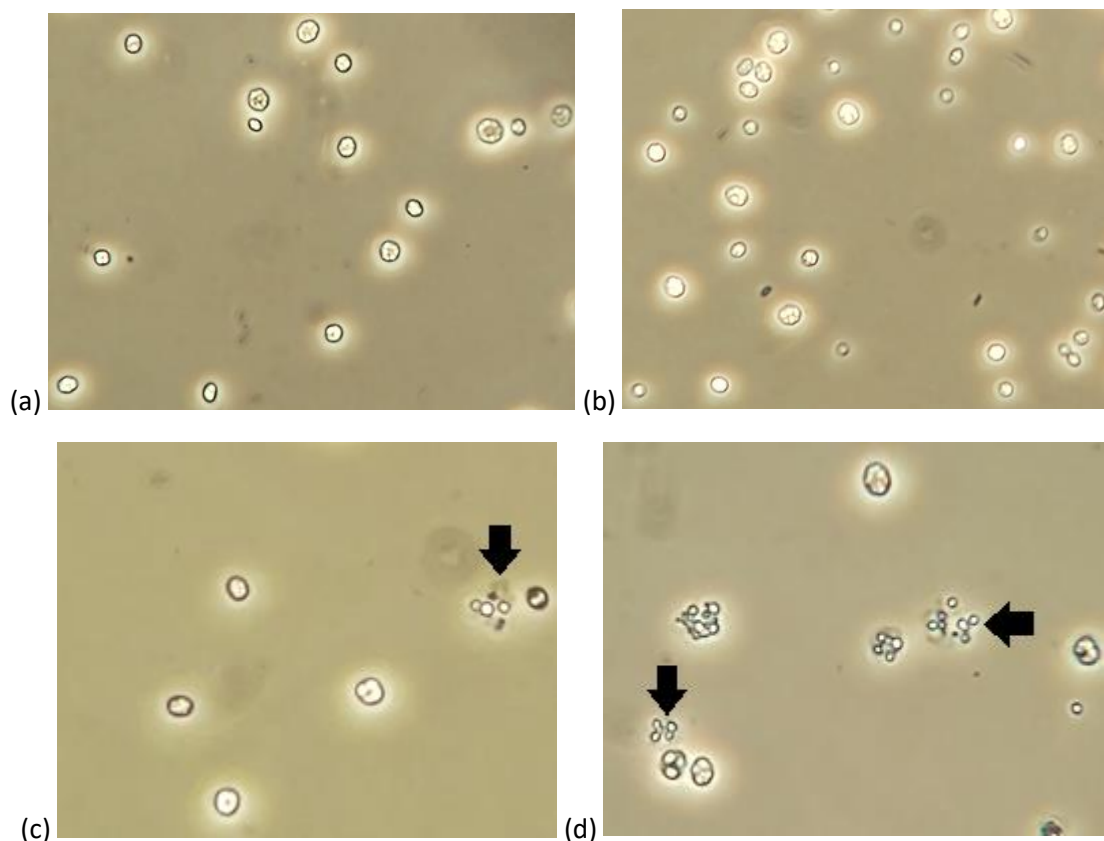
Dado que las lecturas de la densidad óptica de los cultivos celulares no distinguen entre células vivas y muertas, se hizo un ensayo en el que se cuantificó la viabilidad de la cepa OPLYS versus OP para evaluar el efecto que tiene las moléculas de endolisina sobre las

células. En este ensayo, después de crecer en medio líquido BS las cepas OPLYS y OP por 48 horas, en lugar de usar cloroformo, se sometieron las células a un estrés osmótico con agua para promover una debilitación de las membranas, y permitir que las moléculas de endolisina presentes en la cepa OPLYS lisen más fácilmente las células. Por ello, al exponer las células a esta condición de estrés osmótico, se esperaba una mayor disminución de la viabilidad en la cepa OPLYS que en la OP. Como se puede ver en la Figura 34, dos horas después de haber sometido las células a un estrés osmótico con H<sub>2</sub>O destilada, la viabilidad disminuyó hasta un 60% en la cepa OPLYS, mientras que en la OP, disminuyó menos del 20%. Esto demuestra un efecto de la expresión de la endolisina y sugiere que la enzima sí actúa sobre la pared celular.



**Figura 34.** Viabilidad de la cepa OPLYS versus OP después de un choque osmótico. Los cultivos celulares fueron crecidos en medio BS y a las 48 horas se sometieron a un tratamiento de estrés osmótico con H<sub>2</sub>O destilada. Una y dos horas después se hicieron diluciones seriadas y se sembró en cajas con medio BS sólido y se incubaron a 30°C por 48 horas.

Se tomaron muestras de los cultivos a las 48 horas antes y después del tratamiento de choque osmótico, y como se puede observar en la Figura 35, durante las visualizaciones al microscopio encontramos células lisadas de la cepa OPLYS antes y después del choque osmótico. Mientras que en la cepa OP se mantuvo la integridad de las células incluso después del tratamiento (Figura 35). Este ensayo de viabilidad también nos permitió deducir que podemos promover una lisis celular más eficiente en la cepa OPLYS combinando la expresión de la endolisina con alguna condición externa que ponga en riesgo la estabilidad de la célula.



**Figura 35.** Visualizaciones al microscopio de las cepas OPLYS y OP antes y después de un choque osmótico. (a) y (b) OP antes y después del choque osmótico respectivamente. (c) y (d) OPLYS antes y después del choque osmótico respectivamente. Las flechas negras indican los aparentes gránulos de PHB liberados al medio.

Las alteraciones osmóticas en el medio para lograr una lisis celular es un fenómeno que Poblete-Castro y colaboradores (2020) estudiaron en *Pseudomonas putida*. Con estas alteraciones lograron facilitar la liberación de PHAs al medio, aunque en lugar de expresar proteínas líticas en la bacteria, inactivaron una válvula de rescate (MscL) responsable de amortiguar cambios osmóticos en el medio, junto con la sobreexpresión de dos porinas. En nuestro caso, al tener una célula con la pared celular comprometida por moléculas de endolisina, esta condición de choque osmótico se puede convertir en una estrategia para lograr el objetivo de lisar las células de *A. vinelandii* y facilitar la liberación de PHB al medio. Consideramos que una combinación de la estrategia de la inactivación de la válvula de rescate MscL y la sobreexpresión de porinas con la estrategia presentada en este trabajo, puede tener buenos resultados.

### 6.5. Producción de PHB en la cepa OPLYS

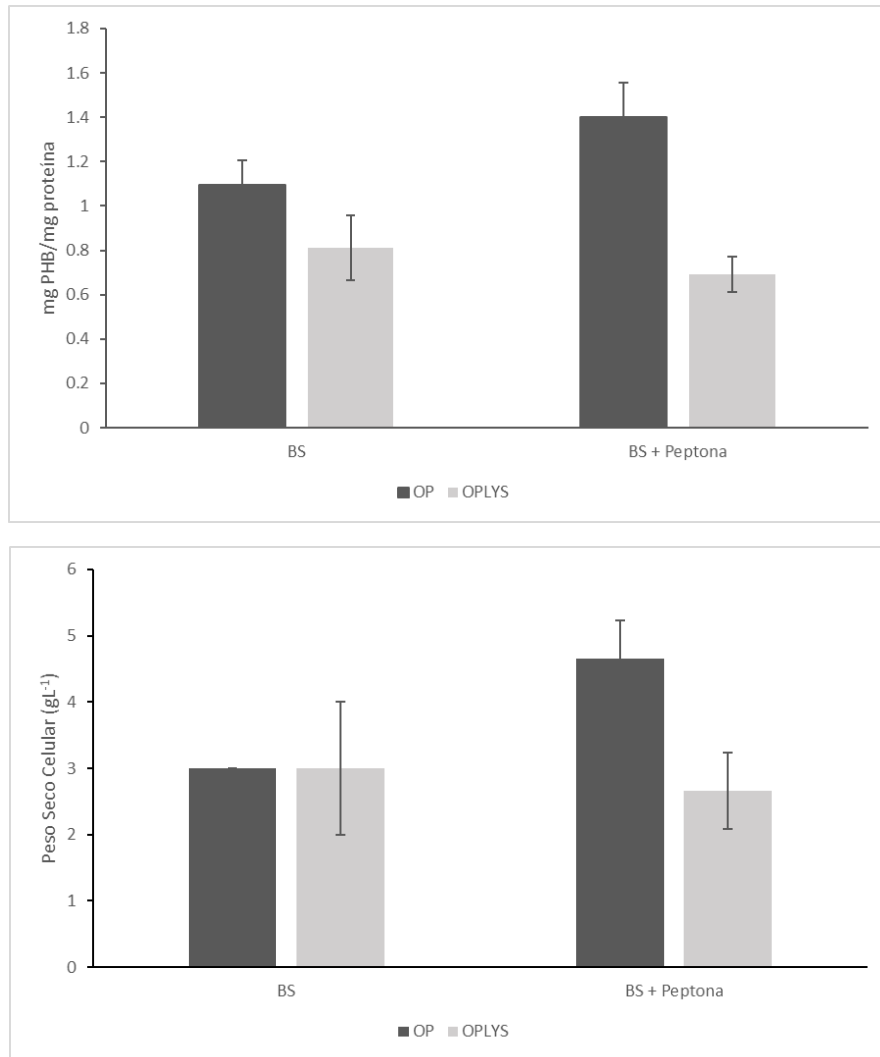
Ya que nuestro principal interés es obtener una cepa que pueda tener una lisis facilitada y que al mismo tiempo tenga altos niveles de acumulación de PHB, lo siguiente fue medir la

producción de PHB de la cepa OPLYS para determinar si las modificaciones realizadas en esta cepa no tuvieron impacto en la producción.

Para evaluar la producción de PHB en nuestras cepas del laboratorio, se usó un medio rico (PY-sacarosa) que favorece la producción del polímero. Inesperadamente, la cepa OPLYS no creció en PY-S líquido. Se trató de crecer la cepa inoculando matraces a partir de células crecidas 48 horas en medio sólido (BS) y a partir de cultivos de 24 horas de crecimiento en BS líquido, y en ningún caso se observó crecimiento. Al hacer una búsqueda bibliográfica encontramos que se ha reportado que la peptona (presente en el medio PY-S) actúa como una fuente de nitrógeno que promueve la síntesis de PHB en *A. vinelandii* pero no estimula el crecimiento de la bacteria (Page & Cornish, 1993), e incluso provocan un pleomorfismo en las células y las vuelve osmóticamente sensibles (Vela & Rosenthal, 1972). La combinación de una condición de crecimiento en la que se reportan células osmóticamente sensibles y una célula en la que existe una proteína que daña la integridad de su pared celular, como la cepa OPLYS, es una posible explicación del nulo crecimiento.

Debido a lo anterior, para la cuantificación de PHB en las cepas OP y OPLYS se usó medio BS, y para evaluar si hay un efecto en la producción del polímero cuando hay peptona en el medio, se cuantificó PHB y peso seco añadiendo peptona (0.5%) al medio BS a las 36 horas de crecimiento (Figura 36). Como se puede observar en la Figura 36 (arriba) la producción en la cepa OPLYS alcanzó 0.81 mg PHB/mg proteína, mientras que en la OP alcanzó 1.097 mg PHB/mg proteína. Aunque esto equivale a una reducción en la producción del polímero del 26.2% en la cepa OPLYS, para nuestros fines siguen siendo buenos valores de producción de PHB. En la OP, cuando se añadió peptona se aumentó la acumulación de PHB y el peso seco celular (Figura 36, abajo), mientras que en la OPLYS hubo una reducción en la concentración del polímero, lo cual no es favorable para nuestro objetivo, pero no hubo diferencia en los valores de peso seco celular con o sin peptona (Figura 36, abajo). Tampoco se observó un efecto negativo en el crecimiento o morfología de las células con la adición de peptona en la OPLYS, pero sería interesante evaluar el tiempo en que la peptona es añadida, ya que Vela y Rosenthal (1972) reportaron que después de 48 horas en un medio con peptona desde el inicio del cultivo, las células adquirieron una conformación más estable. También sería interesante realizar más estudios en la cepa OPLYS variando las concentraciones de peptona, y evaluar si la producción de PHB se sigue viendo afectada. Tampoco se descarta que algún otro componente o combinación de componentes en el medio PY-S sea el causante del nulo crecimiento de la cepa OPLYS. La razón de que consideramos relevante seguir estudiando el efecto de la peptona, o el componente del medio PY-S que esté provocando que no haya crecimiento en *A. vinelandii*, es que dicho componente se podría usar a nuestro favor, añadiéndolo en la fase de crecimiento adecuada para debilitar aún más las células y tener una lisis más efectiva, promoviendo la liberación del PHB.





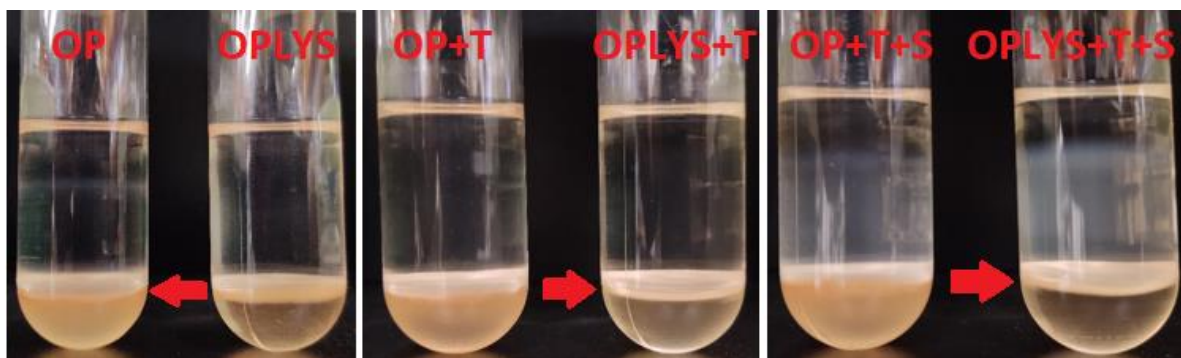
**Figura 36.** Producción de PHB y peso seco de las cepas OP y OPLYS. Las cepas fueron crecidas en medio BS a 30°C en agitación durante 48 horas. Del mismo cultivo de donde se cuantificó PHB se tomó 1 ml para calcular el peso seco. El experimento se hizo por duplicado.

### 6.6. Evaluación de la liberación de PHB en la cepa OPLYS

Para determinar si con la expresión de la endolisina y un choque osmótico se facilita la liberación de PHB al medio extracelular en la cepa OPLYS comparada con la OP, se crecieron las cepas durante 48 horas en medio BS, después se retiró el medio de cultivo por centrifugación para después someterlas a un choque osmótico. Después las células se colocaron en un gradiente discontinuo de glicerol para separar los gránulos de PHB de los restos celulares por centrifugación. Este experimento se usa en nuestro laboratorio para purificar gránulos de PHB, y una vez que los gránulos están fuera de las células (usualmente debido a procesos mecánicos) quedan atrapados en la división entre las dos fracciones más densas del gradiente de glicerol, distinguiéndose una banda blanquecina, mientras que las células que no sufrieron daño y restos celulares se van al fondo del tubo después de

centrifugarlos. Con este experimento se esperaba que en la cepa OPLYS se liberen más fácilmente los gránulos de PHB solamente con un choque osmótico y con ayuda de la actividad de la endolisina. Incluimos una condición en la que previamente tratamos las células con un sonicador por cortos periodos de tiempo (30 segundos) para comparar la liberación de los gránulos versus el tratamiento osmótico.

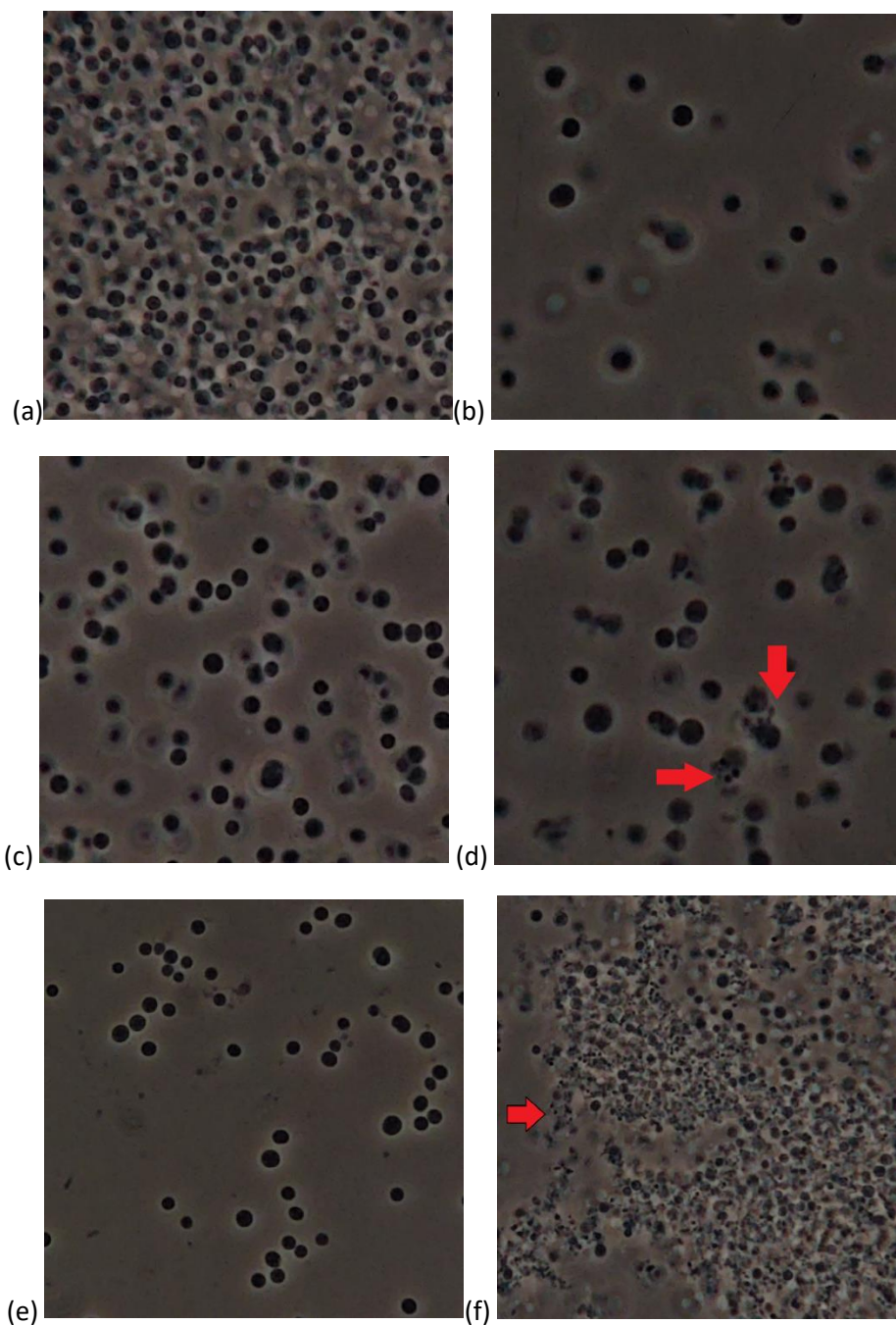
Como podemos observar en la figura 37, en las 3 condiciones de la cepa OP se nota una mayor turbidez en la parte más densa del gradiente (fondo). Mientras que en la cepa OPLYS, en las 3 condiciones se observa una banda blanquecina más definida (flechas rojas) en la división de los gradientes. Esto lo atribuimos a la facilidad con la que los gránulos de PHB son liberados al medio en la OPLYS. Resultados similares en gradientes discontinuos de sacarosa para evaluar liberación de PHAs al medio extracelular fueron vistos en trabajos con *Bacillus megaterium* y *P. putida* (Hori *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2011, respectivamente). Además, cuando las células se sometieron a sonicación, la distinción de los gradientes también fue más evidente en la OPLYS, pero también apareció una turbidez blanca en la parte superior del gradiente en ambas cepas (Figura 37, tubos OP+T+S y OPLYS+T+S). Se tomaron muestras de esta sección para analizar al microscopio, pero no se detectaron restos de PHB, y creemos que tal vez son restos celulares más pequeños que no alcanzan a sedimentar. También se analizaron muestras del fondo, y en las 3 condiciones aparecieron células totalmente íntegras, pero en mucho menor proporción en los tubos de la OPLYS.



**Figura 37.** Separación de fracciones celulares en un gradiente discontinuo de glicerol de las cepas OP y OPLYS. T = tratamiento de estrés osmótico; S = sonicación. El experimento se realizó tres veces, observando los mismos resultados.

Por otra parte, en las visualizaciones al microscopio de la sección donde aparece la línea blanca que divide a los gradientes, las células de la cepa OP en las 3 condiciones conservaron su integridad en su mayor parte (Figura 38 a, c y e). Por otro lado, en las imágenes de la cepa OPLYS sin tratamiento (Figura 38 b), las células conservaron su integridad, pero con el estrés osmótico y con la sonicación adicional (Figura 38 e y f) se observaron células aparentemente lisadas y además gránulos que quedaron libres en el medio. Las observaciones hechas en el ensayo del gradiente de glicerol y las imágenes al microscopio, aportan evidencia de que en la cepa OPLYS existe una mayor facilidad para liberar los

gránulos al medio cuando las células son sometidas a condiciones que comprometen la integridad de la célula.



**Figura 38.** Imágenes de la interfase del gradiente de glicerol de las cepas OP y OPLYS. (a) y (b) cepas OP y OPLYS respectivamente, colocadas sin tratamiento sobre el gradiente de glicerol. (c) y (d) cepas OP y OPLYS respectivamente, sometidas al tratamiento de estrés osmótico con H<sub>2</sub>O. (e) y (f) cepas OP y OPLYS respectivamente tratadas con sonicador por 30 segundos adicionales al tratamiento de estrés osmótico. Las flechas rojas indican aparentes gránulos de PHB liberados al medio.

Los datos de este trabajo tomados en conjunto son un primer acercamiento al efecto que tiene la expresión de proteínas líticas en *A. vinelandii* y de la ventaja que pueden aportar al liberar el PHB al medio. En un principio, en este trabajo se propuso hacer uso del conjunto de proteínas que se requieren para lisar bacterias Gram-negativas (holina, endolisina, espaninas) (Fernandes & São-José, 2018; Cahill & Young, 2019). Sin embargo, el hecho de no poder obtener una cepa estable al combinar la expresión del gen PA0614 (holina), PA0629 (endolisina) y *RzRz1* (espaninas), hicieron dedicar nuestros esfuerzos a estudiar la cepa *A. vinelandii* OPLYS, la cual únicamente expresa de manera constitutiva el gen PA0629 que codifica una endolisina. Se obtuvo evidencia de que es posible liberar el PHB de manera más fácil en nuestra cepa OPLYS. Borrero-de Acuña *et al.* (2017) demostraron que con una proteína de tipo endolisina (lizozima), es suficiente para dañar la pared celular de las bacterias y lisar las células para liberar algún producto de interés al medio. Además, lo observado por Nakayama *et al.* (2000) y lo que se encontró en este trabajo en los ensayos con cloroformo en bajas concentraciones y con el tratamiento de choque osmótico, indican que la combinación de la acumulación de la endolisina con la presencia de alguna condición externa adversa para alterar la integridad de la membrana celular puede funcionar para liberar de manera más sencilla el PHB acumulado en las células al medio extracelular.

Se ha observado que la expresión de proteínas líticas en bacterias compromete el crecimiento y acumulación del polímero, aunque estén bajo un promotor regulado (Martínez *et al.*, 2011; Borrero-de Acuña *et al.*, 2017). En este trabajo, se usó un promotor constitutivo para expresar el gen PA0629 que codifica una endolisina en la cepa OPLYS, y aunque la cepa fue totalmente viable y en BS se comportó muy similar a la OP, se encontró una disminución (no drástica) en la producción de PHB. En cuanto al crecimiento, este se vio afectado bajo ciertas condiciones: cuando se usó acetato de sodio como fuente de carbono, y cuando se usó un medio rico, PY-S. Como se mencionó antes, de acuerdo con Vela & Rosenthal, 1972, medios de cultivo con peptona potencian en *A. vinelandii* la producción de PHB pero no su crecimiento, promoviendo un pleomorfismo en las células e incluso las vuelve osmóticamente sensibles. Parece que esto se debe a que la glicina presente en estos extractos, en combinación con otros aminoácidos como la L-metionina, el L-triptófano o la L-fenilalanina interfieren con la síntesis de peptidoglicano resultando una acumulación en el citoplasma de los glicopéptidos-UDP que son precursores en la ruta de síntesis del peptidoglicano (Page & Cornish, 1993). A pesar de que nuestro ensayo preliminar con peptona no afectó aparentemente el crecimiento de la cepa OPLYS, creemos que este fenómeno visto con anterioridad se puede usar para promover un mayor debilitamiento de la pared celular y obtener una lisis más eficiente. Se necesitan estudios de los distintos componentes del medio PY-S para determinar cuál de ellos evita que nuestra cepa crezca, y si de verdad puede aportarnos ventaja.

En el ensayo de gradiente discontinuo de glicerol y el análisis al microscopio se observó que los gránulos de PHB en la cepa OPLYS son liberados más fácilmente en comparación a la cepa parental OP cuando son sometidas a un estrés osmótico. El siguiente paso es encontrar

algún método para mejorar la extracción de PHB en la cepa OPLYS. Un método común usado para extraer el PHB es el uso de solventes (Raza *et al.*, 2018). Si bien, lo ideal es no usar estos reactivos por su impacto ambiental, la incorporación de cepas con su pared celular debilitada por proteínas líticas podría contribuir al menos a la reducción del uso de estos reactivos. Otra alternativa atractiva, es optar por otras condiciones externas estresantes, como el choque osmótico, que ayuden a debilitar la pared de *A. vinelandii* y que permitan que la endolisina acumulada en su citoplasma degrade el peptidoglicano provocando la lisis celular. Por supuesto existen otras alternativas que vale la pena considerar incluirlas en *A. vinelandii*, por ejemplo, modificaciones genéticas que afectan los componentes de la membrana (silenciamiento del gen *tolB*, que pertenece al sistema de proteínas Tol-Pal, involucrado en la estabilización de las membranas) o la respuesta de la célula a condiciones de estrés (con la inactivación de una válvula de rescate, como MscL, responsable de amortiguar cambios osmóticos en el medio). Estas son algunas estrategias que se han incorporado en *P. putida* (Martínez *et al.*, 2011; Poblete-Castro *et al.*, 2020). Sería interesante estudiar si con la combinación de alguna(s) de estas estrategias podemos obtener un sistema de lisis celular más eficiente para la liberación y extracción de PHAs.

## 7. CONCLUSIONES

- La expresión simultánea de una holina/endolisina generó cepas de *A. vinelandii* inestables en su crecimiento. Así mismo, no se pudieron generar cepas en *E. coli* que expresaran una endolisina/espaninas, por lo que ambas estrategias de lisis resultaron inadecuadas para usarse en cepas productoras de PHB.
- La expresión constitutiva de una endolisina en *A. vinelandii* OPLYS no es letal para la bacteria en medio BS, permitiendo valores de crecimiento y de producción de PHB cercanos a los alcanzados en la cepa OP.
- La expresión de una endolisina en la cepa OPLYS afecta su viabilidad en mayor grado en comparación a la OP cuando ambas se someten a una condición de estrés osmótico.
- La expresión de una endolisina en la cepa OPLYS permite una liberación facilitada de los gránulos de PHB al medio extracelular en comparación a la OP cuando ambas se someten a una condición de estrés osmótico.

## 8. PERSPECTIVAS

- Evaluar qué componentes del medio PY-S impiden el crecimiento de la cepa OPLYS y analizar si se puede tomar ventaja de ello para generar mejores condiciones de autólisis.
- Estudiar la expresión simultánea de las enzimas holina/endolisina/espaninas con otros promotores que sean inducibles y observar si se obtiene cepas con la capacidad de autólisis más eficiente.
- Implementar un método de extracción de PHB para la cepa OPLYS y analizar si se obtienen mejores resultados en la cantidad de PHB extraído y de su pureza.

## REFERENCIAS

- Adams MH (1959) Bacteriophages. Interscience Publisher, INC., New York. pp. 620.
- Adaya M, Millán M, Peña C, Jenndrossek D, Espín G, Tinoco-Valencia R, Guzmán J, Pfeiffer D, Segura D (2018) Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass **102**: 2693-2707.
- Akaraonye E, Keshavarz T and Roy I (2010) Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. Journal of Chemical Technology & Biotechnology **85**: 732-743.
- Altman E, Young K, Garrett J, Altman R & Young R (1985) Subcellular localization of lethal lysis proteins of bacteriophages  $\lambda$  and  $\phi$ X174. Journal of Virology **53**: 1008-1011.
- Ambrosio R & Curati L (2021) Deferred control of ammonium cross-feeding in a N<sub>2</sub>-fixing bacterium-microalga artificial consortium. Environmental Biotechnology **105**: 2937-2950.
- Barenboim M, Chang C, Hajl F & Young R. Characterization of the dual start motif of a class II holin gene. Molecular Microbiology **32**: 715-727.
- Berry J, Rajaure M, Pang T & Young R (2012) The spanin complex is essential for lambda lysis. Journal of Bacteriology **194**: 5667-5674.
- Berry J, Summer EJ, Struck DK & Young R (2008) The final step in the phage infection cycle: the RZ and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. Molecular Microbiology **70**: 341-351.
- Bläsi U, Nam K, Hartz D, Gold L & Young R (1989) Dual translational initiation sites control function of the  $\lambda$  S gene. The EMBO Journal **8**: 3501-3510.
- Bonovich MT & Young R (1991) Dual start motif in two lambdaoid S genes unrelated to  $\lambda$  S. Journal of Bacteriology **173**: 2897-2905.
- Briers Y, Volckaert G, Cornelissen A, Lagaert S, Michiels CW, Hertveldt K & Lavigne R (2007) Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages  $\phi$ KZ and EL. Molecular Microbiology **65**: 1334-1344.
- Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A & Alvarez V (2014) Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. eXPRESS Polymer Letters **8**: 791-808.
- Cahill J, Rajaure M, O'Leary C, Solan J, Marrufo A, Holt A, Kulkarni A, Hernandez O & Young R (2017) Genetics analysis of the lambda spanins Rz and Rz1: identification of functional domains. Genes Genomes Genetics **7**: 741-753.
- Cahill J & Young R (2019) Phage Lysis: multiple genes for multiple barriers. In: Kielian M, Mettenleiter TC & Roossinck MJ (eds) Advances in Virus Research, **103**. pp. 33-70: Elsevier.
- Castañeda M, Guzmán J, Moreno S, Espín G (2000) The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-b-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology **182**: 2624-2628.
- Chen GQ and Page W (1994) The effect of substrate on the molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD **16**: 155-160.
- Chen GQ and Page W (1997) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. Biotechnology Techniques **11**: 347-350.
- Díaz-Barrera A and Soto E (2010) Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: current state, limits and prospects. American journal of biotechnology **9**: 5240-5250.

- Espín G (2002) Biología de *Azotobacter vinelandii* en: Microbios en línea. Consultado en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>
- Fernandes S & São-José C (2018) Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers. *Viruses* **10**: 1-22.
- Gavrilescu M and Chisti Y (2005) Biotechnology-a sustainable for chemical industry. *Biotechnology Advances* **23**: 471-499.
- González Y, Meza JC, González O y Cordova JA (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos; plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* **29**: 77-115.
- Gouda MK, Swellam AE & Omar SH (2001) Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research* **156**: 201-207.
- Hand S, Gill J and Chu KH (2016) Phage-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB) produced from synthetic crude glycerol. *Science of the total environment* **557-558**: 317-321.
- Heiss S, Hörmann A, Tauer C, Sonnleitner M, Egger E, Grabherr R & Heini S (2016) Evaluation of novel inducible promoter/repressor systems for recombinant protein expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories* **15**:50.
- Hernández-Eligio A, Castellanos M, Moreno S, Espín G (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by *PhbR* and *RpoS*. *Microbiology* **157**: 3014-3023.
- Hernández-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C *et al* (2012) *RsmA* post-transcriptionally controls *PhbR* expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* **158**: 1953-1963.
- Hori K, Kaneko M, Tanji Y, Xing X and Unno H (2002) Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Applied Microbiology Biotechnology* **59**: 211-216.
- Jendrossek D and Handrick R (2002) Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* **56**: 403–32.
- Johnson DC, Unciuleac MC & Dean DR (2006). Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *American Society for Microbiology* **188**: 7551-7561.
- Khanna S & Srivastava AK (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* **40**: 607-619.
- Law JH and Slepecky RA (1960) Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Journal of bacteriology* **82**: 33-36.
- Lee S (1995) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* **49**: 1-14.
- Liu X & Curtiss R (2009) Nickel-inducible *lys* system in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 21550-21554.
- López NI, Pettinari MJ, Stackebrandt E, Tribell PM, Pöter M, Steinbüchel A & Méndez BS (2009) *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate) producer isolated from an antarctic environment. *Current Microbiology* **59**: 514-519.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.



- Madison LL and Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 21-53.
- Martínez V, García P, García JL and Prieto MA (2011) Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoates recovery in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Biotechnology* **4**: 533-547.
- Michel-Briand Y & Baysse C (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **84**: 499-510.
- Morales FG (2019) Biosíntesis de polihidroxicanoatos de cadena media en *Azotobacter vinelandii* OP a partir de ácidos grasos o sacarosa para la obtención de bioplásticos [Tesis de Maestría] Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mozejko-Ciesielska J, Szacherska K & Marcciniak P (2019) *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* **27**: 1151-1166.
- Muriel-Millán LF, Salazar M, Segura D, Castillo T, Díaz-Barrera A, and Peña C (2017) Molecular mass of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is influenced by the polymer content in the inoculum. *Journal of Biotechnology* **259**: 50-55.
- Muriel-Millan LF, Castellanos M, Hernández-Eligio JA, Moreno S, and Espín G (2014) Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 2173-2182.
- Nakayama K, Takashima K, Ishihara H *et al.* (2000) The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Molecular Microbiology* **38**: 213-231.
- Noar JD and Bruno-Bárcena JM (2018) *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology* DOI 10.1099/mic.0.000643.
- Oliveira H, Melo LDR, Santos SB, Nóbrega FL, Ferreira EC, Cerca N, Azeredo J, Kluskens LD. Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *Journal of Virology* **87**: 4558-4570.
- Özen AI & Ussery DW (2012) Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*. *Microbial Ecology* **63**: 239-248.
- Page WJ & Cornish A (1993) Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly-β-Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 4236-4244.
- Page WJ, Knosp O (1989) Hyperproduction of poly-b-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1334-1339.
- Pang T, Savva CG, Fleming KG, Struck DK & Young R (2009) Structure of the lethal phage pinole. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 18966-18971.
- Park T, Struck DK, Dankenbring CA & Young R (2007) The pinholin of lambdaoid phage 21: control of lysis by membrane depolarization. *Journal of Bacteriology* **189**: 9135-9139.
- Peña C, Catillo T, García A *et al.* (2014) Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology* **7**: 278-293.
- Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servín González L, and Espín G (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly-beta-Hidroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon is Driven by two

- overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of Bacteriology* **184**: 5672-5677.
- Pyla R, Kim TJ, Silva JL, Jung YS (2009) Overproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA Arrf. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**: 717-724.
  - Rajaure M, Berry J, Kongari R, Cahill J & Young R (2015) Membrane fusion during phage lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 5497-5502.
  - Raza ZA, Abid S & Banat I (2018) Polyhydroxyalkanoates: characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* **126**: 45-56.
  - Reddy CSK, Ghai R, Rashmi and Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour. Technol* **87**: 137-146.
  - Resch S, Gruber K, Wanner G *et al.* (1998) Aqueous release and purification of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) from *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **65**: 173-182.
  - Sadik AS, El-Kamash NA and Mohamed SH (2016) Isolation and characterization of free-nitrogen fixer bacterial strains (*Azotobacter* sp.) and their phages from maize rhizosphere-soil at Taif. *Pakistan Journal of Biotechnology* **13**: 31-37.
  - Salazar O & Asenjo JA (2007) Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology letters* **29**:985-994.
  - Sausseureau E & Debarbieux (2012) Bacteriophages, PartB. In *Advances in Virus Research*.
  - Segura D, Núñez S and Espín G (2014) *Azotobacter Cysts*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000295.pub2.
  - Segura D & Espín G (1998) Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-  $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **180**: 4790:4798.
  - Segura D, Guzmán J & Espín G (2003) *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- $\beta$ -hydroxybutyrate or alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**: 159-163.
  - Segura D and Espín G (2004) Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**: 414-418.
  - Senior P, Beech G, Ritchie G & Dawes E (1972) The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter vinelandii beijerinckii*. *Biochemical Journal* **128**: 1193-1201.
  - Setubal JC & Almeida NF (2015) The *Azotobacter vinelandii* genome: an update. *Biological Nitrogen Fixation, Volume I*.
  - Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS *et al.* (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of bacteriology* **191**: 4534-4545.
  - Singh AK, Srivastava JK, Chandel AK, Sharma L, Mallick N & Singh AP (2019) Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**: 2007-2032.
  - Stevenson LH and Socolofsky MD (1966) Cyst formation and poly-beta-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *Journal Bacteriology* **91**: 304-310.

- Tripathi A, Joshi T, Khosravi-Darani K, Koller M, Singh SP, Shrivastava A & Mishra S (2016) Recovery and characterization of polyhydroxyalkanoates. *Recent Advances in Biotechnology* **2**: 267-303.
- Turnbull L, Toyofuku M, Hynen A, *et al.* (2016) Explosive cell lysis as a mechanism for the biogénesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature communications* DOI: 10.1038/ncomms11220
- Valappil SP, Misra EK, Boccaccini AR and Roy I (2014) Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and *in vivo* responses. *Journal Expert Review of Medical Devices* **3**: 853-868.
- Vela GR & Rosenthal RS (1972) Effect of peptone on *Azotobacter* Morphology. *Journal of Bacteriology* **111**: 260-266.
- Ventura FC (2021) Biosíntesis de polihidroxialcanoatos de cadena media en *Azotobacter vinelandii* OP bajo la regulación de un promotor constitutivo utilizando sacarosa como fuente de carbono [Tesis de Licenciatura]. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Walmsley & Kennedy (1991) Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expresión of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Applied and environmental microbiology* **57**: 622-624.
- White R, Chiba S, Pang T, Dewey JS, Savva CG, Holzenburg A, Pogliano K & Young R (2011) Holin triggering in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 798-803.
- Williams SF and Martin DP (2005) Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy, pp. 93-120. Online: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wolf D & Mascher T (2016) The applied side of antimicrobial peptide-inducible promoters
- from *Firmicutes* bacteria: expression systems and whole-cell biosensors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 4817-4829.
- Xu M, Struck DK, Deaton J, Wang I & Young R (2004) A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 6415-6420.
- Yoneyama F, Yamamoto M, Hashimoto W & Murata K (2015) Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. *Bioengineered* **4**: 209-217.
- Young R (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological Reviews* **56**: 430-481.
- Young R (2013) Phage lysis: Do we have the hole story yet?. *Current Opinion in Microbiology* **16**: 2-14.
- Young R (2014) Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology* **52**: 243-258.
- Yu H, Yin J, Li H *et al.* (2000) Construction and selection of the novel recombinant *Escherichia coli* starin for poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production. *Journal of bioscience and bioengineering* **89**: 307-311.
- Zagotta MT & Wilson DB (1990) Oligomerization of the bacteriophage lambda S protein in the inner membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **172**: 912-921.