



U.N.A.M.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**“El papel de la proteína RhIA
en la síntesis de ramnolípidos (rhl's) y polihidroxicanoatos
(PHA's) en *Pseudomonas aeruginosa*.”**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

Luz María Delgado Calva.

ASESORA : Dra. Gloria Soberón Chávez

BIOMEDICAS



CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F. ENERO DEL 2009



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.



AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Que siempre me ha brindado la oportunidad
de obtener muchos logros
en compañía de los seres que amo.

Especialmente:

A mis padres.

E. Joaquín Delgado Ramos y Ernestina Calva soto.

Quienes me han enseñado con su amor, apoyo
y comprensión, que es posible lograr lo que uno se
propone. Mis guías.

A mis hermanos.

Ana Soledad, Yolanda Patricia, José Rodrigo,
Yazmín.

Porque con su ejemplo me han enseñado a
encontrar y perseguir nuevas metas. Por su apoyo
incondicional.

A mi esposo.

Juan Pablo Salazar Sustaita.

Por compartir su vida conmigo
y apoyarme en todas las formas posibles.
Te amo.

A todos mis familiares.

En especial a:

Macario Calva Montiel, Citlali y Rodrigo Daniel
Delgado Salazar, Dr. Sergio Ramírez Jiménez.

Al darme siempre
armonía y felicidad en la vida para seguir
creciendo en mis proyectos.

Al la Dra. Gloria Soberón Chávez.

Mi tutora, de quien he recibido siempre un gran apoyo,
y a quien tanto admiro
por su trayectoria y calidad humana.
Gracias.

A mis amigos.

David Díaz Águila, Claudia Valera Luna, Daniela Cortés Valera,
María Victoria Grosso Becerra, Catalina Cardenás Asención,
José de Jesús Martínez Barragan.

Porque con sus palabras de apoyo
siempre me dieron ánimo cuando el trabajo tomaba el rumbo difícil,
además de hacerme parte de sus vidas.

A mis compañeros del laboratorio.

Dr. Humberto García, Marisela Aguirre,
Alejandro Gabutti, Gerardo Croda, Jeiry Toribio,
Abigail González, Arleth de la Paz, Francisco Sánchez.

Con quienes además de compartir el trabajo
me han enseñado a superarme.

A Marisela Aguirre Ramiréz.

Por su apoyo técnico y sus enseñanzas
al iniciar una nueva etapa en mi vida escolar.

Al la U. N. A. M.

Por abrirme sus puertas,
permitirme conocer nuevas personas y amigos
además de dar a mi vida un cambio.
Gracias.

MATERIALES Y METODOS

1.	Descripción de las condiciones de cultivo y técnicas microbiológicas.....	56
2.	Construcción del plásmido pAPR1- <i>rhlA</i> (His) ₁₀	57
3.	Secuenciación del gen <i>rhlA</i> contenido en el plásmido pAPR1- <i>rhlA</i> (His) ₁₀ ..	59
4.	Mutagénesis sitio dirigida.....	60
5.	Métodos analíticos.....	61

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE DATOS

1.	RhIA* sintetiza ácidos grasos unidos a CoA.....	67
	A) Transformación y manejo de DNA en <i>P. putida</i> .	
	B) Medición de polihidroxiacanoatos en <i>P. putida</i> .	
	C) Detección de la proteína RhIA*-His ₁₀ mediante inmunoensayos.	
2.	Efecto de la sobreexpresión de la proteína RhIA* sobre las síntesis de rhIs, PHAs y piocianina en <i>P. aeruginosa</i>	68
	A) Transformación y manejo de DNA en <i>P. aeruginosa</i> .	
	B) Medición de ramnolípidos y polihidroxiacanoatos en <i>P. aeruginosa</i> .	
	C) Medición de piocianina en <i>P. aeruginosa</i> .	
3.	Efecto de la expresión de RhIA* en la producción de piocianina en <i>P. aeruginosa</i>	70
4.	Efecto del bloqueo en la síntesis de ramnolípidos sobre la producción de PHAs y piocianina.....	71

A) Bioensayos con fusión *lecA::lux* para la medición de PQS y HHQ en *P. aeruginosa*.

5.	Efecto de la temperatura en la producción de rhlS y PHAs.....	73
6.	pAPR1- <i>rhlA</i> *(His) ₁₀ contiene una mutación en un sitio conservado de la proteína.....	74
7.	Mutagénesis sitio dirigida en la secuencia de RhlA*.....	75
8.	Transformación de <i>P. putida</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> con el vector pAPRS- <i>rhlA</i> (His) ₁₀ proveniente de la mutagénesis.....	75
CONCLUSIONES		77
PERSPECTIVAS		81
REFERENCIAS		83
ANEXOS		
A.	ABSTRACT.....	90
B.	Artículo Sometido a nota de revisión en la revista The Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology (JMMB).....	92
APÉNDICES		
C.	Tablas de referencia.....	114
D.	Información general.....	122



ABREVIATURAS

1-OH-PHZ	Nombre del compuesto 1-hidroxifenacina, una fenacina producida en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
ACP	Proteína portadora de grupo acilo.
AHL	Siglas en inglés de las acil-homoserin-lactonas, (Acylated Homoserine Lactones).
Ap	Antibiótico ampicilina.
C12-HSL	Nombre del autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin-lactona, que interviene como señal molecular en el sistema <i>las</i> de la respuesta sensora de quórum en <i>P. aeruginosa</i> .
C4-HSL	Nombre del autoinductor N-butilil-L-homoserin-lactona, que interviene como señal molecular en el sistema <i>rhl</i> de la respuesta sensora de quórum en <i>P. aeruginosa</i> .
Cb	Antibiótico carbenicilina.
CoA	Grupo coenzima A. Un ácido pantoténico que contiene nucleótido y que funciona en el metabolismo de los ácidos grasos, cuerpos cetónicos y aminoácidos.
DNA	Abreviación en inglés (Deoxyribonucleic Acid) del ácido desoxirribonucleico (ADN).
dTDP-L-ramnosa	Nombre del compuesto desoxi-timidina-di-fosfato-L-ramnosa, precursor en las síntesis de los lipopolisacáridos y de los ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> .
Gm	Antibiótico gentamicina.
HAAs	Nombre en inglés (3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids) del dímero de ácidos grasos β -hidroxidecanoil β -hidroxidecanoato. Precursor esencial en la síntesis de los ramnolípidos (rhls) en <i>P. aeruginosa</i> .
HAQs	Las Hidroxi Alquil Quinolonas son una familia de moléculas señal en la comunicación célula-célula.
HHQ	Precursor directo de la molécula PQS, conocido como 4-hidroxi-2-heptilquinolona.
las	Primer sistema regulatorio (<i>lasI/lasR</i>) en la respuesta sensora de quórum en <i>P. aeruginosa</i> . Activa al sistema <i>rhl</i> y estos dos sistemas forman una cascada regulatoria.
LasI	Proteína codificada por el gen <i>lasI</i> , se encarga de producir la señal química o autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin-lactona, en <i>P. aeruginosa</i> .
LasR	Activador transcripcional dependiente de la densidad celular que es codificado por el gen <i>lasR</i> . Se une al autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin-lactona para activar al sistema <i>rhl</i> y la síntesis de algunos factores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> .

<i>lecA</i>	Gen que codifica para la síntesis de la lectina.
LPSs	Siglas en inglés de los lipopolisacáridos (Lipopolysaccharide), componentes principales de las membranas externas de las bacterias gram-negativas.
LuxR / LuxI	Sistemas regulatorios tipo quórum sensing de la bacteria <i>Vibrio fischeri</i> .
MFS	Siglas en inglés de una de las familias de transportadores en <i>P. aeruginosa</i> , (Major Facilitator Superfamily).
MvfR	Regulador transcripcional en <i>P. aeruginosa</i> .
PCA	Nombre del ácido-1-fenacínico, que es el precursor directo de las fenacinas en <i>P. aeruginosa</i> .
PCN	Abreviación del nombre de la fenacina-1-carboxilamida.
PCR	Siglas en inglés de la reacción en cadena de la polimerasa, (Polymerase Chain Reaction).
PDB	Siglas en inglés del Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank).
<i>phaC</i>	Gen que codifica para la síntesis de la PHA polimerasa (PhaC), cuya función es la de polimerizar los polihidroxicanoatos.
<i>phaG</i>	Gen que codifica para la síntesis de la transacilasa PhaG, cuya función es la de transferir el grupo ACP de la molécula 3-hidroxiacil-ACP por el grupo CoA.
PHAs	Abreviación de los polihidroxicanoatos, que son polímeros que se almacenan dentro de las células de <i>P. aeruginosa</i> .
PPGAS	Nombre del medio líquido de cultivo que favorece la producción de los ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> .
PQS	Molécula señal nombrada 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, que activa algunos genes de virulencia que codifican para la piocianina y la lectina.
<i>pqsABCDE</i>	Operón de las enzimas que catalizan la síntesis de las moléculas HHQ y PQS.
PqsH	Enzima que cataliza la síntesis de la molécula PQS, utilizando como sustrato directo a la molécula HHQ.
PYO	Abreviatura del nombre de la fenacina piocianina, producida por <i>P. aeruginosa</i> .
rhl	Segundo sistema regulatorio (<i>rhlI/rhlR</i>) en la respuesta sensora de quórum en <i>P. aeruginosa</i> . Depende del sistema <i>las</i> para activarse y estos dos sistemas forman una cascada regulatoria.
RhII	Proteína codificada por el gen <i>rhlI</i> , se encarga de producir la señal química o autoinductor N-butil-L-homoserin-lactona en <i>P. aeruginosa</i> .
RhIR	Activador transcripcional dependiente de la densidad celular codificado por el gen <i>rhlR</i> . Se une al autoinductor N-butil-L-homoserin-lactona para activar la síntesis de algunos factores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> .
<i>rhlA</i>	Gen que codifica la síntesis de la proteína RhlA, cuya función es formar el dímero de

ácidos grasos (HAAs) que se emplean como sustrato en la síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa*.

<i>rhlA*</i>	Gen que codifica la proteína RhlA* la cual tiene un cambio en un aminoácido (Leucina por el aminoácido prolina) que se encuentra conservado. RhlA* esta clonada en el vector pAPR1.
<i>rhlAB</i>	Operón que codifica las enzimas para la síntesis de mono-ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> .
<i>rhlC</i>	Gen que codifica la síntesis de la proteína RhlC o Rt2 (ramnosil transferasa 2), cuya función es sintetizar los di-ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> .
<i>rhlS</i>	Abreviatura de los ramnolípidos, que son biosurfactantes glicolípidos excretados al medio y producidos por <i>P. aeruginosa</i> .
<i>rmlBDAC</i>	Operón que codifica las enzimas para la síntesis de la dTDP-L-ramnosa.
RSQ	Nombre del mecanismo que monitorea la densidad celular en <i>P. aeruginosa</i> , (Respuesta Sensora de Quórum).
Rt1	Ramnosil transferasa 1 ó RhlB, se encarga de transferir la ramnosa de la dTDP-L-ramnosa al dímero de ácidos grasos (HAAs) para sintetizar los mono-ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> .
Rt2	Ramnosil transferasa 2 ó RhlC, se encarga de transferir la ramnosa de la dTDP-L-ramnosa al mono-ramnolípidos para sintetizar los di-ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i> .
Tc	Antibiotico tetraciclina.
TLC	Siglas en inglés de la técnica de cromatografía de capa fina, (Thin Layer Chromatography).

PLÁSMIDOS

pBHR81	Derivado de pBBR1MCS-2 que contiene la región codificante del gen <i>phaG</i> río abajo del promotor <i>lac</i> .
pUO58	Derivado de pUC19, contiene un fragmento EcoRI-HindIII de 5.8 Kb que abarca el closter del los genes <i>rhl</i> .
pAPR1	Derivado de pUCP18, contiene la región codificante del gen <i>rhlA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PG201, y lleva una mutación en el aminoácido 335. Se encuentra bajo el promotor <i>lac</i> .
pAPRS	Derivado de pUCP18, contiene la región codificante del gen <i>rhlA</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PG201. Se encuentra bajo el promotor <i>lac</i> .
pUCP20	Derivado del pUCP18, tiene dos orígenes de replicación el <i>colE1</i> y el RO1600.
pUCP18	Vector de expresión con dos orígenes de replicación (<i>colE1</i> y RO1600).



RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa, es un patógeno oportunista y sus cepas son potencialmente patógenas y resistentes a muchos antibióticos. Produce gran número de factores de virulencia como lo son la pirocianina, algunas toxinas, enzimas hidrolíticas y también los biosurfactantes glicolípidos los cuales contienen ramnosa y por eso son llamados ramnolípidos (**rhls**). La biosíntesis de los rhls requiere dos sustratos, la ramnosa proveniente de la desoxi-timidina-difosfo-L-ramnosa (**dTDP-L-ramnosa**) sintetizada por las enzimas codificadas del operón *rmlBDAC* y dímeros de ácidos grasos (**HAAs**). La producción de los rhls se lleva a cabo mediante dos reacciones consecutivas catalizadas por ramnosil transferasas específicas, siendo la Rt1 ó **RhlB** la que acopla una molécula de ramnosa con una molécula de HAAs (producida por **RhlA** la cual al igual que rhlB se encuentra codificada en un operón) para sintetizar **mono-rhl** y la Rt2 ó **RhlC** que forma los **di-rhl** adicionando otra molécula de ramnosa.

La síntesis de rhls comparte algunos pasos biosintéticos con otros compuestos como son los lipopolisacáridos (**LPSs**) y los polihidroxicanoatos (**PHAs**), acumulándose éstos últimos en grandes cantidades como compuestos de almacenaje de carbono y de energía en la célula, además de ser importantes compuestos biotecnológicos (para hacer plásticos biodegradables). Se sintetizan mediante la polimerización de ácidos grasos 3-hidroxi (6-14 átomos de C) que provienen de la síntesis de novo de los ácidos grasos (3-hidroxiacil-ACP) y son sustrato para la transacilasa (**PhaG**) que transfiere el grupo ACP a CoA, y genera el sustrato de **PhaC** que codifica una PHA sintasa.

En otras investigaciones se ha reportado la síntesis de mono-ramnolípidos en *Escherichia coli* (que no produce rhls) mediante la expresión de los genes *rmlBDAC* y *rhlAB* de *P. aeruginosa*, determinándose que esta bacteria puede usar como sustratos para la síntesis de ramnolípidos a

los ACP-ácidos β -hidroxidecanoicos si crece con glucosa como fuente carbono y CoA-ácidos β -hidroxidecanoicos si crece con ácido oleico como fuente carbono. Así, se genera el objetivo fundamental de este trabajo sobre la capacidad que tiene RhlA, no sólo de producir los HAAs, sino también de producir CoA-HAAs que sirven como sustrato a PhaC para la síntesis de PHAs y a RhlB para sintetizar mono-rhls, realizando la actividad de PhaG. Ya que RhlA y PhaG tienen 44% de identidad, es posible que RhlA pueda participar en ambas rutas biosintéticas, la de rhls y de PHAs.

En esta investigación se utilizó a *Pseudomonas putida* KT2440 silvestre (que sólo sintetiza PHAs) y su mutante *phaG* (inhábil para producir PHAs), para estudiar el papel de RhlA en la síntesis de PHAs, cuestionando si el dímero de ácidos grasos (HAAs) producido por esta enzima puede ser utilizado en la síntesis de PHAs, lo que implicaría que la catálisis de RhlA es la de transferir el grupo ACP del dímero de ácidos grasos por el grupo CoA.

Se encontró que RhlA* en trans en *P. putida* es capaz de realizar la misma función catalítica que PhaG transfiriendo un ACP-ácido graso a un CoA-ácido graso, dando sustrato a PhaC que únicamente usa los ácidos grasos unidos a CoA para sintetizar PHAs. También con el empleo de la misma RhlA* en trans pero ahora en el fondo genético de *P. aeruginosa* y en sus mutantes *rhlA* y *rhlB*, se pudo demostrar que la síntesis de rhls en *P. aeruginosa* se sobreexpresa y disminuye la de PHAs, sin embargo, con las mutantes *rhlA* y *rhlB*, no se obtiene una complementación para producir rhls ni tampoco sobreexpresión de los PHAs, indicando que RhlA* da precursores para la síntesis de PHAs.

* Con este símbolo (*), se designará en esta investigación al gen *rhlA** codificado en el vector pAPR1, que expresa a la proteína RhlA* la cual tiene el cambio de una leucina (que se encuentra conservada) por una prolina.



INTRODUCCIÓN

1. *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas aeruginosa* y la aplicación biotecnológica de sus productos, *Pseudomonas putida*.

Pseudomonas sp.

En general, las bacterias del género *Pseudomonas* son gram-negativas y pertenecen a la rama de las gamma (γ) –proteobacterias, su tamaño está dentro del rango de 1.5-3 μm y su forma tiene un diámetro de alrededor de 0.5-0.8 μm (1) El nombre proteobacteria proviene de la denominación hecha en honor al dios griego *Proteus* el cual podía cambiar de forma, ya que en estas bacterias se ha encontrado una gran diversidad de formas. De acuerdo al manual de Bergey (2), las proteobacterias se dividen en cinco grupos, los cuales son considerados usualmente como clases, de acuerdo a las secuencias de ARNr. Dichos grupos han sido denominados mediante las letras griegas: alpha, beta, gamma, delta y epsilon (3). Por otra parte esta clasificación también considera características taxonómicas como son: morfología celular, requerimientos de oxígeno y propiedades nutricionales (1).

Debido a que *Pseudomonas aeruginosa* es la especie de estudio en esta investigación, se abarcará en esta sección únicamente al grupo de las *gamma* proteobacterias con énfasis en *P. aeruginosa*; sin embargo, en el **APÉNDICE B** se explicarán los demás grupos de forma breve.

Las gamma proteobacterias (**FIGURA. 1**) abarcan varios grupos de bacterias importantes

para la ciencia y la medicina, como son los de *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* y *Pseudomonadeceae*, que incluyen varios géneros patógenos importantes, como por ejemplo, *Salmonella* (causante de la enteritis y de la fiebre tifoidea), *Yersinia* (causante de la peste), *Vibrio* (causante del cólera), y la especie *P. aeruginosa* (que causa infecciones del pulmón en pacientes hospitalizados o con fibrosis quística), siendo ésta bacteria considerada como la cepa tipo dentro de la especie *Pseudomonas* (3 y 4).

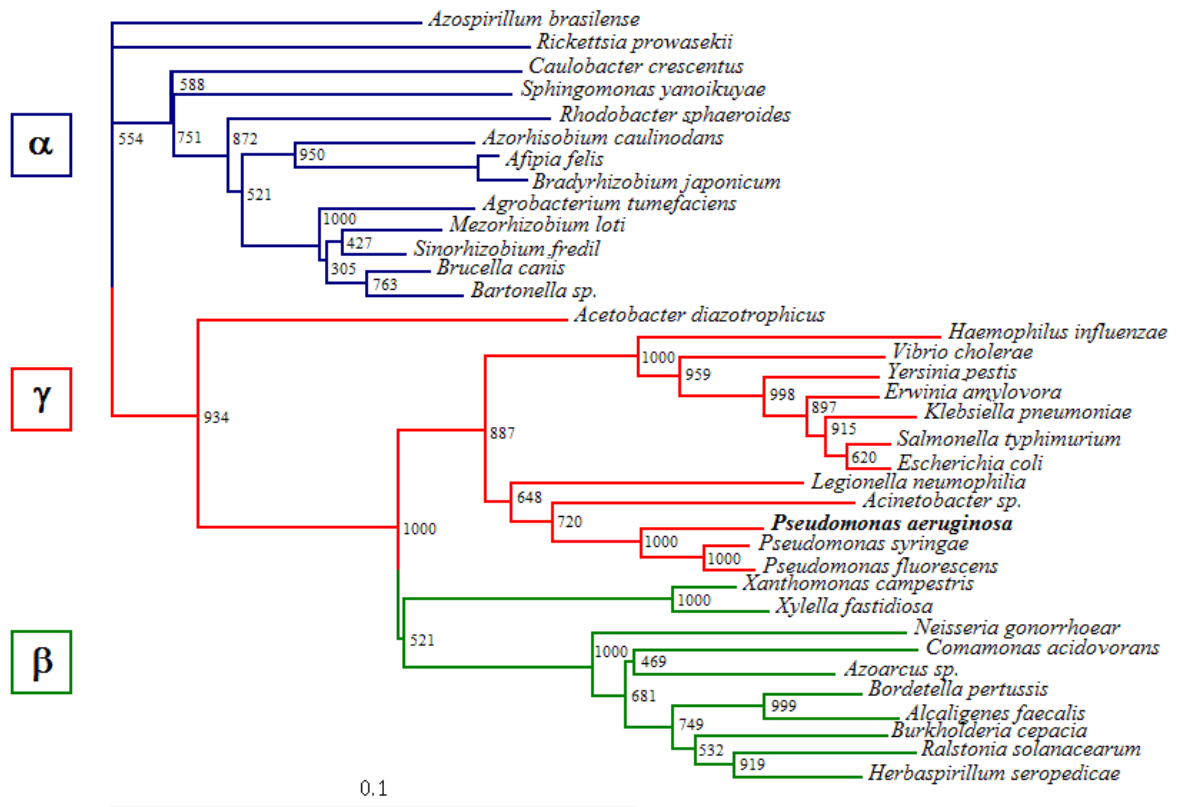


Fig. 1. Árbol filogenético donde se representa a los grupos alfa, gamma y beta de las proteobacterias.

Refiriéndonos al género *Pseudomonas*, podemos mencionar que existen otras especies además de *P. aeruginosa*, como por ejemplo las especies: *acidovorans*, *fluorescens*, *putida*, *syringae*, *indigofera*, *maltophilia*, *multivorans*, *pyocyaneus*, *saccharophilia*, *stutzeri*, *alcaligenes*, etc. Se hallan libres en la naturaleza y se encuentran con gran frecuencia tanto en el suelo como en el agua, si bien algunas de ellas son parásitos y

patógenos de las plantas. De las numerosas especies conocidas, un pequeño número produce enfermedades (algunas graves) en la especie humana, teniendo entre los patógenos más importantes a *P. aeruginosa* (5).

Las *Pseudomonas* presentan la reacción de la oxidasa-positiva (con la excepción de *Pseudomonas maltophilia*) y son móviles gracias a la presencia de flagelos polares, aunque también se pueden encontrar raras excepciones. Su metabolismo es de tipo respiratorio (no fermentativo), sin embargo, existen algunas especies capaces de realizar procesos de desnitrificación en forma de respiración anaerobia usando nitrito como aceptor de electrones. Muchas especies de *Pseudomonas* producen toxinas que varían en potencialidad como: proteasas, hemolisinas, exotoxinas, y fenacinas. Algunas cepas producen pigmentos fluorescentes de color amarillo-verdoso que son sideróforos y solubles en agua, otras además sintetizan diversos pigmentos fenacina tipo-específicos; sin embargo, muchas de ellas son no pigmentadas. Además, pueden utilizar nutrimentos simples y gran variedad de fuentes de carbono, de nitrógeno y mínimas cantidades de compuestos orgánicos. Algunas cepas como las de *P. aeruginosa* pueden crecer a temperaturas de hasta 42°C, lo que les permite colonizar múltiples ambientes (VER TABLA 1 DEL APÉNDICE A) (5 y 6).

El género *Pseudomonas* presenta actividades metabólicas importantes para el ambiente, incluyendo elementos que entran en el ciclo de degradación de contaminantes biogénicos y xenobióticos (112). Además, las *Pseudomonas* tienen un potencial considerable para aplicaciones biotecnológicas, particularmente en las áreas de bioremediación (113), biocatálisis (114), y desempeñándose como agentes de control biológico en la protección de plantas (115), así como para la producción de nuevos bioplásticos (13).

Pseudomonas aeruginosa.

La especie *P. aeruginosa*, (FIGURA 2A) durante mucho tiempo fue llamada *Bacillus pyocyaneus*, y fue aislada en 1882 por Gessard (144), La cepa PAO1 posee un cromosoma circular con un tamaño de 6,264,403 nucleótidos (FIGURA 2B) que fue totalmente secuenciado en el año 2000 y el de la cepa PA14 en el 2005 (19 y 20). En comparación con otras bacterias como *Escherichia coli* (cromosoma con 4,638,858 nucleótidos) se ha considerado grande el cromosoma de *P. aeruginosa* (19). Su contenido de guanina-citosina (G+C) es alto, ya que cuenta con 66.7% de éstos dos nucleótidos respecto al total (20).

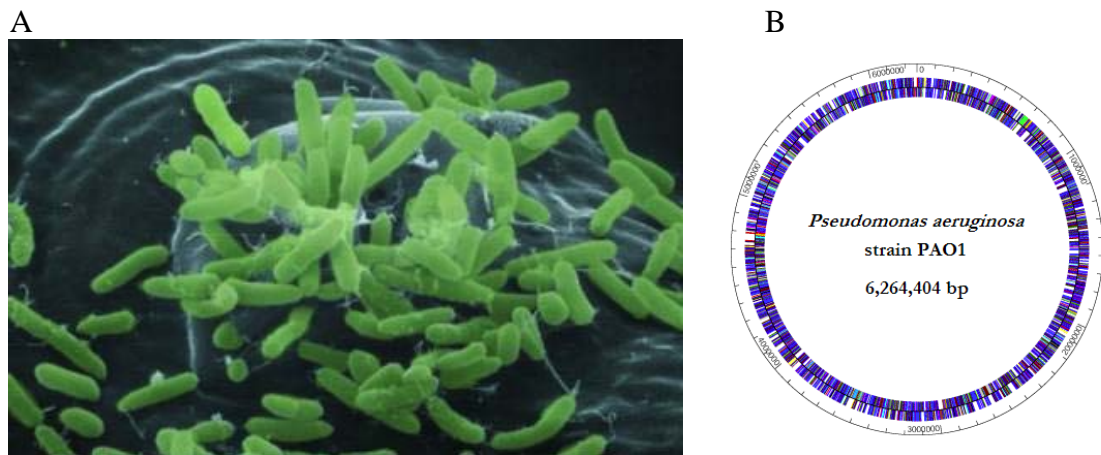


Fig. 2. A) *P. aeruginosa* vista mediante microscopía de barrido (Imagen de Julia Plotnikov).
B) Mapa del cromosoma secuenciado de *P. aeruginosa*.

Esta bacteria ha sido frecuentemente aislada a partir del medio ambiente, plantas y también de diversas lesiones e infecciones humanas donde su presencia ha sido intensamente estudiada (5).

Mediante análisis de alineamiento de secuencias, utilizando programas como el BLAST, los investigadores han podido comparar la secuencia de los genes de esta bacteria con las secuencias de los genes de múltiples microorganismos conocidos y contenidos en los

bancos genéticos (como por ejemplo la base del **Protein Data Bank**). Estos estudios han permitido conocer que la secuencia de algunos de los genes (32%) de *P. aeruginosa*, no presentan homología respecto a las secuencias reportadas, por lo que han surgido interrogantes respecto al papel y la función de dichos genes, ya que podrían codificar proteínas con nuevas funciones enzimáticas (19 y 20).

P. aeruginosa es encontrada comúnmente en el ambiente y puede representar un problema, ya que es muy hábil para causar infecciones en muchos tipos de hospederos como insectos (*Drosophila melanogaster*), plantas (*Arabidopsis thaliana*) y animales (*Caenorhabditis elegans*), incluyendo al hombre. Además, todas las cepas de *P. aeruginosa* son potencialmente patógenas y resistentes a muchos antibióticos, lo que dificulta tratar las infecciones que causa (7). De ahí que, con la introducción de los antibióticos de amplio espectro, *P. aeruginosa* se convirtiera en uno de los agentes principales de infecciones hospitalarias, especialmente en individuos debilitados por procesos crónicos y en pacientes tratados (o tratados en exceso) con antibióticos de amplio espectro o con corticosteroides. El tratamiento de estas infecciones por *P. aeruginosa* es difícil y la mortalidad por septicemia de esta bacteria puede ser superior al 80% (5).

Esta capacidad de resistencia está relacionada con la baja permeabilidad de su membrana externa, que permite la difusión de los solutos hidrofílicos pequeños, pero muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos que depende de las porinas. Esta resistencia tanto intrínseca como adquirida, depende principalmente de la presencia de un gran número de transportadores que secretan estos compuestos al exterior de la célula. Estos transportadores se agrupan en dos familias, según su parecido estructural, la primera son los sistemas de exportación llamados “efflux”, y la segunda se denomina MFS, por sus siglas en inglés (**M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily) (8). Además, también ha

podido entenderse dicha cualidad resistente mediante los estudios de alineamientos, que permiten detectar gran abundancia de genes que parecen codificar para bombas que tienen como función, excretar los compuestos tóxicos fuera de la célula (19 y 20), generándose la idea de que dicha abundancia de transportadores está ligada con su alta resistencia a los muchos y variados antibióticos y a compuestos tóxicos, permitiéndole gran resistencia y versatilidad (22 y 23).

Al igual que todas las *Pseudomonas*, sus necesidades nutritivas son simples (incluyendo al NH₃ como fuente de nitrógeno) y es capaz de utilizar gran variedad de fuentes de carbono, lo que permite que pueda multiplicarse y crecer con facilidad en prácticamente cualquier ambiente húmedo que contenga tan sólo cantidades mínimas de compuestos orgánicos, por lo que algunos autores la han llegado a considerar ubicua, por ejemplo, puede crecer en los colirios, en las soluciones antisépticas débiles, en el jabón, en los equipos de anestesia, en los humidificantes, e incluso en el agua destilada, en medios de laboratorio estándar y con temperatura de hasta 42° C. En medios como el agar-sangre, se recuperan cepas del material clínico que son generalmente del tipo hemolíticas β. Alrededor de un 10% de las cepas son incapaces de formar pigmentos (VER TABLA 2 DEL APÉNDICE A, donde se resumen las reacciones bioquímicas útiles para identificar a las *Pseudomonas*) (5).

Este microorganismo, frecuentemente se puede aislar del 16% de casos con neumonía, del 12% en infecciones urinarias, del 10% en sangre, de forma esporádica de zonas húmedas de la piel (axila, ingle) y en la saliva. También se ha reportado que del 2 al 8% de los aislados provienen de heces y del conducto intestinal del 10% de individuos sanos, mostrándose un contacto cotidiano con esta bacteria, lo que demuestra que *P. aeruginosa* sólo es una amenaza para la salud en condiciones especiales (5, 7 y 8).

Como se mencionó, *P. aeruginosa* puede causar infecciones en humanos, ya que es

capaz de colonizar algunas superficies mucosas e invadir tejidos y sangre. De forma aguda, resulta especialmente peligrosa en grupos humanos poblacionales vulnerables conformados por enfermos que padecen cáncer, quemaduras, heridas, leucemia, abscesos y meningitis, casos de septicemia, tratamiento con drogas inmunosupresivas, infecciones en el tracto urinario, bronconeumonías (infecciones crónicas que acompañan la fibrosis quística), y endocarditis bacterianas sub-agudas. Además, los compuestos tóxicos que produce la bacteria causan daño tisular extenso e interfieren en el funcionamiento del sistema inmune (deficiente), no existiendo un tratamiento efectivo contra este tipo de bacteria.

Se sabe que esta bacteria puede adherirse a las superficies formando agregados bacteriales llamados biopelículas que son difíciles de eliminar, por lo que son excelentes contaminantes de dispositivos que se implantan dentro del cuerpo, como por ejemplo los catéteres. Esta misma característica permite que en algunos procesos industriales provoquen taponamiento y corrosión de algunas conexiones y de filtros (7). También en la industria alimentaria pueden provocar problemas al descomponer los alimentos en refrigeración, ya que la bacteria puede mantener un bajo metabolismo basal en estas condiciones y producir enzimas hidrolíticas (9).

Aplicación biotecnológica de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa es una bacteria que no sólo causa problemas, sino que al igual que otras bacterias, le brinda al hombre algunas ventajas al producir diversos productos o metabolitos secundarios (revisados en la sección 2 con más detalle) de utilidad, ya que éstos pueden tener diversas aplicaciones biotecnológicas en diferentes áreas como la ambiental, en particular por los biosurfactantes ramnolípidos o los polímeros polihidroxicanoatos (que serán revisados en detalle más adelante). Los biosurfactantes como los ramnolípidos son útiles para la limpieza de suelos contaminados con

hidrocarburos (11) o con metales pesados (12). Por otro lado, con la producción de los polímeros mencionados pueden elaborarse plásticos biodegradables (13). También, la síntesis de enzimas como la lipasa (14) permite al hombre distintas aplicaciones potenciales (15). Se puede mencionar además que *P. aeruginosa* es uno de pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada (10).

Otros compuestos producidos por *P. aeruginosa*, como son las fenacinas incluyendo a la piocianina (de la cual se hablará en más detalle posteriormente), han tenido un empleo en las áreas médica y ambiental por el hecho de tener un carácter de tipo antibiótico (17).

Como se puede ver *P. aeruginosa* representa un modelo de gran interés biotecnológico y es una de las bacterias más estudiadas a nivel molecular, por lo que toda la información respecto al cromosoma y sus genes (que en el año 2000 fueron totalmente descifrados) han sido puestos a disposición en la red de Internet con los siguientes enlaces: <http://v2.pseudomonas.com> y www.pseudomonas.com), bajo el nombre de PAO1, que como ya se mencionó, es la cepa tipo de *P. aeruginosa*. El proyecto de secuenciación del genoma de la cepa PAO1 fue realizado por la fundación para la Fibrosis Quística, la Universidad de Washington y la compañía Patogenesis. Estas instituciones, al igual que algunas compañías farmacéuticas (como es el caso de la empresa Chiron que pertenece a Novartis (18)), tienen un interés fundamentalmente clínico y se han interesado en conocer más sobre los genes y enfermedades causadas por esta bacteria. La información genómica disponible permite entender mucho mejor la fisiología de estos microorganismos y utilizar estos conocimientos para que estas empresas puedan llevar a cabo su objetivo principal, que es crear mediante herramientas bioingenieriles, nuevas drogas antibacteriales o fármacos que permitan combatir el desarrollo de las enfermedades creadas por *P. aeruginosa* y curar satisfactoriamente infecciones provocadas no sólo por esta bacteria sino por diversos microorganismos.

Además, de permitirse lo anterior con el análisis de la secuencia del genoma de *P. aeruginosa*, se ha logrado la identificación de genes involucrados en locomoción, adhesión, transporte y utilización de nutrientes, flujo de antibióticos y sistemas que involucran sensibilidad o respuesta a cambios en el medio ambiente (19 y 20).

***Pseudomonas putida* KT2440.**

Pseudomonas putida KT2440 (116 y 117) es la *Pseudomonas* saprofítica más caracterizada a nivel molecular. Esta bacteria es el paradigma de una clase de bacteria cosmopolita encontrada en ambientes terrestres y acuáticos de donde puede usar un gran rango de sustratos para su crecimiento (21), por su metabolismo que es extremadamente versátil y particularmente por su habilidad para mineralizar compuestos orgánicos complejos (113). *P. putida* KT2440 deriva de una bacteria degradadora de tolueno (porque poseía el plásmido TOL), a la cual originalmente se le llamó *Pseudomonas arvilla* mt-2 (118) y subsecuentemente fue reclasificada como *Pseudomonas putida* mt-2 (119 y 120).

La cepa KT2440 es la primera bacteria gram negativa del suelo en haber sido certificada por el Comité Consultor de Recombinación de DNA (121), quienes le dieron el título de hospedero bioseguro para la clonación de genes extraños, por lo que se ha hecho de esta bacteria uno de los fondos genéticos preferidos para clonar y expresar genes de bacterias gram-negativas del suelo (122). Comúnmente se ha utilizado a *P. putida* KT2440 (116) debido a que tiene una gran variedad de aplicaciones en biotransformación donde esta bacteria tiene considerable potencial para aplicaciones biotecnológicas, biorremediación y agricultura, donde, debido a su habilidad para colonizar la rizosfera de plantas (123), puede facilitar el desarrollo de biopesticidas y promotores del crecimiento (21).

Aunque *P. putida* KT2440 ha sido aprobada como una cepa biológicamente segura, la

bacteria comparte una interrelación evolutiva estrecha con *P. aeruginosa* que es un patógeno oportunista en el hombre (124) y otras *Pseudomonas* que son patógenos de las plantas (21 y 106).

Existen dos secuencias de genomas de *Pseudomonas* tipo I que comúnmente se utilizan y son las de *P. aeruginosa* PAO1 y la de *P. putida* KT2440 (106). El genoma de *P. putida* KT2440 (FIGURA 3) y (TABLA 1) fue secuenciado por el procedimiento de random shotgun por el Instituto para investigación genómica (TIGR, The Institute for Genomic Research) y un consorcio alemán (21). Consiste de un cromosoma circular simple que codifica más de 5000 genes, su tamaño es de 6,181,863 pb con un contenido promedio de G+C del 61.6% y está reportado en el Gen Bank con número de acceso AE15451 (<http://www.tigr.org>) (21 y 106).

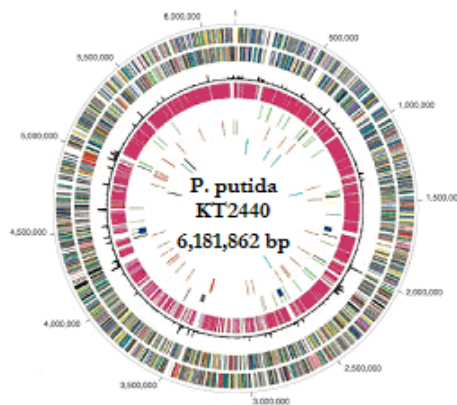


Figura. 3. Representación circular del genoma de *P. putida* KT2440 (106).

Tabla 1. Características generales del genoma de *P. putida* KT2440.

TOPOLOGÍA	CROMOSOMA CIRCULAR SIMPLE
Tamaño (pb)	6 181 862
Contenido de G+C (%): termino (rango)	61.6 (43-69)
No. De ORF's (predichos con programa GUMMER (111))	5420
Promedio del tamaño de ORF's (pb)	1003
% de la región no codificante	12.0

El genoma de *P. putida* contiene 1231 ORF's (22.7% del total) que están ausentes en *P. aeruginosa*. Éstos incluyen 226 proteínas hipotéticas conservadas, 575 proteínas hipotéticas, un operón para la biosíntesis de celulosa, un nuevo operón para la biosíntesis de polisacárido, 36 elementos transponibles hipotéticos, tres fagos, nueve intrones del grupo II, dos proteínas de resistencia a tolueno, 75 proteínas que están involucradas en el metabolismo de energía y genes para la biosíntesis de pili tipo IV (106).

El análisis de la secuencia del genoma de *P. putida* KT2440, reveló también la existencia de diversos sistemas metabólicos y de transporte y aunque se tiene un alto nivel de conservación del genoma de *P. aeruginosa* (siendo el 85% de las regiones codificantes) se encuentran ausentes los factores clave determinantes de virulencia y características asociadas a la virulencia, incluyendo genes para la exotoxina A, elastasa, exolipasa, fosfolipasa C, proteasa alcalina, una ruta de secreción de tipo III (21), dos transportadores *Nramp* manganeso/hierro y un operón para la síntesis de ramnolípidos (106). Sin embargo, es relevante señalar que *P. putida* sí cuenta con los genes para la síntesis de ácidos polihidroxicanoicos que facilitan el desarrollo de nuevos bioplásticos (13, 125, 126 y 127). *P. putida* cuenta con genes homólogos de *P. aeruginosa* (19), muchos de los cuales están involucrados en características de virulencia en PAO1: proteínas de adición a superficie, reguladores de la síntesis de pili, elementos del sistema de secreción de los tipos I y II, enzimas para las biosíntesis de cobalamina o pioverdina y elementos para la degradación o reparación del DNA (110, 19). Así también, observaron que KT2440 posee aproximadamente 350 sistemas de transporte de membrana citoplásmica, es decir, 15% más que *P. aeruginosa* (106).

Aproximadamente el 60% de las secuencias codificantes predichas son más similares entre estas dos especies de *Pseudomonas* que para alguno de los otros genomas

microbiales secuenciados (21), sin embargo, las dos especies de *Pseudomonas* son distintas en su huella genómica (la cual ofrece información sobre la expresión de todos los genes y todas las variaciones genéticas de un individuo o un organismo) (106). Además, el análisis del genoma de *P. putida* muestra su naturaleza no patogénica, lo que puede ser un punto clave para un empleo potencial en la agricultura, biocatálisis, bioremediación y producción de bioplásticos (21).

Algunos sistemas adicionales que parecen tener características asociadas a virulencia las han identificado analizando el genoma entero, por ejemplo la capacidad de mostrar quórum sensing, es una característica asociada a la virulencia en *P. aeruginosa*, pero aunque KT2440 tiene genes para la producción de homoserina lactona, esta bacteria aparentemente no produce cantidades detectables de esta molécula señal (106).

2. Factores de virulencia y sistema sensor de *quorum* en *Pseudomonas aeruginosa*.

Factores de virulencia.

En *P. aeruginosa*, los genes que son más importantes en el proceso de infección son inducidos durante la colonización y después pueden causar gran daño al tejido, invasión en el torrente sanguíneo, y diseminación (25 y 26). Aunque *P. aeruginosa* es una bacteria que no invade la mucosa normal, puede causar serias infecciones nosocomiales en individuos inmuno-comprometidos y en pacientes con fibrosis quística (27).

P. aeruginosa tiene dos tipos de factores de virulencia, los asociados a la célula (flagelo, pili, adhesinas, alginato, biofilm, lipopolisacáridos) y los extracelulares (proteasas,

hemolisinas, exotoxina A, exoenzima S, piocianina) (FIGURA. 4) (25 y 26).

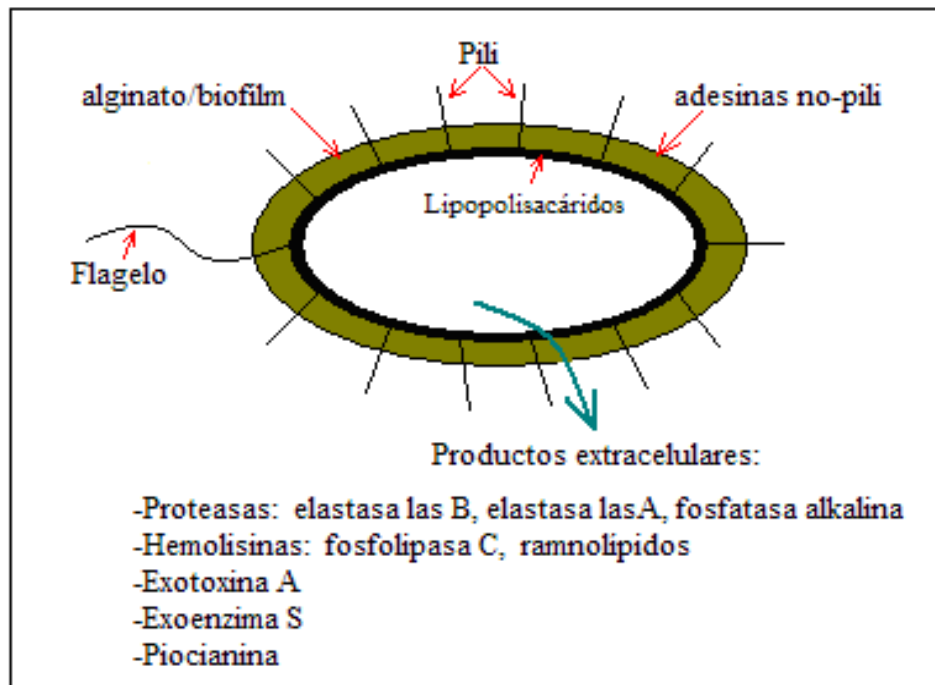


Fig. 4. Factores de virulencia en *P. aeruginosa*.

Existen también muchos otros metabolitos secundarios producidos por *P. aeruginosa*, (VER TABLA 3 DEL APÉNDICE A), los cuales intervienen para incrementar la virulencia de la bacteria, ya que pueden contribuir a la invasión de los tejidos por sus efectos citotóxicos, tal es el caso de las lectinas así como de las hemolisinas (fosfolipasa C y ramnolípidos, siendo estos últimos descritos más adelante), que pueden actuar sinérgicamente para disolver membranas lipídicas (25 y 26). Además de los factores descritos, existen otros que participan en la virulencia, pero aún no se ha descrito un modelo detallado de los factores infecciosos que participan en el establecimiento de las infecciones en *P. aeruginosa* (29).

En *P. aeruginosa*, muchos de los genes de virulencia son conocidos y se encuentran regulados en respuesta a diferentes señales ambientales que comúnmente se encuentran

en el hospedero. Por ejemplo, la expresión de la exotoxina A, el factor más tóxico de *P. aeruginosa* y la piocianina, (que es un compuesto redox muy activo que produce múltiples efectos citoplásmicos en las células de los mamíferos, y que es producido únicamente por esta especie), son estimulados por la limitación de hierro que se encuentra en el ambiente *in vivo* de tejidos animales y del humano. Aunque se sabe que mutantes de *P. aeruginosa* defectuosos en la producción de la exotoxina A, exoenzima S, elastasa o fosfatasa alcalina tienen una virulencia reducida, la contribución de un factor dado puede variar con el tipo de infección (25 y 26).

Sistema sensor de quórum.

P. aeruginosa parece controlar la producción de muchos de sus factores de virulencia extracelulares mediante mecanismos que monitorean la densidad celular bacteriana (TABLA 2). Este proceso se conoce como “respuesta sensora de *quorum*” (RSQ) y es un fenómeno genérico descrito en muchas bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas, y le permite a la bacteria entrar en el tipo de comunicación y señalización bacteriana célula-célula, mediante sistemas de señal-detección y mecanismos de señal-transducción para procesar la información que se encuentra contenida en la señal y reaccionar apropiadamente mediante cambios en la regulación de un gran número de genes (28), incluyendo numerosos factores de virulencia, e involucrando múltiples compuestos para hacer eficiente la patogenia de la bacteria de forma coordinada a densidades específicas (29 y 30). Así, la bacteria obtiene una gran ventaja, que le permite detectar cambios en su ambiente mediante su propia densidad celular y puede comunicarse con toda una población en vez de permanecer como células individuales (25).

Tabla 2. Funciones reguladas por el circuito sensor de quórum en *P. aeruginosa*.

RASGOS FENOTÍPICOS BAJO EL CONTROL SENSORIAL DE QUÓRUM EN <i>P. aeruginosa</i> .
Biosíntesis de adhesinas (lectinas)
Biosíntesis de exotoxina A
Biosíntesis de proteasa
Formación de biofilms
Motilidad tipo swarming
Neuraminidasa
Proteínas del sistema de secreción del tipo III
Síntesis de acil-homoserin-lactonas
Síntesis de Ácido cianhídrico
Síntesis de las enzimas de respuesta al estrés oxidativo (catalasa, superóxido dismutasa)
Síntesis de piocianina
Síntesis de PQS
Síntesis de ramnolípidos

Actualmente se conoce que *P. aeruginosa* posee, un sistema múltiple de quórum que es jerárquico y en forma de cascada (FIGURA. 5).

Este regulón está formado por dos sistemas completos dependientes de N-acilhomoserinlactonas (AHL) como autoinductores llamados LasR/LasI y RhlR/RhII, mejor conocidos como sistema *las* y sistema *rhl* (31). Estos sistemas regulatorios son comparables al primer sistema tipo sensor de quórum caracterizado, LuxR/LuxI que pertenece a la bacteria marina *Vibrio fischeri* (28).

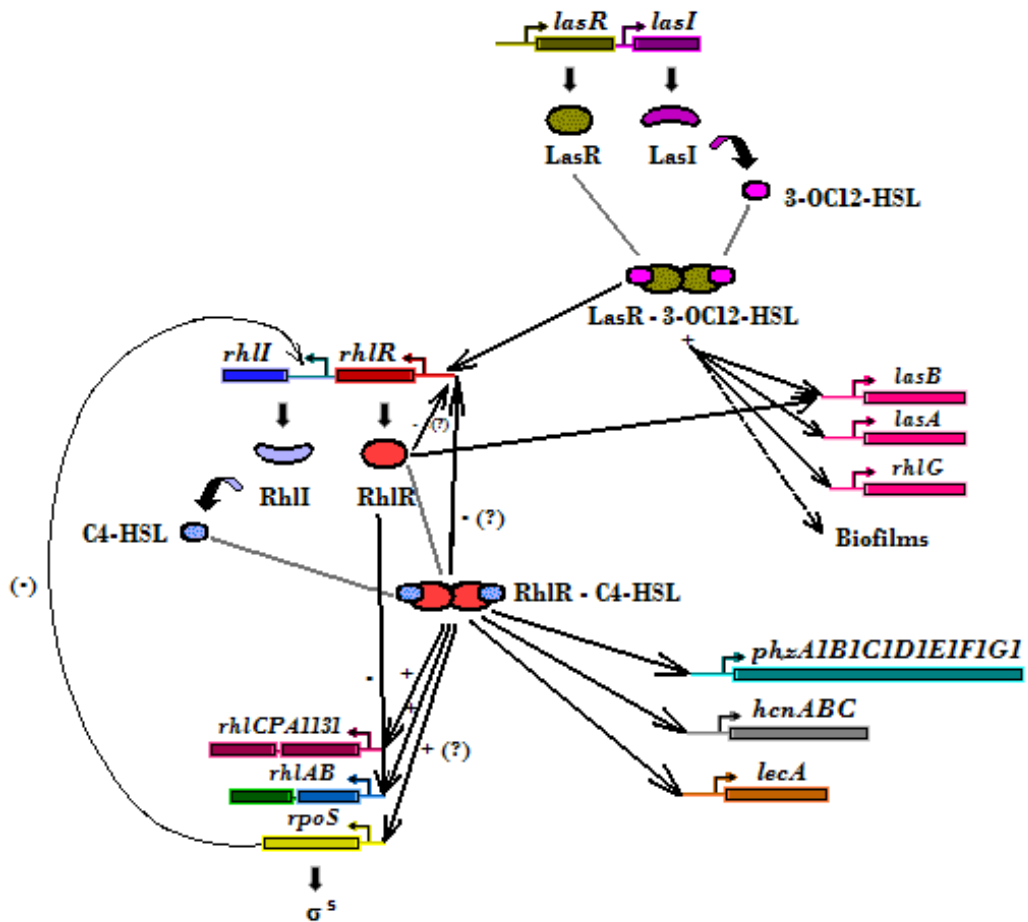


Figura 5. Esquema del proceso regulatorio en *P. aeruginosa*, integrado por los genes regulados por la respuesta sensora de quórum (RSQ) que permite la regulación de muchos genes, incluyendo algunos que codifican para factores de virulencia (27, 30).

De forma específica, el sistema sensor de quórum comprende dos partes esenciales que se ven representadas claramente si tomamos como ejemplo el sistema sensor de quórum de la bacteria marina *V. fischeri* que regula los genes de luminiscencia (28):

- a) Una señal química generada por la misma bacteria (autoinductor), producida por la proteína codificada por el gen *luxI*. La señal química es la N-acilhomoserin lactona N-(3-oxohexanoil) homoserin lactona (36).
- b) Un activador transcripcional dependiente de la densidad celular codificado por *luxR* (36).

Como se mencionó anteriormente, es frecuente que en bacterias gram-negativas las moléculas señal producidas sean las pertenecientes a la familia acil-homoserin-lactonas abreviadas AHLs (**A**cylated **H**omoserine **L**actones). Estos autoinductores tienen como base molecular común, una homoserin lactona, y su diferencia radica en el tamaño y las sustituciones de la cadena lateral (32) (FIGURA. 6). Aunque *P. aeruginosa* es capaz de producir diversas moléculas (28), produce mayormente dos moléculas señal (31), los autoinductores N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin-lactona (C12-HSL), y el N-butiril-L-homoserin-lactona (C4-HSL) (36).

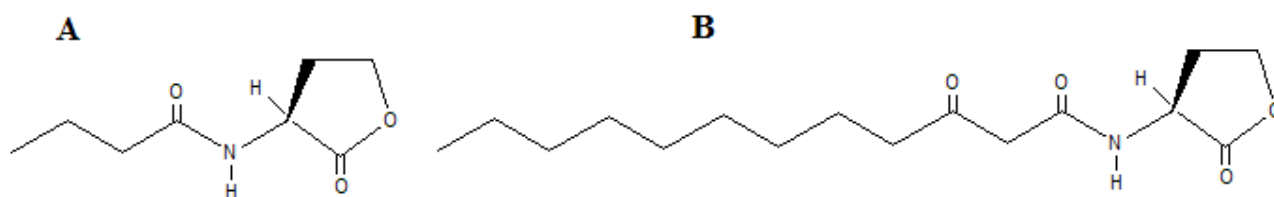


Figura 6. A) Estructura de la molécula N-butiril-L-homoserin-lactona.
B) Estructura de la molécula N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin-lactona (34).

Cuando los autoinductores se encuentran en muy bajas concentraciones, se sintetizan en un nivel basal y su difusión al medio los diluye, sin embargo, cuando se incrementa la densidad celular, también aumenta la concentración de los autoinductores y las células pasan a lo que se denomina concentración crítica, permitiéndose que los autoinductores se unan de forma específica a su proteína cognada y a su vez se aumente la transcripción de los genes blanco y de la proteína LuxI. En *P. aeruginosa* los reguladores que participan en el sistema sensor de quórum son LasR (para 3-oxo-C12-homoserin-lactona) y RhlR (para C4-homoserin-lactona) (25 y 33). Estas proteínas reguladoras por sí mismas no son activas sin su correspondiente autoinductor y a este complejo se le ha denominado complejo proteína/autoinductor, que se une a una secuencia específica de DNA río arriba de los genes blanco para aumentar su transcripción (25). Sin embargo, los

sistemas Las y Rhl no son independientes y forman una cascada regulatoria en la cual LasR en combinación con su ligando cognado 3-O-C12-HSL activa la expresión de *rhlR* y *rhlI* (27).

En *P. aeruginosa*, además de los dos tipos de autoinductores como el 3-oxo-C12-homoserin-lactona y el C4-homoserin-lactona (que son acil homoserin lactonas) se han identificado otras moléculas señal involucradas en la comunicación intracelular. Estas moléculas son la 3,4-hidroxi-2-heptilquinolina (PQS) y la 4-hidroxi-2-heptilquinolina (HHQ), (FIGURA. 7 y se tratarán en el punto 3 de esta sección), que pertenecen a la familia de las 4-hidroxi-2-alkilquinolonas (HAQs), (34) incluyendo a los N óxidos que exhiben actividades antimicrobiales (35).

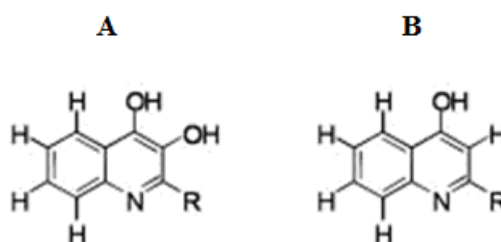


Figura 7. A) Estructura de la molécula PQS B) Estructura de la molécula HHQ (34).

3. PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona), HHQ (4-hidroxi-2-heptilquinolina) y su biosíntesis.

PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona) y HHQ (4-hidroxi-2-heptilquinolina).

Como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* produce dos tipos de señales de comunicación célula-célula, siendo la primera mediante miembros de la familia acil-homoserina lactona, que regulan la RSQ y a su vez la expresión de ciertos genes entre

los que figuran los que se expresan para producir ramnolípidos. La segunda es por moléculas que se relacionan también la comunicación intracelular afectando parcialmente dicha RSQ, y pertenecen a la familia de las 4-hidroxi-2-alkilquinolonas (HAQs) (FIGURAS. 6 y 7) (27).

El PQS se secreta de la célula mediante vesículas y actúa como señal molecular modulando la expresión de los genes y tiene un papel central en la expresión de muchos aspectos asociados a la virulencia como lo es la biosíntesis de piocianina y la lectina codificada por el gen *lecA* (27 y 34). Estos factores de virulencia también son regulados por la respuesta sensora de quórum (FIGURA 5), pero se desconoce la interrelación entre esta respuesta y la mediada por PQS.

PQS ha podido ser detectada mediante cromatografía de capa fina en muestras de esputo en infecciones pulmonares crónicas de pacientes con fibrosis quística (38 y 49). Actualmente se han publicado diversos métodos para la detección de PQS, entre ellos un ensayo biológico indirecto, el cual monitorea la expresión de una fusión *lasB-lacZ* una vez expuesta a diferentes concentraciones de PQS (35), y un método de separación mediante cromatografía de capa fina seguida por un análisis de densitometría (38, 50 y 51).

Por otro lado, se ha visto que la molécula 4-hidroxi-2-heptilquinolina conocida como HHQ es precursor directo de PQS, y estas dos moléculas participan en la regulación de la expresión genética a través de interaccionar con la proteína reguladora de la familia LysR llamada MvfR o PqsR (34 y 91).

Biosíntesis de PQS y HHQ.

La biosíntesis en *P. aeruginosa* de HAQs involucra como precursores esenciales

directos al ácido antranílico y a los ácidos grasos β -ceto (β -cetodecanoico ó β -cetododecanoico), y que mediante la catálisis de las enzimas codificadas en el operón *pqsABCDE*, se puede sintetizar la molécula de PQS, como se muestra en el esquema presentado en la (FIGURA. 8) (32 y 34).

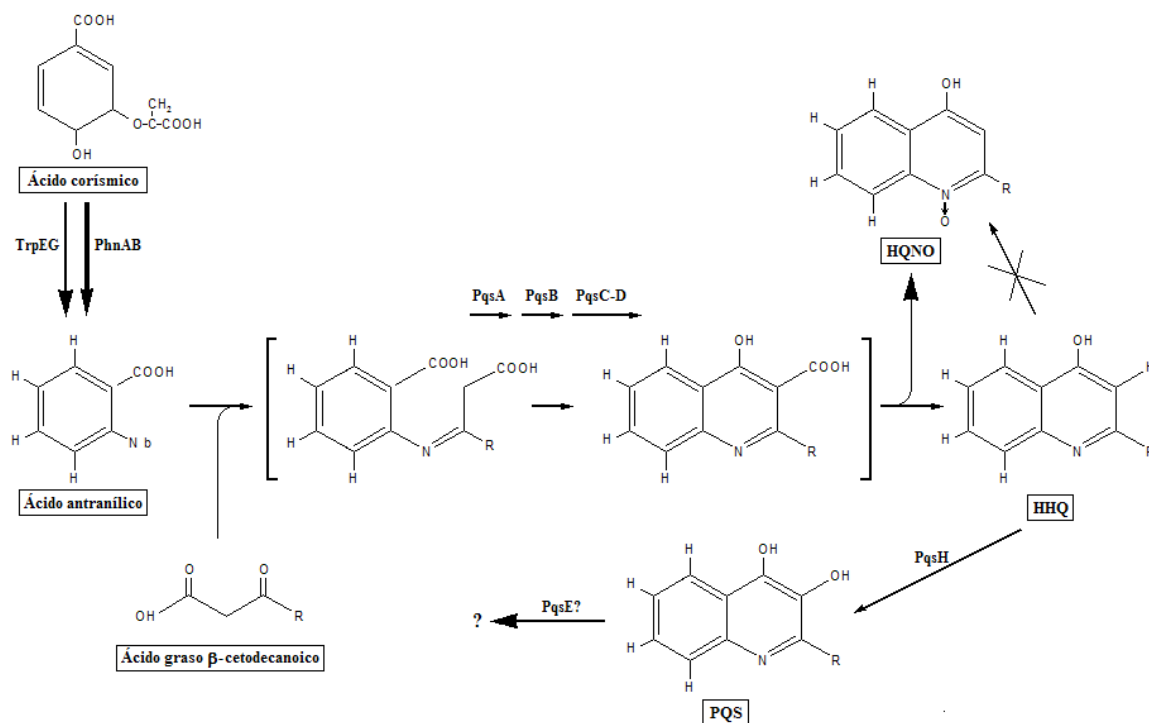


Figura 8. Ruta de biosíntesis de la molécula PQS (32 y 34).

Por otra parte, algunos autores han mostrado mediante el análisis de las HAQs por cromatografía líquida, que el operón *pqsABCDE*, codifica enzimas que dirigen la biosíntesis de cinco clases de HAQs, incluyendo moléculas que funcionan como antibióticos e inhibidores de citocromo y significativamente como moléculas de comunicación intercelular como HHQ y PQS (FIGURA. 7) (34).

Otros tipos de estudios sobre expresión han permitido demostrar que el regulador transcripcional MvfR, controla la expresión del operón *pqsABCDE* (31) y que HHQ

además del propio PQS (34) puede hacer el papel de mensajero extracelular, que al ser alcanzado por otra célula bacterial o tomado por una célula vecina, se pudiera convertir en PQS mediante la acción de la enzima PqsH monoxigenasa FAD-dependiente, para ser usado como molécula señal por otras células cercanas (FIGURA. 9) (31). También HHQ interacciona con MvfR (91).

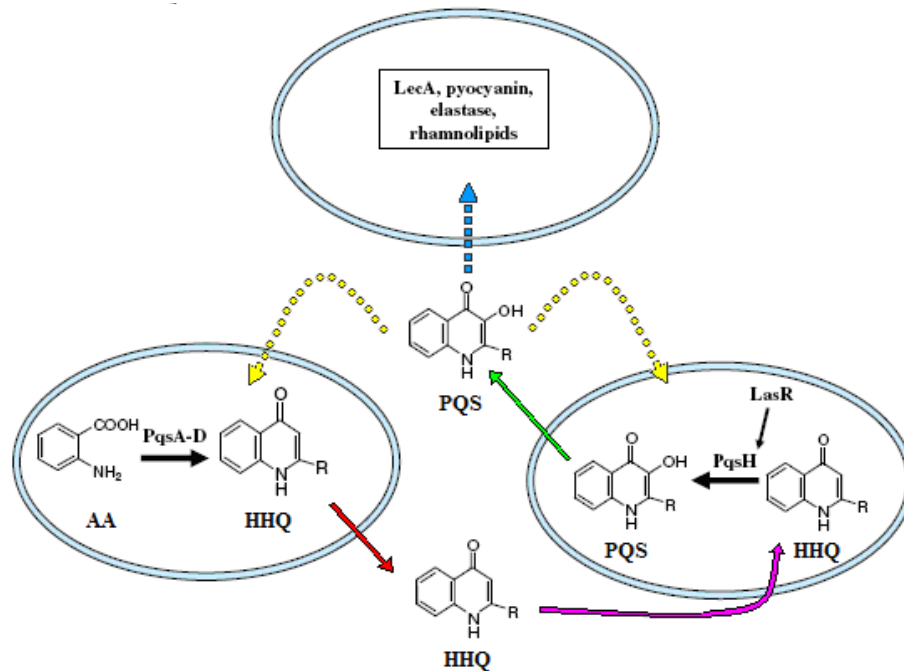


Figura 9. Sistema de comunicación donde interviene PQS y HHQ (31)

4. Rhamnolípidos, ruta biosintética y aplicación biotecnológica.

Rhamnolípidos.

P. aeruginosa es conocida por producir y secretar grandes cantidades de los biosurfactantes glicolípidos que contienen rannosa y por lo que son denominados rhamnolípidos, siendo objetivo primordial y de gran interés en esta investigación por el potencial biotecnológico que presentan y del cual se explicara más adelante (11).

Sin embargo existen muchos microorganismos que son capaces de producir surfactantes, tal es el caso de los géneros *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Candida* y *Torulopsis*, como se muestra en la TABLA 3 (60 y 61).

TABLA 3. Fuente y propiedades importantes de tipos de surfactantes (glicolípidos) microbianos (61 y 84).

Biosurfactante	Microorganismo	Tensión superficial (mN/m)	CMC	Tensión interfacial (mN/m)
Glicolípidos				
Ramnolípidos	<i>P. aeruginosa</i>	29		0.25
	<i>Pseudomonas</i> sp.	25–30	0.1–10	1
Trealolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32–36	4	14–17
	<i>Nocardia erythropolis</i>	30	20	3.5
	<i>Mycobacterium</i> sp.	38	0.3	15
Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>	33		1.8
	<i>Torulopsis apicola</i>	30		0.9
	<i>Torulopsis petrophilum</i>			
Celobiolípidos	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>Ustilago maydis</i>			

CMC = Concentración Micelar Crítica.

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas que pueden modificar las propiedades de un medio líquido en una superficie o interfase por la reducción de la tensión superficial, y se les han atribuido diversos papeles en la fisiología de los organismos:

1. Aumentan la biodegradación de fuentes de carbono orgánicas y solubles como los hidrocarburos del petróleo (62).
2. Ayudan en la unión y desunión de las bacterias a superficies (61) y permiten la colonización en la superficie de las hojas (67).
3. Se utilizan en mecanismos de defensa bacterial (61).
4. Funcionan como un factor de virulencia contra microorganismos patógenos de plantas (64, 65) y animales (66).

El aislamiento e investigación de la producción de los ramnolípidos fue primeramente reportado en 1949 por Jarvis et al (48), quien definió su estructura química y demostró la presencia de una unión glicosídica del β -hidroxidecanoil β -hidroxidecanoato con dos moléculas de ramnosa, obtenidos de aislados de *P. aeruginosa* creciendo bajo glicerol como fuente de carbono (FIGURA. 10) (42 y 48).

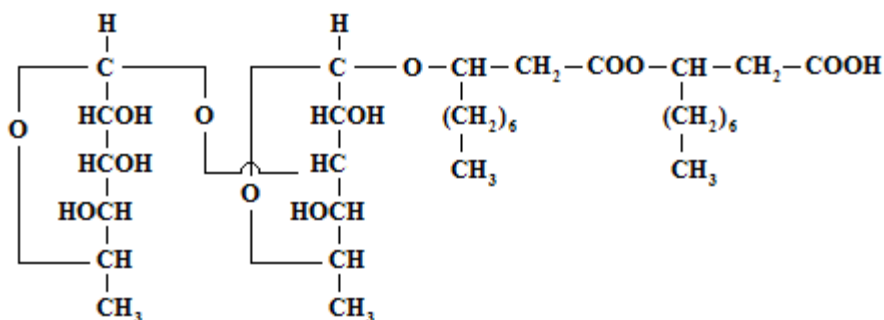


Figura 10. Estructura química de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa*, conteniendo dos moléculas de ramnosa (48).

Los ramnolípidos son secretados de la célula durante las fases de crecimiento que corresponden a la pre-estacionaria y estacionaria y pueden ser detectados y medidos mediante el método de orcinol (descrito en detalle en la parte de materiales y métodos).

Las moléculas de ramnolípidos son solubles en metanol, cloroformo, y éter etílico, y tienen buena solubilidad en soluciones acuosas alcalinas, aunque la propiedad más conocida de los ramnolípidos es su característica tenso-activa, que permite la reducción de la tensión superficial del agua (56).

En general, los ramnolípidos pueden ser producidos usando varios sustratos que pueden ser de tipo hidrofílicos e hidrofóbicos y que son relativamente baratos, tales como carbohidratos, aceites vegetales, y hasta mediante desechos provenientes de la industria alimentaria (56). Además, la limitación en la concentración de algunos iones como son el

hierro, magnesio, calcio, potasio, y sodio, permite una buena producción de los ramnolípidos (58), y mejor aún, la limitación de fósforo hace la producción más efectiva, ya que permite el aumento de 4-5 veces de la productividad (57). También se ha reportado que la producción de los ramnolípidos por *P. aeruginosa* creciendo con glucosa como fuente de carbono, es óptima a 37°C (59).

En cultivo líquido y bajo condiciones específicas, *P. aeruginosa* puede producir dichos biosurfactantes, obteniéndose dos formas de ramnolípidos, los mono-ramnolípidos y los di-ramnolípidos (66 y 42).

Estos compuestos están predominantemente constituidos por la unión de uno o dos moléculas del azúcar ramnosa y dos moléculas de ácidos grasos β-hidroxi (3-hidroxi) (54). Los ramnolípidos con una molécula de azúcar son referidos como mono-ramnolípidos, mientras que los que contienen dos moléculas de ramnosa son di-ramnolípidos. El tamaño de la cadena de carbono encontrada en las porciones de β-hidroxiacil de los ramnolípidos puede variar, sin embargo, la extensión de la cadena de carbono que predomina es la de 10 carbonos (FIGURA. 11) (55).

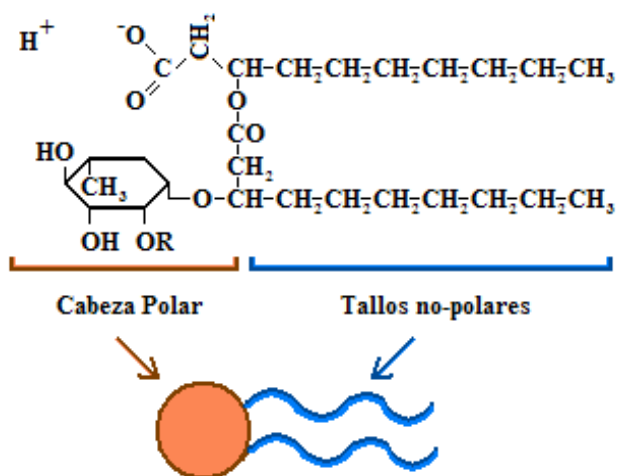


Figura 11. Estructura de los ramnolípidos. Donde R puede ser un H, o una molécula de ramnosa (90).

Ruta biosintética de los ramnolípidos.

La biosíntesis de los ramnolípidos en *P. aeruginosa*, se lleva a cabo mediante tres reacciones secuenciales (FIGURA. 12). Dos de estas reacciones son catalizadas por ramnosil transferasas específicas, la Rt1 ó RhlB (40) que es la responsable de acoplar a la dTDP-L-ramnosa con un dímero de ácidos grasos (HAA) producido por RhlA (la primera enzima de la vía) (41 y 44) para sintetizar mono-rhl y la Rt2 o RhlC que forma los di-rhl (42,43). En ambas reacciones se utiliza como sustrato a la desoxi-timidina-difosfo-L-ramnosa (dTDP-L-ramnosa) proveniente de la glucosa 1-fosfato, mediante la ruta biosintética integrada por las enzimas que se encuentran codificadas en el operón *rmlBDAC*. La dTDP-L-ramnosa es el donador de ramnosa y junto con los HAAs forman los ramnolípidos (39).

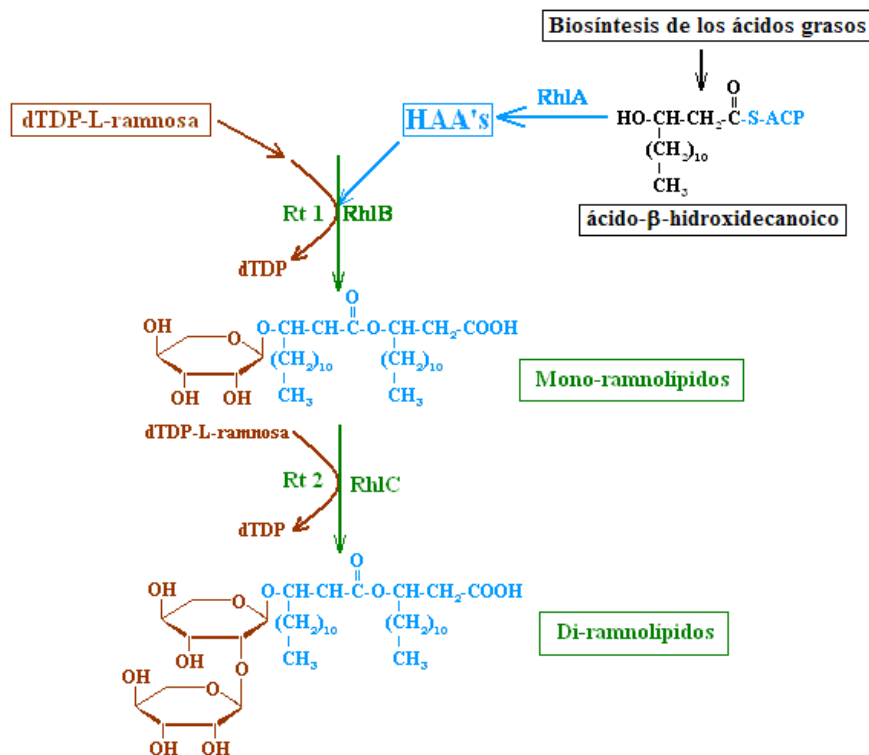


Figura 12. Ruta de biosíntesis para la formación de mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos.

Las proteínas RhlA y RhlB están codificadas en el operón *rhlAB*, que está regulado por RhlR (40), que como ya se describió es una de las proteínas reguladoras que controlan la producción de virulencia asociada a la RSQ, teniendo como autoinductor a la molécula butanoil-homoserina lactona (C4-HSL) (39).

La síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* comparte algunos pasos biosintéticos con otros compuestos como son el lipopolisacárido (LPS) y como se describirá más adelante con los polihidroxicanoatos (PHAs) (11 y 40).

Aplicación biotecnológica de los ramnolípidos.

La producción de los ramnolípidos es atractiva como una alternativa para sustituir los surfactantes sintetizados químicamente debido a su compatibilidad ambiental, en general son considerados por tener algunas ventajas sobre los surfactantes químicos como son los efectos de la baja irritabilidad, anti-irritabilidad y compatibilidad con la piel (131), por su posible producción mediante fermentación, por su gran aplicación industrial y ambiental debido a sus propiedades tensoactivas (54 y 11). Sin embargo, son poco competitivos con los productos químicos establecidos debido a su alto costo de producción (128).

Los ramnolípidos se emplean grandemente en diversas áreas en (54) donde su aplicación promete mejor compatibilidad y buena degradabilidad microbiana (128). Se usan en la producción de químicos finos, para caracterizar superficies y capas superficiales, en la elaboración de productos cosméticos y farmacéuticos (131 y 54), en el tratamiento como aditivos para la remediación ambiental. Ya que los ramnolípidos son efectivos en el control de patógenos de ciertas plantas, se les da un valor importante como agentes de control biológico (56 y 90).

Los ramnolípidos libres y los modificados químicamente han sido empleados en la biorremediación porque reducen la toxicidad de metales (68 y 69) debido a que pueden unirse eficientemente a iones complejos como el plomo, zinc, arsénico y cadmio (73), además se estima que el 37% de los sitios contaminados con orgánicos son también contaminados con metales, por lo que la presencia de estos metales tóxicos puede causar inhibición de la degradación de los compuestos orgánicos (134). El empleo de los ramnolípidos permite aumentar la degradación de hidrocarburo en los sistemas co-contaminados con compuestos orgánicos y metales tóxicos, además se tiene como ventaja que la biodegradación de los ramnolipidos ocurre al cabo de casi 8-12 días (73), lo que permite tener alternativas para sustituir el uso de los surfactantes químicos sintéticos de alto costo cuyo uso puede tener impactos tóxicos en el ambiente (11).

Los biosurfactantes también han sido probados tanto en sitios contaminados por petróleo como por su capacidad para asistir de forma natural al agotamiento de grandes cantidades de este contaminante, teniendo resultados positivos al medir el nivel de descontaminación tanto en los tratamientos preventivos como en los del final del tratamiento (73 y 132).

Los ramnolípidos en particular han sido empleados en grandes cantidades como aditivos en las industrias de cosméticos y de cuidados de la salud para hacer para una gran variedad de importantes productos incluyendo: liposomas y emulsiones (133), repelentes de insectos, antiácidos, cojinetes para el acné, productos anti-caspa, soluciones para lentes de contacto, productos para pintar y cuidar el cabello, desodorantes, productos para las uñas, lápices labiales, sombras para ojos, mascarillas, pasta dental, aclaradores dentales, antitranspirantes, condones lubricados, productos para bebés, productos para el cuidado de los pies, antisépticos, productos para afeitar y depilar y humidificadores (131).

Los ramnolípidos además tienen actividad biológica como agentes de biocontrol debido a su efecto sobre plantas y plagas de éstas, de esta forma, se sabe que tanto mono como di-ramnolípidos purificados, en concentraciones entre el intervalo de 5 hasta 30 mg/l, afectan la motilidad y lisan poblaciones enteras de *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* y *Plasmopara lactucae-radici* (73), en tiempos menores a 1 minuto (90).

5. Polihidroxicanoatos, ruta biosintética y aplicación biotecnológica.

Polihidroxicanoatos.

Los polihidroxicanoatos (PHAs), son moléculas sintetizadas por diversas especies bacterianas gram-positivas y gram-negativas (136 y 137) y debido a sus propiedades físicas y químicas han podido emplearse para elaborar plásticos biodegradables, por lo cual son considerados como posibles sustitutos de los plásticos convencionales (135). Además estos compuestos tienen gran interés en este trabajo, ya que supuestamente tienen un precursor en común con los ramnolípidos, donde probablemente interviene RhIA (39).

El primer PHA descubierto fue el poli (3-D-hidroxi-butirato) (PHB), un homopolímero que fue detectado en el año 1925 en la especie *Bacillus megaterium* (139). Posteriormente, se encontraron inclusiones de PHA en una extensa variedad de especies bacterianas, y hasta la fecha han sido identificados diferentes tipos de PHAs. Se conoce que son moléculas estructuralmente simples constituidas por polímeros carbonados de estructura lineal y se acumulan dentro de la célula como cuerpos de inclusión a niveles tan altos que pueden representar el 90% del peso seco celular (136 y 137). Estos poliésteres están compuestos de monómeros de ácidos grasos 3-hidroxi, en donde el grupo

carboxilo de un monómero forma una unión éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino (FIGURA 13). La masa molecular de los PHAs varía para el tipo de PHA producido, pero generalmente esta en el orden de 50,000 hasta 1,000,000 Da (136).

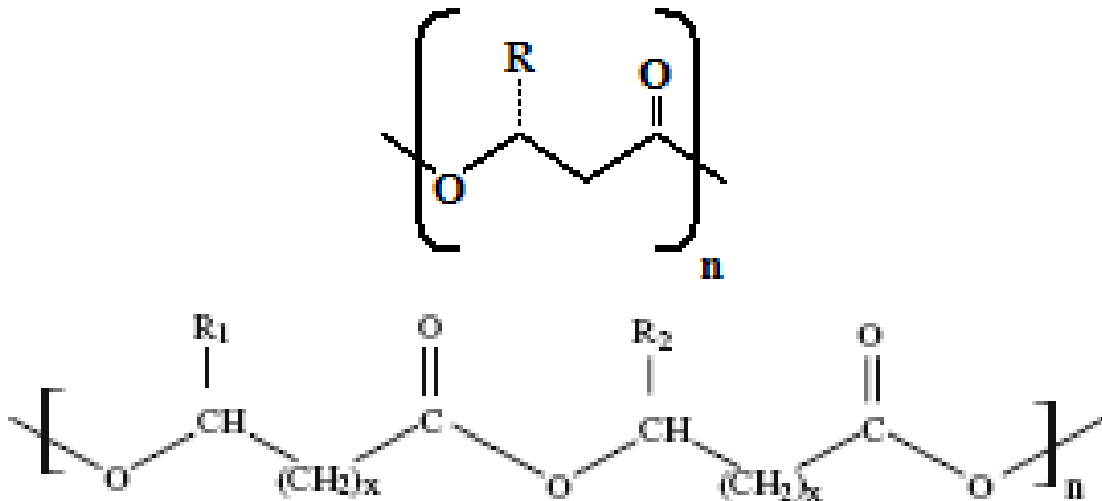


Figura 13. Estructura química del monómero (arriba) y estructura general de los PHAs.
 $R/R_1/R_2 = H$, grupos alquilo C_1-C_{13} , $X = 1-4$ y $n = 100-300,000$ (136 y 160).

La gran mayoría de los seres vivos acumulan diferentes sustancias de reserva cuando existen muchos recursos en su entorno, así los PHAs constituyen para muchos tipos de bacterias un depósito energético de reserva, que pueden incrementar cuando en el ambiente hay exceso de carbono pero existe un desequilibrio en los nutrientes esenciales o escasez en alguno de los nutrientes como nitrógeno, azufre o fosfatos (135 y 138). La síntesis de los PHAs le genera a la bacteria la gran ventaja de poder almacenar un exceso de nutrientes intracelularmente sin afectar su adaptabilidad general (137 y 138), de esta manera, si el carbono se agota, o se suministra el nutriente faltante, los PHAs son entonces utilizados como fuente de carbono y energía en diferentes procesos vitales que permiten que la bacteria sobreviva, como lo sería mediante la esporulación si es su caso, o la eliminación de compuestos tóxicos (135). Además, en la polimerización de intermediarios solubles a moléculas insolubles, la célula no se encuentra sometida a

alteraciones en su estado osmótico, lo que previene que estos valiosos compuestos no se pierdan por salir de la célula. Consecuentemente, los PHAs almacenados permanecerán disponibles con un costo energético relativamente bajo y con seguridad para reusarse (136 y 137).

Ruta biosintética de los polihidroxicanoatos.

La síntesis de PHAs se hace mediante la polimerización de ácidos grasos 3-hidroxi con cadenas de carbono de tamaño variable desde 6 a 14 átomos de carbono. Los ácidos grasos son producto de la síntesis *de novo*, de donde se obtiene el 3-hidroxiacil-ACP. Estos ácidos grasos son el sustrato de PhaG, una transacilasa que recientemente ha sido identificada y caracterizada (47 y 143) y está encargada de catalizar en un solo paso la transferencia del grupo ACP a CoA, y en una segunda reacción es tomado el producto de PhaG por PhaC, que codifica para una PHA sintasa encargada de la polimerización que genera los PHAs (FIGURA. 14) (46, 47).

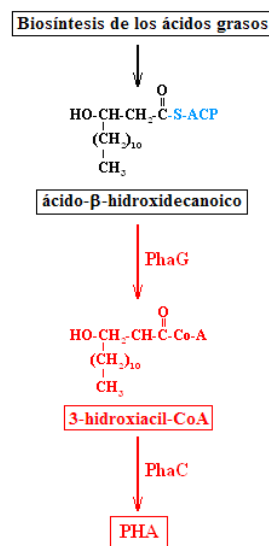


Figura 14. Biosíntesis de los polihidroxicanoatos (PHAs).

Aplicación biotecnológica de los polihidroxicanoatos.

Al extraer los PHAs de la célula bacteriana, se ha encontrado que estas moléculas muestran propiedades similares a las de algunos plásticos convencionales tales como el polipropileno, debido a que estos compuestos tienen una masa molecular lo suficientemente alta para tener características de polímero (TABLA 4) (136 y 140).

Tabla 4. Propiedades de los PHAs y del polipropileno (140).

Parámetros	Compuesto				
	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HH)	PP
T _m (°C) ^b	177	145	150	61	176
T _g (°C) ^c	2	21	27	236	210
Cristalinidad (%)	70	56	45	30	60
Extensión de rompimiento (%)	5	50	444	300	400

^a P(HB) = poli(3-hidroxiobutirato), P(3HB-3HV) = poli(3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato) conteniendo 20% de 3HV, P(3HB-4HB) = (3-hidroxiobutirato-4-hidroxiobutirato) conteniendo 16% de 4HB, P(3HO-HH) = poli(3-hidroxi octanoato-co-hidroxi hexanoato) conteniendo 11% de 3HH, y PP = polipropileno.

^b T_m = Temperatura de fundición (melting temperature) ^c T_g = Temperatura de cristalización (glass transition temperature).

El origen bacteriano de los PHAs hace de estos polímeros un material natural, además poseen otras características típicas interesantes (Tabla 5) como su biodegradabilidad, debido a que muchos microorganismos tienen desarrollada la habilidad para degradar estas macromoléculas mediante la acción de PHA depolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares hasta CO₂ y agua (138). Así pues, los PHAs son reciclables, siendo su degradación de pocos meses o años bajo condiciones anaeróbicas (142 y 136) (FIGURA. 15), a diferencia de los termoplásticos petroquímicos (136), que permanecen en la superficie terrestre prácticamente inalterables por miles de años (138). Sin embargo, las actividades de las enzimas que polimerizan los PHAs (PHA polimerasas) pueden variar dependiendo de la composición del polímero, de su forma física (amorfa o cristalina), de

las dimensiones de la muestra, e importantemente de las condiciones ambientales. Otra característica muy importante es el hecho de que los PHAs pueden ser producidos a partir de recursos renovables derivados de la agricultura que se utilizan como fuente de carbono y permiten reducir su costo de producción, y en la fabricación de plásticos que derivan de hidrocarburos, utilizan las reservas petroquímicas del planeta (138).

Tabla 5. Ventajas que tienen los plásticos a partir de PHAs en comparación con los plásticos petroquímicos (135).

PLÁSTICOS CONVENCIONALES	PLÁSTICOS BIODEGRADABLES
Utilizan como materia prima recursos no renovables.	Su producción es sostenible a partir de residuos de la agroindustria.
Se acumulan en el ambiente.	Se degradan fácilmente por la acción de microorganismos.
Su reciclado puede generar sustancias tóxicas.	Su biodegradación produce O ₂ y H ₂ O.



Figura 15. Degradación de botes hechos con PHAs mediante composta (D. Seebach, ETH).

La mayoría de las aplicaciones de los PHAs son las de reemplazar a los polímeros petroquímicos corrientemente en uso en empaquetados y en revestimientos, además, los PHAs prometen ser una nueva fuente de pequeñas moléculas ya que pueden ser hidrolizados químicamente, obteniéndose monómeros que pueden ser convertidos a moléculas comercialmente atractivas como son los β -hidroxiácidos, 2-ácidos alcanoicos, β -hidroxialcanoles, β -acilactonas, β -aminoácidos y ésteres β -hidroxiácidos, siendo este último una clase que está recibiendo atención por sus aplicaciones potenciales en la producción de solventes biodegradables (136).

6. La síntesis de ramnolípidos comparte pasos biosintéticos con la síntesis de otros compuestos.

Como ya se mencionó, la ruta de biosíntesis para producir los rhls utiliza dos precursores:

1. Los 3-hidroxiacil-ACP que provienen de la síntesis de *novo* de los ácidos grasos cuando se utiliza azúcar como fuente de carbono y son empleados por RhIA para la síntesis de los HAAs (44).
2. La dTDP-L- ramnosa, de la cual RhIB transfiere la ramnosa para unirla a los HAAs y formar los mono-ramnolípidos (42, 43 y 52).

Sin embargo, se sabe que el 3-hidroxiacil-ACP es también un sustrato utilizado en la síntesis de PHAs por la transacilasa PhaG para convertirlo en el tioéster correspondiente (R)-3-hidroxi-decanoil-CoA, por lo que se ha postulado en esta tesis que existe una competencia entre los flujos de dicho sustrato por ambas vías, ya que sus productos están compuestos de ácidos 3-hidroxi-decanoicos conectados por enlaces de tipo éster (FIGURA. 16) (92).

Por otro lado, se sabe que la membrana externa de las bacterias gram-negativas se encuentra formada principalmente por el lipopolisacárido (LPS), que es un factor de virulencia en *P. aeruginosa* (7), permitiendo la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y presentando muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos (24). El lipopolisacárido de *P. aeruginosa* a diferencia de otras bacterias presenta dos componentes distintos: la banda A y la banda B. La banda B tiene una estructura variable y determina el serotipo de las cepas de *Pseudomonas*, además es empleado para

identificar y clasificar los distintos aislamientos de esta bacteria, mientras que la banda A es un polímero de D-ramnosa (7). Un número importante de cepas de *P.aeruginosa* incluyendo a PAO1, contienen L-ramnosa entre la banda B del LPS (FIGURA. 16).

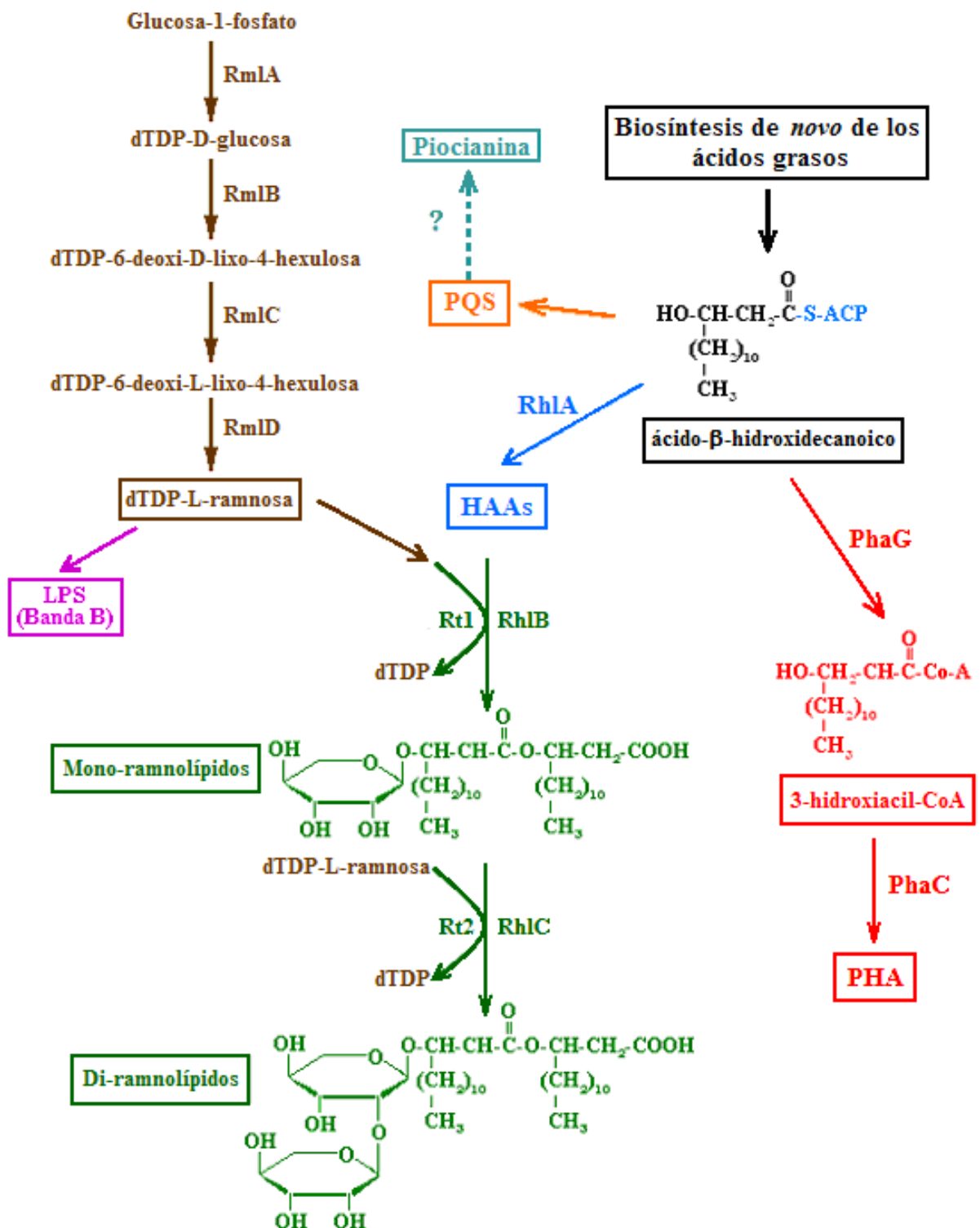


Figura 16. Esquema de las síntesis de ramnolipidos y PHAs en *P. aeruginosa*.

3. Piocianina, su biosíntesis y aplicación biotecnológica.

Piocianina.

La síntesis bacteriana de pigmentos es una característica determinada genéticamente que les confiere color a las bacterias, yendo desde el tono amarillo al rojo (152). Las especies más abundantes y productoras de pigmentos fenacinas se encuentran entre linajes gram-positivo con alto contenido de G+C, aunque también se producen mediante clases de proteobacterias gram-negativas correspondiendo a las especies fluorescentes de *Pseudomonas* que típicamente pueden sintetizar dos o un gran número de estos pigmentos extracelulares (144), siendo la pioverdina el mejor pigmento fluorescente amarillo-verdoso conocido y característico de estas bacterias (150).

Las fenacinas comprenden a una gran familia de compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno y son sintetizados casi exclusivamente por bacterias del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Sorangium*, *Brevibacterium* y *Burkholderia*. Se conocen casi 50 de estos compuestos fenacínicos con la misma base estructural, difiriendo sólo en la derivatización de la base heterocíclica. Dichas modificaciones determinan fuertemente las propiedades físicas de las fenacinas e influyen su actividad biológica sobre patógenos de plantas y animales (105 y 144).

Las *Pseudomonas* son las especies productoras mejor estudiadas de dichas fenacinas, así se sabe que *P. aeruginosa* fue la primera en ser reportada en la literatura por producir en mayor proporción a esta clase de fenacinas, *Pseudomonas fluorescens* únicamente produce ácido-1-fenacínico (PCA, phenazine-1-carboxylic acid), y *Pseudomonas chlororaphis* que es conocida porque puede producir estos compuestos (144). Probablemente, el primer pigmento fenacínico asociado y descrito en *P. aeruginosa*, es

el 5-N-metil-1-hidroxifenacina, mejor conocido como piocianina (PYO, pyocyanine) (Figura 17) (145), que estructuralmente contiene un fenol y también es producido por *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens* (149). Este pigmento es difusible al medio de cultivo, por lo que brinda una coloración verde-azul muy característica (144), además de servir a la bacteria como un factor de virulencia, ya que puede penetrar fácilmente por las membranas celulares (151).

La producción de PYO está asociada al 90% y 95% de las cepas aisladas de *Pseudomonas*, pudiendo ser recuperadas rápidamente y en grandes cantidades del esputo de pacientes con fibrosis quística y de secreciones crónicas del oído en otitis media infectados por *P. aeruginosa* (151), sin embargo, ciertas cepas casi no la sintetizan (144).

P. aeruginosa también puede producir otras fenacinas que derivan de sustituciones simples en las posiciones del carboxi- e hidroxilo, dándoles propiedades físicas y consecuentemente actividad antibiótica que puede diferir de acuerdo a la naturaleza y posición de los sustituyentes sobre el anillo heterocíclico (144). Algunas de estas fenacinas incluyen a la 1-hidroxifenacina, al ácido-1-fenacínico (PCA = phenazine-1-carboxylic acid), fenacina-1-carboxilamida (PCN = phenazine-1-carboxamide) (Figura 17), aeruginosin A (5-metil-7-amino-1-carboximetilfenazinum betaína) y aeruginosin B (5-metil-7-amino-1-carboxi-3-sulfofenazinum betaína) (144, 145 y 146) y pioverdina, que es un péptido que contiene un derivado de hidroxiquinolona característico de los sideróforos producidos por las *Pseudomonas fluorescentes* (149).

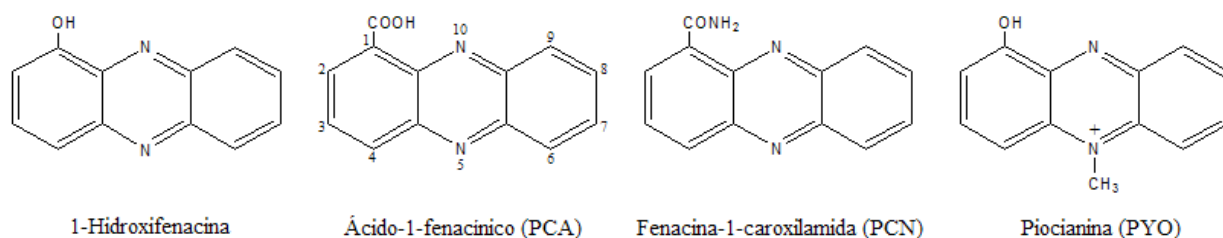


Figura 17. Fenacinas producidas por *Pseudomonas* (144, 145 y 146).

En la actualidad se han descrito muchas diferentes estructuras de todas estas fenacinas (150), y se sabe que estas moléculas cuentan con un amplio rango de actividad biológica debido a su habilidad para soportar el ciclo redox en la presencia de varios agentes reductores y oxígeno molecular, el cual lleva a la acumulación de súper-óxido (O_2^-) que causa diversos tipos de lesiones o muerte celular (148).

Biosíntesis de piocianina.

La síntesis de fenacinas es una característica que sólo presentan las bacterias (144). En *P. aeruginosa* dicha síntesis deriva de la vía de biosíntesis de los amino ácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina, triptófano y otros elementos derivados) (Figura 18) (156).

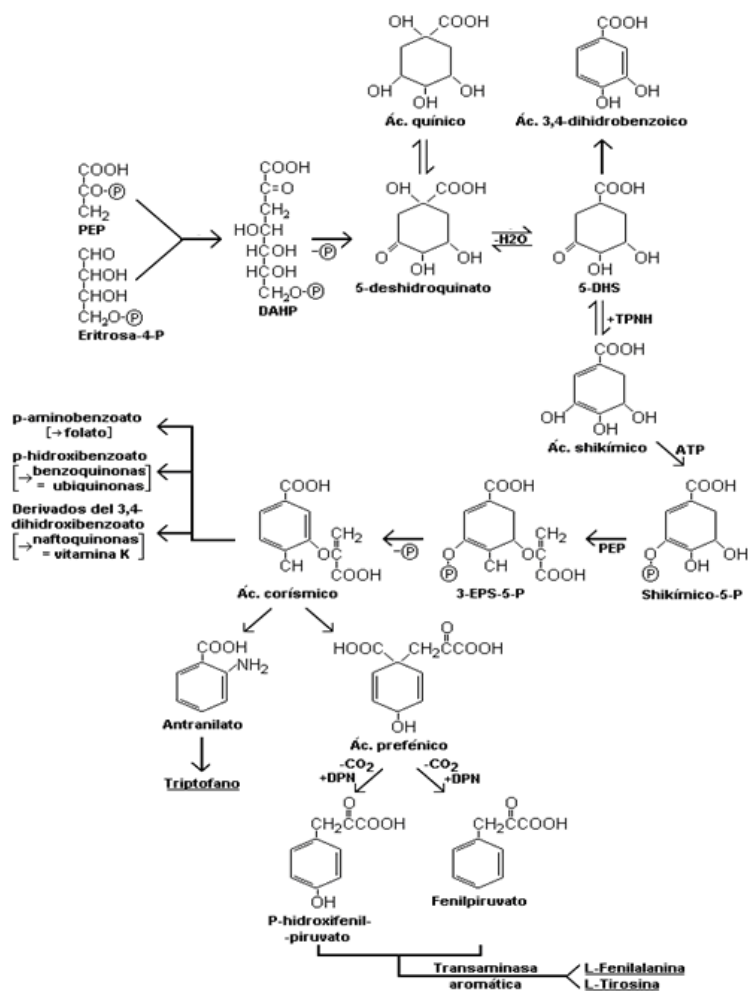


Figura 18. Ruta de biosíntesis de los compuestos aromáticos en *E. coli* (156).

Como ya se mencionó, *P. aeruginosa*, puede producir *pioverdina* y *piocianina*, como producto secundario de la ruta de la biosíntesis aromática del shikimato, siendo el corismato (del griego, horca) el compuesto de bifurcación de la biosíntesis de las *fenacinas*, ya que mediante la condensación simétrica de dos moléculas de corismato se forma el núcleo fenacínico (Figura 19) (144 y 157).

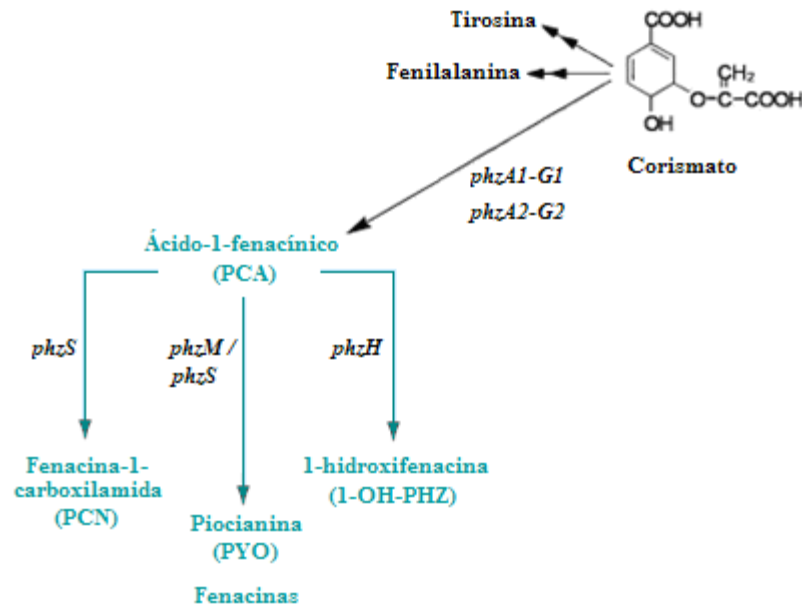


Figura 19. Biosíntesis de fenacinas en *P. aeruginosa* (157).

Aplicación biotecnológica de la piocianina.

Como en algunos otros compuestos producidos por *P. aeruginosa*, también se ha investigado que las fenacinas tienen potencial biotecnológico, ya que estos compuestos poseen actividad antibiótica de amplio espectro hacia bacterias, hongos, y tejidos de plantas y animales, por lo que también se les ha denominado bactericidas (144). Así, se sabe que la piocianina producida por *P. aeruginosa* puede decrecer la diversidad microbiana, resultando en la reducción de la degradación de hidrocarburos aromáticos (147).

Las fenacinas también se han empleado en algunos tratamientos para mejorar la salud, debido a que son muy activas contra microorganismos patógenos o parásitos, de tal forma que podían proteger y prevenir el desarrollo del ántrax en conejos (previamente inyectados con *B. anthracis*), controlar que los animales enfermaran por el carbunco, los virus de vaccinia, rabia y peste, destruir también a microorganismos tales como: *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium staphylococci*, *Corynebacterium streptococci*, *Corynebacterium pneumococci*, *Corynebacterium gonococci*, *V. cholerae*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Klebsiella sp.* y *Shigella paradysenteriae* (16). Sin embargo se sabe que se dejaron de utilizar por la mala comercialización, pero también se señala que el principal obstáculo para el uso eficiente y exitoso del bactericida fue: **a)** la resistencia bacteriana de algunos coliformes y enterobacterias, por la inadecuada o difícil difusión de las fenacinas en el medio al que se aplicaba y que contenía los microorganismos contaminantes, y **b)** por no conocer si el grado de toxicidad hacia el hombre era baja o nula, **c)** mal rendimiento en su extracción. Aún con todo lo anterior, el empleo de las fenacinas en el tratamiento de la contaminación ambiental para desinfectar aguas de tipo residual es un aspecto muy importante y actual, ya que han demostrado, que la adición de extractos estériles y no estériles de fenacinas (sin pérdida de actividad ante el proceso de esterilidad), ha impedido el desarrollo de patógenos no resistentes al bactericida, permitiendo que muchas aguas tratadas bajo este proceso puedan utilizarse como aguas de riego para el campo u hortalizas (17).



ANTECEDENTES

1. RhlA y PhaG tienen 44% de identidad (46).

En 1998 se investigó la relación metabólica entre las síntesis de *novo* de los ácidos grasos y la de los ácidos polihidroxicanoicos (PHAs) producidos en *P. putida* KT2440. En dicho estudio se describe el aislamiento y caracterización de mutantes *phaG* que son deficientes en la síntesis de PHAs, cuando la bacteria es cultivada en glucosa como fuente de carbono, así también se identifica el *locus* que fenotípicamente complementa las mutantes. Purifican el producto de *phaG* (PhaG) y lo emplean para demostrar su actividad enzimática, indicando que esta proteína tiene actividad de transferasa acarreadora del grupo acilo por transferir el grupo acilo de la molécula (R)-3-hidroxiacil-ACP, que es un intermediario de la ruta de biosíntesis de *novo* de los ácidos grasos, a la coenzima A. para formar el (R)-3-hidroxiacil-CoA. El acil CoA, a su vez es sustrato de la PHA sintasa, la enzima que realiza la polimerización para formar los PHAs (Figura 20) (46 y 47). Los intermediarios (R)-3-hidroxiacil-ACP provistos por la biosíntesis de *novo* de los ácidos grasos son supuestamente los compuestos intermediarios en común en las biosíntesis de PHAs y de ramnolípidos. Así pues, en esta investigación se muestra que PhaG es esencial para la síntesis de PHA sólo cuando *P. putida* KT2440 se crece con gluconato u otros azúcares (las cuales no son catabolizadas a acil-CoA), además demuestran que las mutantes *phaG* de esta bacteria, no se complementan con el gen *phaC* (que codifica para la PHA sintasa) ni con regiones genómicas adyacentes, lo que también indica que las PHA sintasas no pueden utilizar como sustrato a los (R)-3-hidroxiacil-ACP (presentes cuando se usa gluconato como fuente de carbono) (46).

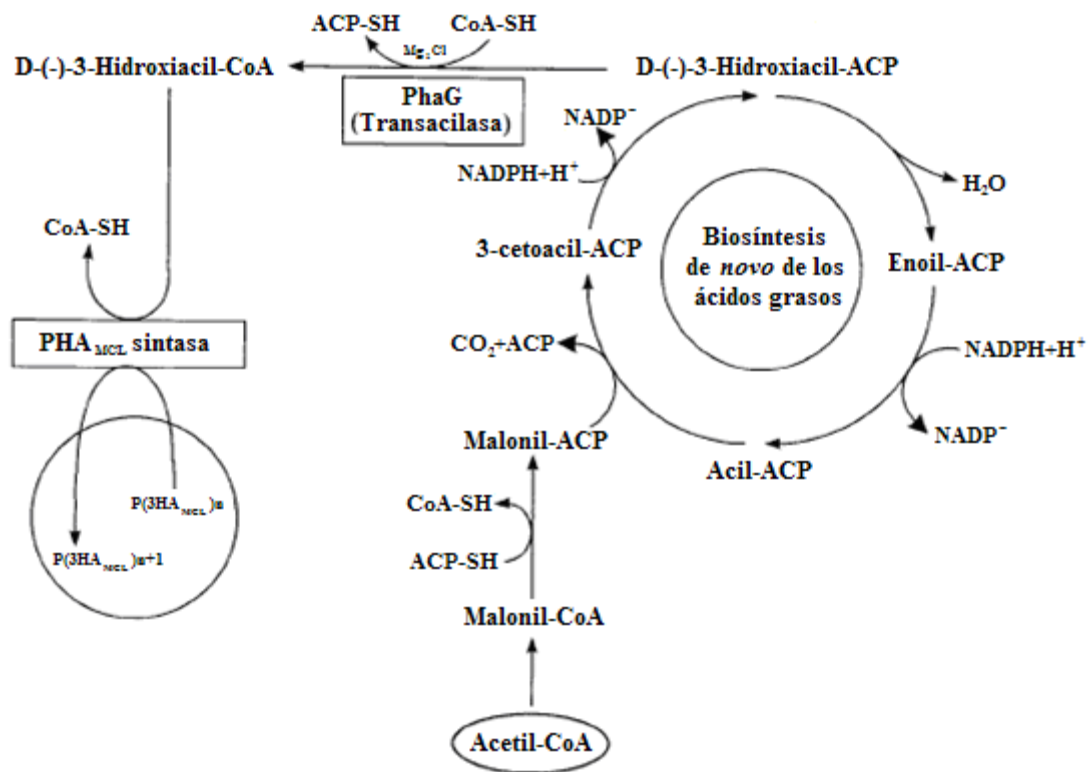


Figura 20. Ruta metabólica para la síntesis de PHAs, involucrando a la síntesis de novo de los ácidos grasos desde Acetil-CoA (46).

La caracterización de *phaG* mostró que codifica para una proteína de 295 aminoácidos con una masa molecular de 33.876 KDa, y los alineamientos de la secuencia de aminoácidos deducida para este gen, revelan que exhibe alrededor de un 44% de identidad con el producto del gen *rhlA* de *P. aeruginosa* PG201 (Figura 21), el cual está involucrado en la biosíntesis de ramnolípidos (46).

El producto del gen *rhlA* (RhlA) también consiste de 295 aminoácidos y tiene una masa molecular de 32.5 KDa, y al ser alineada su secuencia de aminoácidos exhibe 41-48 % de identidad y 60-65 % de similaridad con PhaG (dependiendo de la especie de *Pseudomonas* a la que pertenezca el gen *phaG*), que como se ya se dijo es una 3-hidroxiacil-ACP:CoA transferasa identificada en varios miembros del género *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*, *P. syringae* y *Pseudomonas* sp. 61-3 (46).

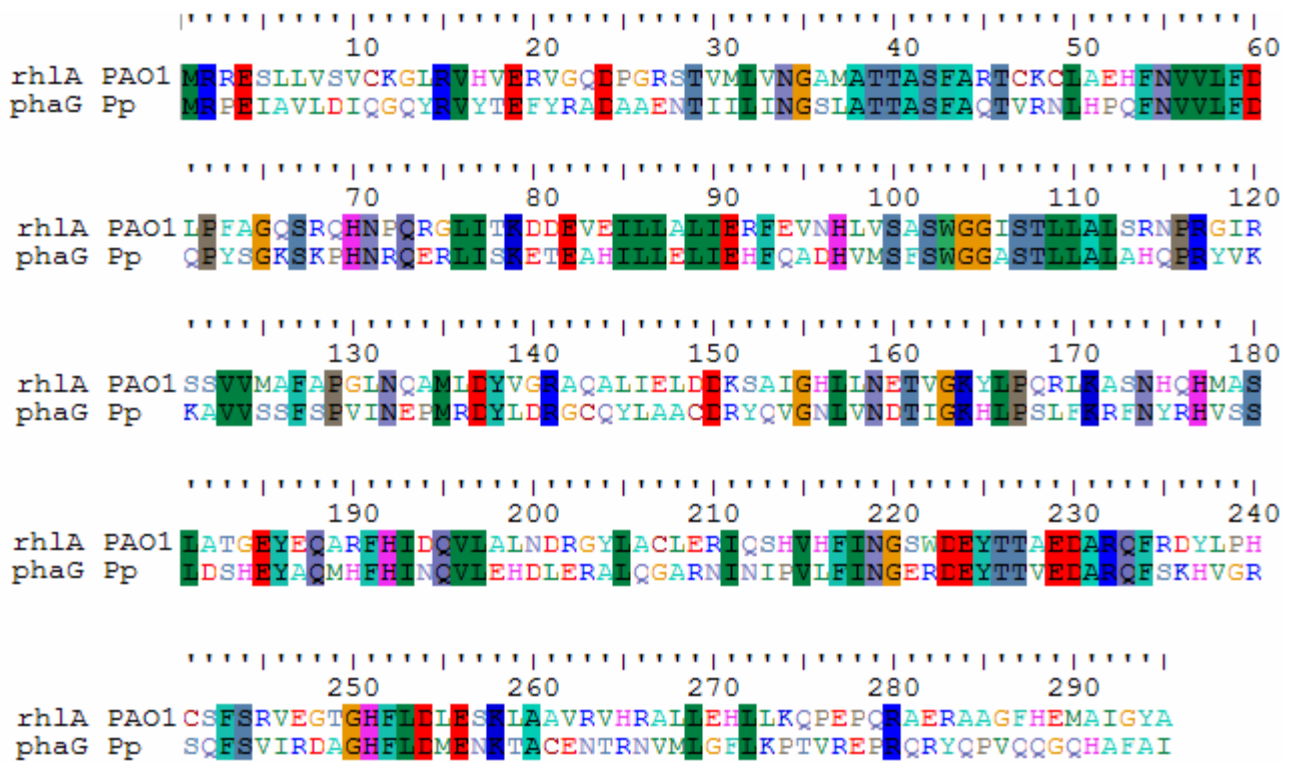


Figura 21. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas PhaG y RhlA.

Al expresar al gen *phaG* de *P. putida* en diferentes fondos genéticos se observan diferencias en la producción de PHAs. Así en *P. aeruginosa* PAO1 se obtiene un aumento de alrededor del 40% y en *P. oleovorans* una acumulación de alrededor del 55 % (teniendo como fuente de carbono al gluconato). En *E. coli* la expresión de *phaG* junto con la PHA sintasa (*phaC*), permitió la acumulación de PHAs cuando crecieron en glucosa, pero sólo cuando la cepa presentaba alguna mutación que afectaba las enzimas de la síntesis de ácidos grasos que supuestamente causaban la acumulación de intermediarios (46).

La alta homología estructural entre PhaG y RhlA sugiere que se trata de enzimas con funciones muy similares, sin embargo hay datos que muestran que presentan actividades distintas. Un dato sobresaliente, en este sentido es el de la mutante *rhlA* de *P. aeruginosa* con el plásmido pBHR81 que expresa el gen *phaG* (bajo el control del promotor *lac*), ya

que no pudieron complementar la síntesis de ramnolípidos, indicando que PhaG no reemplaza funcionalmente a RhlA, asimismo, se mostró que la mutante *phaG* de *P. putida* no puede ser complementada por el gen *rhlA* de *P. aeruginosa* para la producción de PHA (46).

2. RhlA sintetiza el dímero de HAAs, un nuevo biosurfactante (44).

Se sabe que RhlA está involucrada en la producción de ramnolípidos, pero su papel preciso no se había determinado hasta hace poco tiempo. Se propuso que esta proteína pudiera estar involucrada en la síntesis o transporte del precursor que sirve de sustrato a la ramnosiltransferasa (40) o en la estabilización de la proteína RhlB (52). En cuanto a la regulación de su expresión, se conoce que la expresión del operón *rhlAB* está regulado por la señalización célula-célula (52, 53, 100 y 101) y se sabe que los factores ambientales, especialmente las condiciones nutrimentales, influyen la síntesis de ramnolípidos (58).

Estudios recientes demuestran que la motilidad de tipo “swarming” (que es una translocación rápida y coordinada de una población bacteriana para cruzar superficies sólidas o semisólidas debido a la utilización de flagelos y pilis, además, se requiere la producción de un biosurfactante para que se lleve a cabo este tipo de nado) que presenta *P. aeruginosa* está estrechamente ligada a la expresión del gen *rhlA*, ya que en una mutante *rhlA* se pierde la habilidad de hacer dicho nado y por ello se ha formulado que la producción de ramnolípidos es requerida para esta forma de motilidad en *P. aeruginosa* (102). Sin embargo, se ha demostrado que no se requiere la producción de los ramnolípidos para realizar “swarming”, pues una mutante en *rhlB* que no produce ramnolípidos presenta este tipo de movilidad, pero sí requiere los HAAs (dímeros de ácidos grasos con propiedades surfactantes), por lo que se les da el papel de actuar como agentes húmedos. La mutante *rhlA* que no tiene movilidad tipo “swarming” no produce HAAs. Asimismo, se ha detectado

la producción de HAAs extracelulares por *P. aeruginosa* (103), y se ha demostrado que esos compuestos no fueron productos de degradación de los ramnolípidos, pero sí los propios intermediarios de la biosíntesis de ramnolípidos (42).

Esos resultados indican que RhlA está involucrada en la síntesis de HAAs, así como que estos dímeros son los precursores lipídicos de los ramnolípidos y sustrato de la ramnosiltransferasa RhlB. Así, los dímeros de ácidos 3-hidroxiacanoicos son directamente excretados de la célula o acoplados a la ramnosa por la ramnosiltransferasa codificada por *rhlB* para producir ramnolípidos (102, 103).

Con base en la homología anteriormente planteada entre RhlA y PhaG, se propone la posibilidad de que RhlA podría potencialmente ser una aciltransferasa que cataliza la transferencia del ACP del tioéster a CoA de la molécula 3-hidroxiacil, y los HAAs podrían entonces resultar de la condensación de dos de estos residuos 3-hidroxiacil-CoA, que importantemente une a las rutas de biosíntesis de ramnolípidos y poli-3-hidroxiacanoato al estar compitiendo por un intermediario en común (Figura 22) (104).

3. Síntesis de mono-ramnolípidos en *E. coli* recombinante (45).

Con el fin de investigar la vía de biosíntesis de ramnolípidos y HAAs de *P. aeruginosa*, se expresó el operón *rhlAB* en *E. coli*, obteniéndose una limitada cantidad de mono-ramnolípidos (52), (produciendo entre 10 y 25% de mono-ramnolípidos si se compara con los producidos por *P. aeruginosa* (Tabla 6)), y para determinar si la disponibilidad de los sustratos de la ramnosiltransferasa era limitante en *E. coli*, se coexpresó el operón *rmlBDAC* que sintetiza las enzimas que sintetizan dTDP-L-ramnosa. Se encontró que al introducir también el operón *rmlDBAC* que codifica para la dTDP-L-ramnosa (sustrato de RhlB), la producción de los mono-ramnolípidos se incrementaba, lo que permite deducir

que la concentración disponible de la dTDP-L-ramnosa es limitante para la síntesis de ramnolípidos. Así mismo, se observó que al aumentar uno de los sustratos de RhlB (dTDP-L-ramnosa), se incrementaba la formación del producto de RhlA (HAAs), sugiriéndose que la síntesis de HAAs por RhlA está acoplada con la producción de mono-ramnolípidos por RhlB (45).

Por otra parte, al identificar y caracterizar el tipo de dímeros de ácidos grasos que forman los mono-ramnolípidos producidos en *E. coli* (Tabla 6), se reveló que la estructura química de estos compuestos tenía como más abundante el de tamaño C₁₀C₁₀, es decir el mismo tamaño de cadena que los sintetizados por *P. aeruginosa* creciendo en el mismo medio de cultivo, indicando que la especificidad del tamaño de cadena está dado por los productos de *rhlAB* y no por el fondo genético de la bacteria donde se expresan estos genes. Así pues, estos datos sugieren que la especificidad de RhlA por ciertos ácidos grasos determina el tipo de HAAs y por tanto del ramnolípidos que se produce y que éstos no dependen de las características generales de la bacteria en la que se expresa (45).

También se observó que en *E. coli*, RhlA del complejo enzimático RhlA/RhlB puede usar como precursores tanto hidroxiacidos grasos-ACP como los unidos a CoA y producir los HAAs y ramnolípidos. Esto sucede cuando se crece *E. coli* recombinante en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono forma 23.8 µg/ml de mono-ramnolípidos y 45.22 µg/ml de ramnolípidos totales, pero también puede usar los hidroxiacidos grasos-CoA cuando se utiliza un medio mínimo con únicamente ácido oleico como fuente de carbono, obteniéndose una producción muy pobre de mono-ramnolípidos, porque hay un pobre crecimiento de la bacteria. Sin embargo, al utilizarse un medio mínimo con glucosa suplementado con ácido oleico, la concentración de los mono-ramnolípidos aumenta hasta 52 µg/ml (45).

Tabla 6. Producción de ramnolípidos por *E.coli* y *P. aeruginosa*.

Bacterias (creciendo en glucosa)	Producción de ramnolípidos (µg/ml)
<i>E. coli</i>	120 mono-rha
PAO1 <i>wt.</i>	227 mezcla de mono-rha y di-rha
PAO1 <i>rhlC</i>	180 mono-rha (20% menos ramnolípidos que PAO1)

4. RhlA participa en la síntesis de polihidroxicanoato (PHA) y ramnolípidos (rhls) (92).

Se ha reportado que el papel de la proteína RhlA no sólo tiene importancia en la síntesis de los surfactantes ramnolípidos, sino también en la producción de los polihidroxicanoatos (PHAs) (92).

Como se explicó anteriormente, *E. coli* puede expresar los operones *rhlAB* y *rmlBDAC* para producir mono-ramnolípidos cuando crece en glucosa o ácido oleico como fuentes de carbono, lo que sugirió que *rhlAB* puede usar tanto ácidos grasos β -hidroxidecanoicos unidos a ACP como a CoA (45). Por otra parte, se sabe (como se mencionó antes) que para la síntesis de los PHAs, cuando la bacteria crece con un azúcar como fuente de carbono, se requiere la transacilasa PhaG que utiliza los ácidos grasos unidos a ACP y da su producto a la PHA sintasa (PhaC) que únicamente pueden utilizar como sustrato a los ácidos grasos unidos a CoA (46, 97 y 98). En *P. aeruginosa* principalmente se producen los PHAs de cadena media, específicamente los β -hidroxidecanoatos (92).

En base a la información anteriormente descrita, se investigó la relación metabólica existente entre las vías de síntesis de ramnolípidos y polihidroxicanoatos producidos en *P. aeruginosa*, ya que la actividad enzimática de RhlA y RhlB se esperaba que compitiera con las enzimas involucradas en la producción de PHAs por el consumo de los ácidos grasos como precursores (Figura 22) (53). Se encontró que la expresión del plásmido pUO58 (52) que

codifica para el operón *rhlAB* en la cepa silvestre de *P. aeruginosa*, produce grandes cantidades de ramnolípidos (53) y una cantidad reducida de PHAs, supuestamente debido a que los precursores de los PHAs se desvían hacia la síntesis de ramnolípidos (Figura 23) (92).

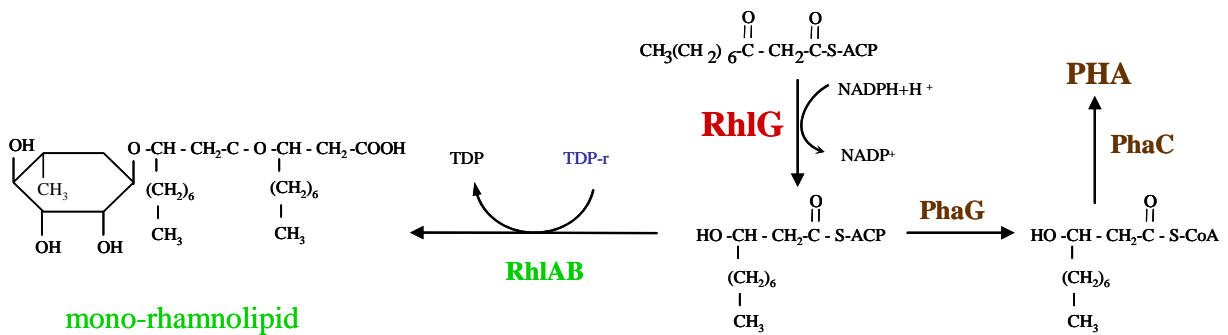


Figura 22. Las vías de síntesis de ramnolípidos y de PHAs pueden competir por precursores en común (92).

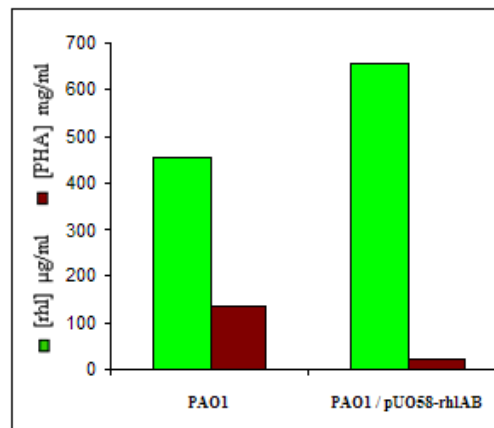


Figura 23. Sobre expresión del operón *rhlAB* (92).

Estos resultados sugieren una competencia entre las síntesis de ramnolípidos y PHAs por un sustrato en común, y esta conclusión se ve reforzada por la determinación de la cantidad de PHAs producidos por una mutante *rhlA* de *P. aeruginosa* (40) respecto a la cepa silvestre PAO1, ya que se obtiene un incremento en la producción de PHAs en esta mutante que no tiene producción de ramnolípidos. Estos resultados sugieren que en la ausencia de la síntesis de ramnolípidos, los ácidos grasos precursores están más disponibles para la síntesis de PHAs (Figuras 23 y 24) (92).

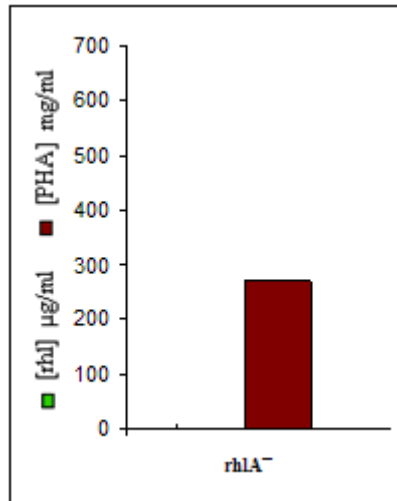


Figura 24. PHAs producidos por la mutante *rhlA* de PAO1 (92).

Al complementar en trans a esta mutante *rhlA* de *P. aeruginosa* con el plásmido pUO58 se observó un fuerte aumento en la producción de PHAs, mientras la producción de ramnolípidos se complementó solo de forma parcial (Figura 25) (92).

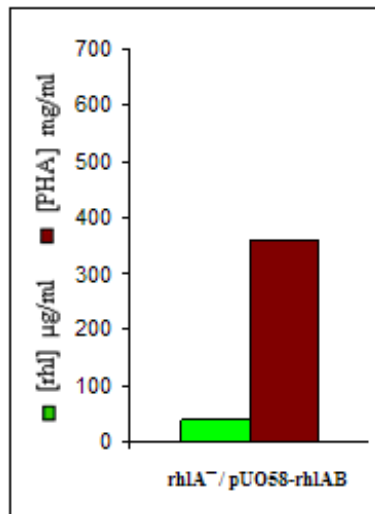


Figura 25. Sobre expresión del operón *rhlAB* en una mutante *rhlA* de PAO1 (92).

Estos datos sugieren que además de estar involucrada en la síntesis de mono-ramnolípidos (catalizando la formación de los dímeros de ácidos grasos (88 y 99)), RhIA está también involucrada en la síntesis de un precursor común para la síntesis de PHAs, siendo

supuestamente los mismos dímeros de ácidos grasos. Esto se puede inferir, ya que cuando esta proteína se sobre expresa en el fondo de la mutante *rhIA*, los intermediarios de ácidos grasos son preferencialmente usados para producir PHAs, sin embargo, como se describió anteriormente (46), no es indispensable la actividad de RhIA para la síntesis de PHAs (Figura 26) (92).

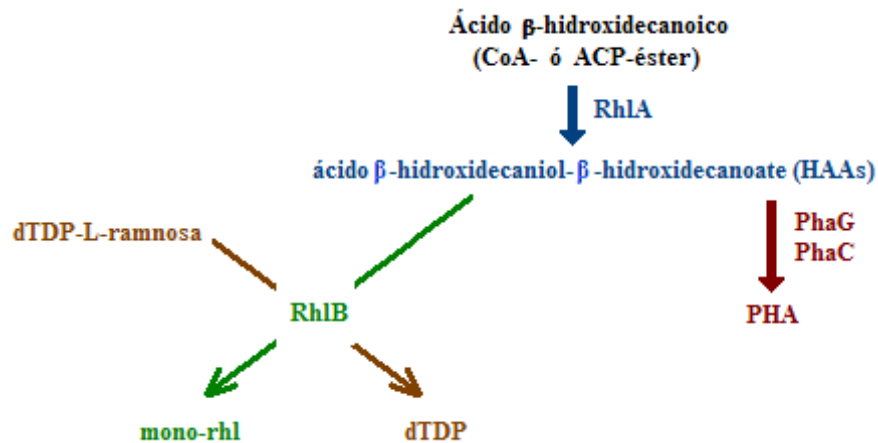


Figura 26. Representación esquemática del papel propuesto para RhIA en la síntesis de rhlA y PHAs además de la síntesis del surfactante β-hidroxidecanol-β-hidroxidecanoato (HAAs) (44).

En esta investigación se propuso que dependiendo de los niveles de la actividad de RhIA, se va a direccionar el flujo de las reacciones hacia los tres productos de *P. aeruginosa* (HAAs, rhlA, y PHAs), ya que RhIA tiene la actividad catalítica para formar dímeros de ácidos grasos β-hidroxi unidos a ACP o a CoA, pudiendo éstos ser usados como sustrato por RhIB para producir mono-rhlA o por enzimas involucradas en la síntesis de PHAs (PhaG o PhaC) para producir PHAs (Figura 26) (92).

Los resultados presentados en esta sección de antecedentes muestran la compleja relación entre las rutas biosintéticas de ramnolípidos y de PHAs, así como el papel central de la enzima RhIA en esta relación metabólica, lo que por tanto, resulta de primordial interés en los objetivos de investigación de este trabajo de tesis.



HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

La enzima RhlA es capaz de sintetizar HAA-acetil-coenzima (HAA-acetil-CoA) para darlo como sustrato a RhlB (en la síntesis de mono-ramnolípidos) ó a PhaC (en la síntesis de PHA).

OBJETIVO GENERAL

1. Determinar si RhlA puede sintetizar HAA-CoA para proveer de sustrato a PhaC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1 Determinar el efecto que tiene la expresión de RhlA en las síntesis de ramnolípidos y de polihidroxicanoatos.
- 1.2 Determinar el efecto de la inhibición de la síntesis de ramnolípidos sobre la síntesis de polihidroxicanoatos.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Descripción de las condiciones de cultivo y las técnicas microbiológicas empleadas.

Para el desarrollo de esta investigación se emplearon las bacterias *P. putida* KT2440 con su mutante *phaG*, así como *P. aeruginosa* PAO1, con sus mutantes *rhlA* y *rhlB*, mostrándose las características más relevantes de los microorganismos y los plásmidos utilizados en las (Tablas 7 y 8), así como su referencia. Estas bacterias se transformaron con el plásmido pAPR1 (descrito en detalle en el siguiente punto de esta sección).

TABLA 7, Características de las bacterias usadas en este trabajo.

BACTERIA	CARACTERÍSTICAS MÁS RELEVANTES	FUENTE DE REFERENCIA
KT2440	<i>Pseudomonas putida</i> tipo silvestre	Worsey et al., 1975
KT2440- <i>phaG</i> ⁻	<i>Pseudomonas putida</i> mutante <i>phaG</i>	Rehm et al., 1998
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> tipo silvestre	Hancock, Carey, 1979
PAO1- <i>rhlA</i> ⁻	PAO1 <i>rhlA</i> mutante por inserción de un cassette de Gm, es polar sobre <i>rhlB</i>	Rahim et al., 2001
PAO1- <i>rhlB</i> ⁻	PAO1 <i>rhlB</i> (PA3478 12271) mutante por inserción de un transposon, Tc ^r	Collection (University of Washington)

Tc = Tetraciclina Gm = Gentamicina

TABLA 8, Características de los plásmidos usados en este trabajo.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS MÁS RELEVANTES	FUENTE DE REFERENCIA
pUCP18	Vector de expresión con orígenes de replicación <i>colE1</i> y RO1600. Ap ^r .	Worsey et al., 1975
pAPR1	pUCP18 que codifica RhlA-His ₁₀ bajo el promotor <i>lac</i> .	Donado por F. Lépine
pUCP20	Variante del pUCP18,	Esta investigación

Ap = Ampicilina

Tanto *P. putida* como *P. aeruginosa*, crecieron en medio PPGAS (VER SU COMPOSICIÓN EN LA TABLA 4 DEL APÉNDICE A) que es óptimo para la producción de los biosurfactantes ramnolípidos, y las temperaturas de crecimiento fueron de 30 y 37°C respectivamente. En algunos casos, *P. aeruginosa* también se hizo crecer a 30°C como se indica en la sección de resultados. Las concentraciones de antibiótico utilizadas son las siguientes: ampicilina (Ap) 200 µg/ml, carbenicilina (Cb) 150 µg/ml, gentamicina (Gm) 150 µg/ml y tetraciclina (Tc) 60 µg/ml.

2. Construcción del plásmido pAPR1-*rhlA*(His)10

La construcción del plásmido pAPR1 se hizo mediante las técnicas de manipulación de DNA nativo (86) por el grupo del Dr. François Lépine (Canadá). El gen *rhlA* fue amplificado mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando los oligonucleótidos AF1 y AR1 (Figura 27) y teniendo como DNA molde el plásmido pUO58 que contiene los genes del operón *rhl* (Figura 28) de *P. aeruginosa* PG201 (41 y 53).

Oligo directo: AF1: 5'GATGAATTCGCGATAGCTGTTTGCCTGTTCG3', y

Oligo Reverso: AR1: 5'GCTTTCGAAAGTTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACCGACG
ACGGTACTGCTGGAAGCTACCGCATCGGCTACCGGTAGAG 3'

Figura 27. Oligos utilizados en la construcción del pAPR1, donde:

GAATTC es el sitio de restricción EcoRI.

TGCTGGAAGCTA es el Factor Xa que comienza justo en lugar del codón de término.

TACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTAC es una cola de 10 Histidinas.

TTCGAA es el sitio de restricción HindIII.

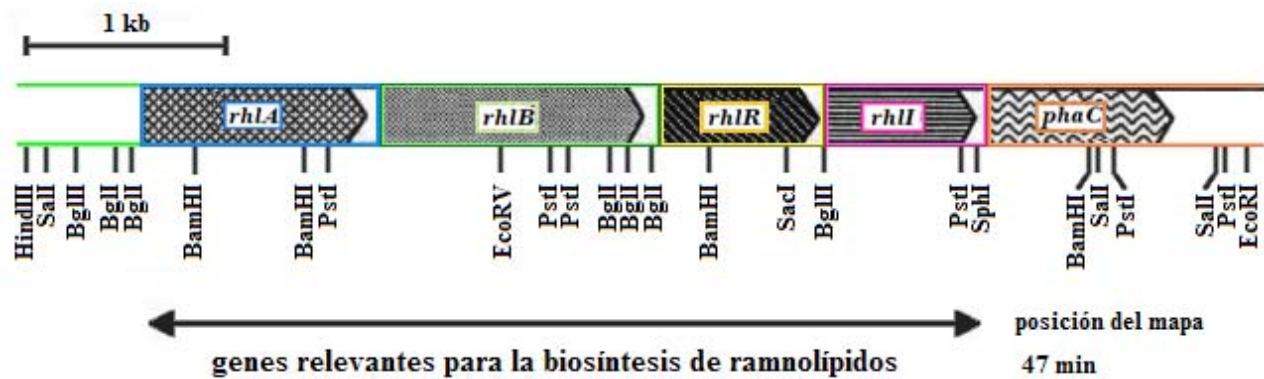


Figura 28. Mapa del operón *rhl* de *Pseudomonas aeruginosa* PG201 (41).

El gen *rhIA* (Figura 29), se clonó en el vector pUCP18 que al igual que el pUCP20 es una variante del pUC18, el cual tiene dos orígenes de replicación, el *colE1* que no trabaja en *P. aeruginosa* pero da un alto número de copias en *E. coli*. y el RO1600 que es utilizado por una gran variedad de huéspedes, lo que lo hace un vector de amplio espectro, este origen de replicación lo utiliza *P. aeruginosa* pero da un bajo número de copias (~10 por célula). Tanto el pUCP18 como el pUCP20 tienen un marcador de resistencia a la ampicilina, y se usa carbenicilina para seleccionar este vector en *P. aeruginosa*. Además, estos plásmidos pueden ser usados para seleccionar en lac^+ ó lac^- (alfa complementación) en el hospedero apropiado.

5'CGCATCCGCCGTGGCTGGTCCGCGCGGATGGCCGCTGAGTTACTTGTCTGCCGTTTCGAACAACAAGAACGAACCTCTAC
 GTAATGCCGGGATA [GATGAATTCGCGATAGCTGTTTGCCTGTTTCG] AAAATTTTTGGGAGGTGTGAAATGCGGCCGCA
 AAGTCTGTTGGTATCGGTTTGCAAGGGCCTGCGGGTACATGTGAGCGCGTTGGGCAGGATCCCAGGCGCAGCACGGTGA
 TGCTGGTCAACGGCGCGATGGCGACCACCGCTCGTTTCCGGGACCTGCAAGTGCCCTGGCCGAACATTTCAACGTGGTG
 CTGTTTCGACCTGCCCTTCCCGGGCAGTCGCGTCAGCACAACCCGCAGCGGGGGTTGATCACCAAGGACGACGAGGTGGA
 AATCCTCCTGGCGCTGATCGAGCGCTTCGAGGTCAATCACCTGGTCTCCGCGTCCGGGGCGGTATCTCCACGCTGCTGG
 CGCTGTGCGCAATCCGCGCGGCATCCGCGACTCGGTGGTGGTGGCATTCCGGGCGTGGACTGAACCAGGCGATGCTCGAC
 TACGTCGGGGCGGCGCAGGCGCTGATCGAGCTGGACGACAAGTCGGCGATCCGGCCATCTGCTCAACGAGACCCTCGGCAA
 ATACCTGCCGCCGCGCCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTTCGCTGGCCACCGGCGAATACGAGCAGGCGCGCT
 TTCACATCGACCAGGTGCTGGCGCTCAACGATCGGGGTACCTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTTC
 ATCAACGGCAGCTGGGACGAATACACCACCGCCGAGGACGCGCCAGTTCGGCGACTACCTGCCGCACTGCAGTTTCTC
 GCGGGTGGAGGGCACCAGGATTTCTCGACCTGGAGTCCAAGCTGGCCGCGGTACGCGTGCACCGCGCCCTGCTCGAGC
 ACCTGCTGAAGCAACCGGAGCCGCAGCGGGCGGAACCGCGGGGGATTCCAC [GAGATGGCCATCGGCTACGCCATCG
 AAGTTCGTCATGGCAGCAGCAT
 TGAAGCTTTCG] 3'

Figura 29. Secuencia del gen *rhIA* amplificado.

El pUCP18 fue digerido previamente mediante las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, con lo cual se creó el pAPR1 (Figura 30).

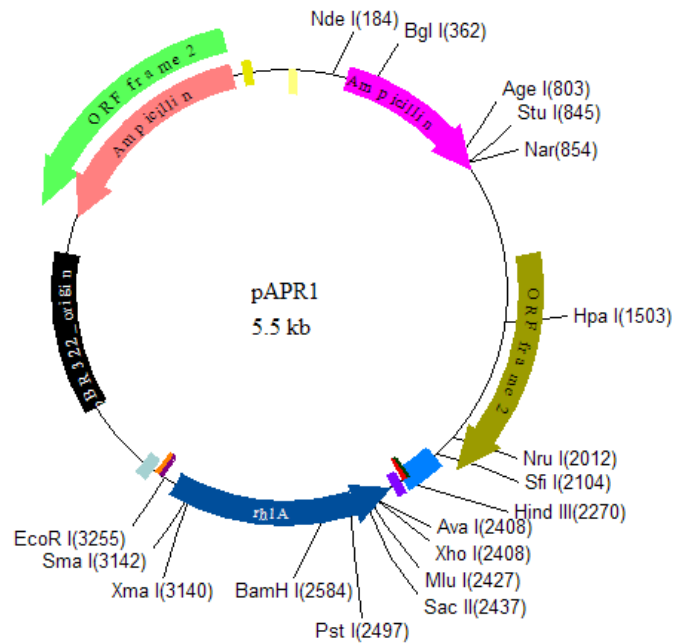


Figura 30. Mapa del vector pUCP18 / *rhlA*(His)₁₀ nombrado pAPR1.

3. Secuenciación del gen *rhlA* contenido en el plásmido pAPR1-*rhlA*(His)₁₀.

Dentro de la etapa de purificación de la proteína RhlA (datos sin publicar), se secuenció dicha proteína (mediante el método de Sanger) y se comparó su secuencia de nucleótidos con la de la secuencia de la proteína RhlA de la cepa silvestre PG201 que es de donde se amplificó *rhlA* para construir el pAPR1, encontrándose una mutación en el nucleótido 335 y que resultó en el cambio del aminoácido Leucina por Prolina. Además, dicha mutación se encuentra en un sitio conservado (46) de la proteína RhlA (Tabla 9).

	posición	335
Gen <i>rhIA</i>		
PG201		T (Leu)
pAPR1		C (Pro)

Tabla 9. Mutación encontrada en la secuenciación de la proteína RhlA del pAPR1 respecto al gen silvestre de la cepa PG201.

4. Mutagénesis sitio dirigida.

Se empleó la técnica de mutagénesis sitio dirigida (Figura 31) para hacer el cambio antes mencionado del nucleótido 335 que permitirá restablecer la secuencia del gen silvestre *rhIA* de la cepa PG201 mediante la utilización del kit “Quikchange Multi Site-Directed Mutagenesis” de Stratagen.

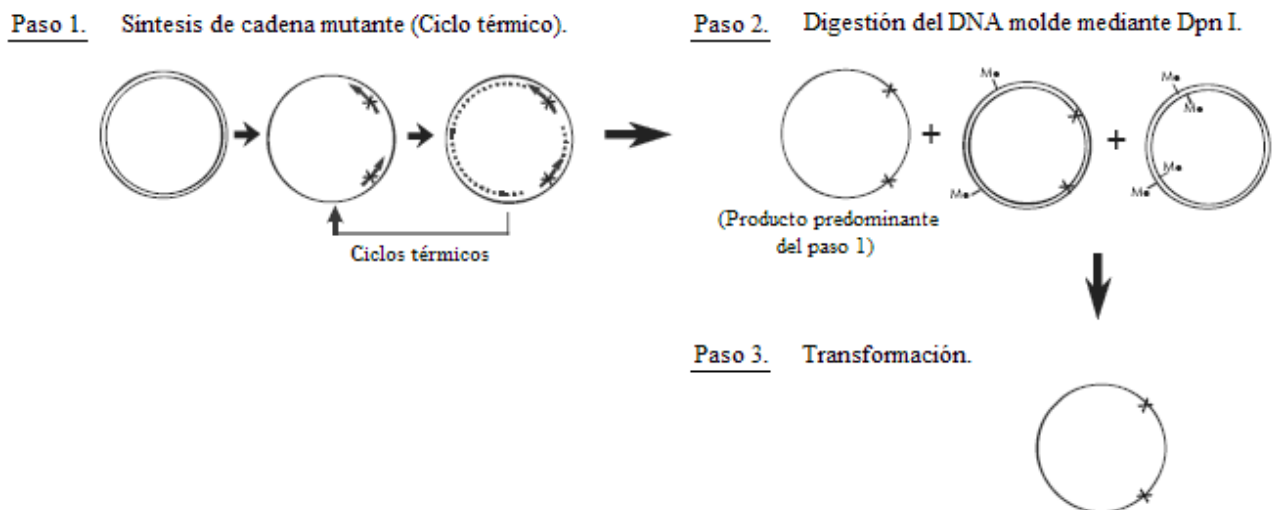


Figura 31. Principio de la técnica de mutagénesis sitio dirigida mediante kit.

El oligonucleótido empleado (Figura 32) fue diseñado en la página de Stratagen (<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>) como recomienda el kit, sin embargo el diseño puede elaborarse mediante cualquier otro programa para diseño de primers.

Oligo forward c377t : 5' ccacgtgctggcgc**t**gtcgcgcaatccgcgcgg 3'

Figura 32. Primer para realizar la mutagénesis sitio dirigida, en negrita se señala el nucleótido que permitirá generar el cambio de aminoácido Prolina (ccg) por Leucina (ctg).

5. Métodos analíticos.

Medición de ramnolípidos (rhls).

Se emplean los sobrenadantes del cultivo para hacer las extracciones de los ramnolípidos, después son sometidos a una hidrólisis ácida y la concentración de los ramnolípidos totales, se determina midiendo la concentración de ramnosa, por el método de orcinol (87) como se describe a continuación.

TÉCNICA PARA MEDIR RAMNOLÍPIDOS (87).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Sembrar un inóculo de la cepa de interés en el medio apropiado y dejar toda la noche.
2. Al día siguiente subcultivar en medio de cultivo y a las condiciones que se van a determinar los rhls.
3. Tomar 1 ml de medio de cultivo
4. Centrifugar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y desechar el pellet.

5. Obtener el sobrenadante y poner 333 μ l en un tubo Eppendorf de 1.5 ml (muestras por triplicado).

PRIMERA EXTRACCIÓN

6. Agregar 1 ml de éter y agitar por 30 seg. para mezclar perfectamente.
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min.
8. Cambiar la fase acuosa superior que lleva los ramnolípidos a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml y dejar destapado en la campana para permitir que se evapore el éter.

SEGUNDA EXTRACCIÓN

9. Agregar 1 ml de éter y agitar por 30 seg. para mezclar perfectamente.
10. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min.
11. Cambiar la fase acuosa superior que lleva los ramnolípidos al tubo de la primera extracción y dejar en la campana para permitir que se evapore el éter.

RESUSPENDER

12. Una vez evaporado el éter, agregar 1 ml de agua destilada y agitar para resuspender los ramnolípidos.

DETECCIÓN

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ORCINOL

Orcinol al 1.6 %.

H₂SO₄ al 60 %..

13. En un nuevo tubo, agregar 100 μ l de la muestra resuspendida de ramnolípidos y agregar 900 μ l de la solución de orcinol.
14. Calentar a 80°C por 30 minutos.
15. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 421 nm.

Polihidroxicanoatos (PHAs).

Se emplean únicamente las células y se hace un rompimiento celular para poder extraer los polihidroxicanoatos, después se les realiza una hidrólisis ácida y se determina la concentración total de polihidroxicanoatos mediante el coeficiente de extinción del crotonato usado como patrón (88, 94).

TÉCNICA PARA MEDIR POLIHIDROXIALCANOATOS (94, 95 y 96).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Sembrar un inóculo de la cepa de interés en el medio apropiado y dejar toda la noche.
2. Al día siguiente subcultivar en medio de cultivo y a las condiciones que se van a determinar los PHAs.
3. Tomar 10 ml de medio de cultivo.
4. Centrifugar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y repetir hasta terminar los 10 ml y obtener el paquete celular o botón.
5. Añadir 1 ml de hipoclorito de sodio comercial (Clorex) al 1.8 %.

NOTA: El cloro comercial (Clorex) sin diluir está al 6 %.

6. Resuspender las células.
7. Incubar por 1 hora a la temperatura óptima de crecimiento.
8. Centrifugar y tirar el sobrenadante.
9. Resuspender el botón en 1 ml de agua ultra pura.
10. Centrifugar y tirar el sobrenadante.
11. Resuspender el botón en 1 ml de acetona.
12. Centrifugar y tirar el sobrenadante.
13. Resuspender el botón en 1 ml de etanol.
14. Centrifugar, tirar el sobrenadante y dejar secar el botón.

NOTA: El botón debe ser blanco.

15. Disolver el botón en 1-2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

16. Calentar por 10 min. a 95°C.

NOTA: usualmente las muestras se diluyen desde 1:10 – 1:200 en ácido sulfúrico concentrado para obtener lecturas inferiores a 1 UDO.

LECTURA

17. Leer en el espectrofotómetro a 235 nm.

CÁLCULO

Para calcular la cantidad de crotonato se emplea la fórmula $A = (E)(b)(c)$

Donde: A = Absorbancia.
 E = Coeficiente de extinción del crotonato.
 b = Longitud de la celda = 1cm.
 c = Concentración.

Se obtiene un valor = 5.5128 ug/ml, que se multiplica por (Absorbancia)(dilución)

Hidroxiálquilquinolonas (HAQs).

Se obtienen extractos de los sobrenadantes del cultivo y son utilizados en placas para cromatografía de placa fina o placas de TLC (Thin Layer Chromatography), luego, estos extractos son separados mediante una fase móvil y finalmente se visualiza la muestra mediante el uso de un transiluminador y se fotografían las placas (89 y 159).

TÉCNICA PARA MEDIR HAQs (89 y 159).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Sembrar un inóculo de la cepa de interés en el medio apropiado y dejar toda la noche.

2. Al día siguiente subcultivar en medio de cultivo y a las condiciones que se van a determinar los HAQs.
3. Tomar 10 ml de medio de cultivo
4. Centrifugar y desechar el botón.

PRIMERA EXTRACCIÓN

5. Agregar 1 volumen de acetato de etilo acidificado y mezclar perfectamente.
6. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. a 4°C.
7. Cambiar la fase acuosa superior a otro tubo y dejar secando en la campana para permitir que se evapore el solvente.

SEGUNDA EXTRACCIÓN

8. Agregar 1 volumen de de acetato de etilo acidificado y mezclar perfectamente.
9. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. a 4°C.
10. Cambiar la fase acuosa superior al tubo de la primera extracción y dejar en la campana para permitir que se evapore el solvente.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

11. Resuspender en 0.1 volumen de acetato de etilo acidificado y volver a dejar secar en la campana.
12. Resuspender en 0.001 volumen de metanol.

PLACAS DE TLC

13. Sumergir las placas por 30 minutos en una solución de KH_2PO_4 al 5% agitando suavemente.
14. Activar las placas en un horno a 85°C de 1-1.5 hrs.

CORRER MUESTRAS Y FOTOGRAFIARLAS

15. Poner las muestras en las placas y correrlas verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con la fase móvil. Una vez separadas, verlas en un transiluminador y tomar la foto.

Piocianina (PYO).

Las fenacinas son aisladas del medio de cultivo que se encuentra coloreado sin células, mediante la extracción de solventes orgánicos y luego se hace una acidificación a la muestra y finalmente se mide la cantidad de piocianina producida.

TÉCNICA PARA MEDIR PIOCIANINA (63 y 158).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Sembrar un inóculo de la cepa de interés en el medio apropiado y dejar toda la noche.
2. Al día siguiente subcultivar en medio de cultivo y a las condiciones que se va a determinar la producción de PYO.
3. Tomar 10 ml del medio de cultivo.
4. Centrifugar y desechar el pellet.

EXTRACCIÓN

5. Se agrega cloroformo al sobrenadante en proporción 1:3 respectivamente.
6. Agitar vigorosamente y dejar reposar hasta obtener dos fases.
7. Extraer la fase orgánica inferior (color azul).
8. Acidificar con 1 ml de HCl 0.2 N y extraer la fase superior.

NOTA: La coloración azul característica debido a la piocianina vira a rojo.

MEDICIÓN

9. Medir en el espectrofotómetro a 520 nm y multiplicar por el factor 17.072 para obtener la concentración de piocianina en $\mu\text{g} / \text{ml}$.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE DATOS

1. RhlA* sintetiza ácidos grasos unidos a CoA.

Para conocer el papel que tiene RhlA* sobre la producción de los polihidroxicanoatos (PHAs), se utilizaron cepas transformadas de *P. putida* (que únicamente produce polihidroxicanoatos) con el plásmido pAPR1, que codifica para la proteína RhlA*-His₁₀. Usamos la cepa silvestre KT2440 y una mutante *phaG*⁻ que es incapaz de producir PHAs cuando se crece a la bacteria en glucosa como fuente de carbono, pues no puede catalizar la transacilación de 3-hidroxiácidos-ACP a 3-hidroxiácidos-CoA.

Los resultados obtenidos con *P. putida*, son mostrados en la [Figura 33](#) en donde se puede ver que la cepa silvestre produce el 100% de los PHAs y al ser transformada con el plásmido que contiene al gen *rhlA**, dicha producción se restituye y aumenta en un 50%, sugiriendo que RhlA* participa en dicha síntesis.

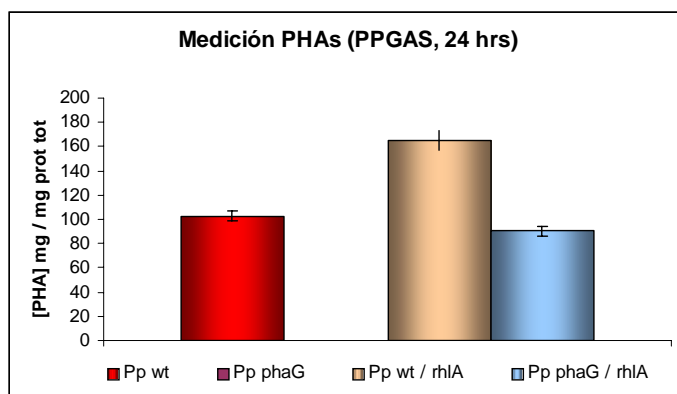


FIGURA 33.

Producción de PHAs en *P. putida* KT2440. 1. Cepa wt, 2. Mutante *phaG*⁻ (no produce PHAs) 3. wt/pAPR1-*rhlA** donde se sobreproducen los PHAs, 4. *phaG*⁻/pAPR1-*rhlA** donde se observa complementación en la producción de PHAs.

Los PHAs fueron determinados por triplicado a las 24 horas de incubación en medio PPGAS y a 30° C.

* Con este símbolo (*), se designará en esta investigación al gen *rhlA** codificado en el vector pAPR1, que expresa a la proteína RhlA* la cual tiene un cambio en un aminoácido conservado.

De forma similar, se observa que la mutante *phaG* al ser transformada con el pAPR1, complementa la síntesis de PHAs en un 87%. Esto sugiere que el producto de RhlA* está unido a CoA ya que puede proveer de sustrato a PhaC en *P. putida*, lo que sugiere que RhlA* tiene la misma actividad que PhaG de transferir un ACP-ácido graso a un CoA-ácido graso.

2. Efecto de la sobreexpresión de la proteína RhlA* sobre las síntesis de ramnolípidos y polihidroxicanoatos en *P. aeruginosa*.

Como ya se mencionó, *P. aeruginosa* produce rhls y PHAs, por vías que usan el mismo sustrato lipídico, por lo que se esperaba la existencia de cierta competencia por la fuente de carbono y/o precursor (3-hidroxiácidos). Por lo anterior se midieron los dos productos de las vías para ver el efecto de RhlA* en dichas cepas (Figuras 34 y 35).

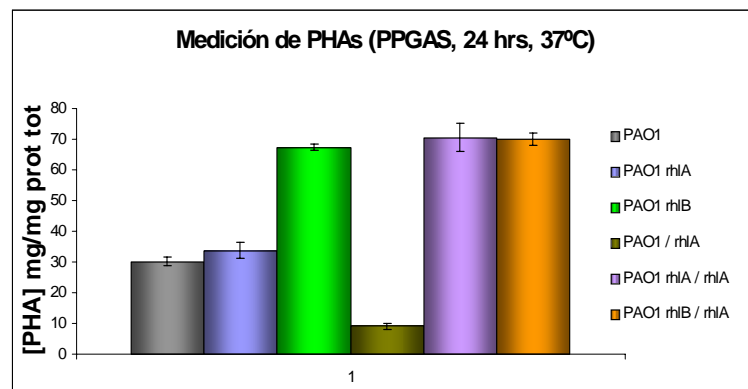


FIGURA 34. Producción de PHAs en *P. aeruginosa*. 1. Cepa wt, 2. Mutante *rhlA*, 3. Mutante *rhlB*, 4. wt/pAPR1-*rhlA** donde se observa una disminución de los PHAs, y 5 y 6. Mutantes *rhlA* y *rhlB* con el pAPR1-*rhlA** donde se observa que se sobreexpresan los PHAs.

Los PHAs fueron determinados por triplicado a las 24 horas de incubación en medio PPGAS y a 37° C.

Los resultados (Figura 34) demuestran que RhlA puede contribuir para que la síntesis de PHAs aumente en una mutante *rhlB* de *P. aeruginosa* respecto a la cepa silvestre. Así mismo, si se toma como un 100%, la producción de PHA de la cepa silvestre, se observó una disminución de hasta el 70% al compararla con su transformante que contiene el pAPR1, debido a que la producción de rhl's se ve favorecida (Figura 35). En la mutante *rhlA* complementada con pAPR1-*rhlA*(His)₁₀ se observa un aumento en la síntesis de PHAs a 37°C y siendo que no puede haber producción de ramnolípidos por ser una mutación polar (mutación *rhlAB*). Este resultado sugiere que se incrementa la síntesis de PHAs debido a que RhlA da precursores a dicha síntesis, y siendo más claro aún cuando se tiene una mutante *rhlB*, incapaz de formar rhl's con una producción de hasta el doble (220%) respecto a la silvestre (100%), favoreciéndose la vía de síntesis de PHAs de igual forma que la mutante anterior en la que no hay producción de rhl's.

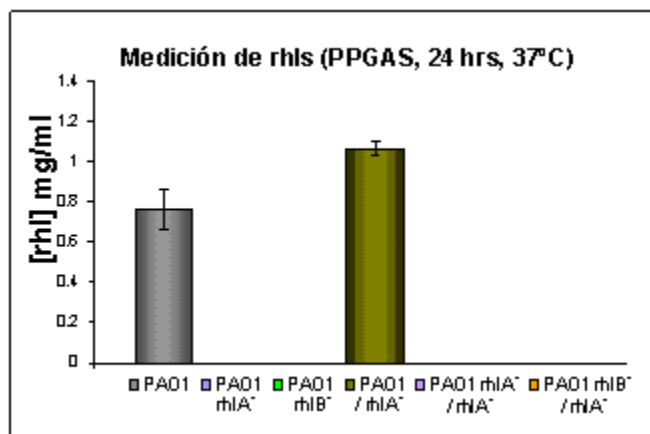


FIGURA 35. Producción de rhl's en *P. aeruginosa*. 1. Cepa wt, 2 y 3. Mutantes *rhlA* (barra azul) y *rhlB* (sin producción de rhl's por estar bloqueadas en la vía), 4. Cepa wt/pAPR1-*rhlA** donde se observa un incremento de los rhl's, 5 y 6. Las mutantes *rhlA* y *rhlB* que llevan el pAPR1-*rhlA** sin producción de rhl's.

Todas las cepas de *P. aeruginosa* fueron cultivadas en matraces de 250 ml conteniendo 30 ml de medio PPGAS y la incubación fue hecha a 37° C por 24 hrs. Los rhl's fueron determinados mediante el ensayo de orcinol.

Para demostrar que la proteína RhlA*-His₁₀, codificada por el plásmido pAPR1, es la responsable de la actividad tipo PhaG en *P. putida*, se buscó a la proteína mediante inmunoensayos, para lo cual se utilizó un anticuerpo anti-poli-histidinas (de 6-8 histidinas). El resultado muestra que aquellas cepas que contenían el plásmido pAPR1 fueron las únicas en expresar la proteína RhlA-His₁₀ (Figura 36).



Figura 36. Inmunoensayo empleando Western Blot para analizar la expresión de RhlA* en *P. aeruginosa*.

Las cepas de *P. aeruginosa* fueron cultivadas en matraces de 250 ml conteniendo 30 ml de medio PPGAS y la incubación fue hecha a 37° C por 24 hrs. Y para la detección de la proteína RhlA* codificada en el pAPR1, se empleó un anticuerpo anti-poli-histidinas.

Las líneas corresponden al total de proteína detectada de las siguientes cepas:

- | | | | |
|--------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| 1) PAO1 | 2) PAO1/pAPR1 | 3) PAO1 rhlA | 4) PAO1 rhlA/pAPR1 |
| 5) PAO1 rhlB | 6) PAO1 rhlB/pAPR1 | 7) E.coli MC4100/pAPR1 | |

3. Efecto de la expresión de RhlA* en la producción de piocianina en *P. aeruginosa*.

Cuando se hicieron los cultivos para medir la producción de rhlS y PHAs, se hizo aparente que los cultivos presentaban gran variación en la producción de piocianina, por lo que se procedió a medir este pigmento y se trató de ver si había una correlación con la expresión de la actividad de RhlA* (Figura 37).

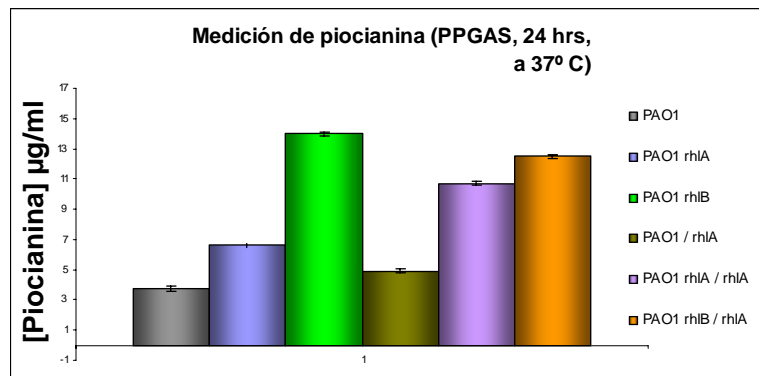


Figura 37. Producción de piocianina en *P. aeruginosa*. En la cepa wt (barra gris), en las mutantes *rhlA* (barra azul) y *rhlB* (barra verde), así como en la cepa wt/pAPR1-*rhlA** (barra dorada) donde se observa un ligero aumento de la producción de piocianina, y aumento en las mutantes *rhlA* (barra morada) y *rhlB* (barra naranja) que llevan el pAPR1-*rhlA**.

Todas las cepas de *P. aeruginosa* fueron cultivadas en matraces de 250 ml conteniendo 30 ml de medio PPGAS y la incubación fue hecha a 37°C por 24 hrs.

Se pudo observar que tanto la mutante *rhlB* como la *rhlB*/pAPR1 (no formadoras de rhls), producen altos niveles de este pigmento (Figura 37). Lo que sugiere que la sobreexpresión de *RhlA** está favoreciendo de alguna forma la producción de piocianina, aunque no se conoce muy bien como sucede esto. Sin embargo se conoce que la producción de piocianina está regulada por el autoinductor PQS (109). Más adelante se mostrarán algunos experimentos para determinar si la sobreproducción de piocianina en las cepas que tienen una expresión elevada de *RhlA** está relacionada con la producción de la molécula señal PQS.

4. Efecto del bloqueo en la síntesis de ramnolípidos sobre la producción de PHAs y piocianina.

Como se observó en el punto anterior, al bloquearse la síntesis de ramnolípidos en una mutante *rhlA*/pAPR1, se aumenta la producción de PHAs por la contribución de la actividad de *RhlA* en trans, que de alguna forma puede dar sustrato a PhaC.

También se observó que la concentración de piocianina aumenta en la mutante *rhlB* y en la *rhlB/pAPR1*, conociéndose que existe una estrecha correlación entre PQS y la producción del pigmento azul.

Por todo lo anterior, se puede proponer que quizá el aumento de la disponibilidad de HAAs en la mutante *rhlB* de *P. aeruginosa*, pudiera estar incrementando la concentración de la molécula señal PQS o quizás de su intermediario HHQ y por ello, tener un aumento en la concentración de piocianina.

Para poder comprobar lo anterior, se hicieron bioensayos basados en la activación dependiente de la molécula PQS mediante la utilización de una fusión *lecA::lux* en una mutante *pqsA* de *P. aeruginosa* que se encuentra bloqueada en la síntesis de PQS y de su intermediario HHQ, con lo cual se estimó de forma cualitativa la cantidad de estos dos compuestos (Figura 38 A). Además también se estimó la abundancia relativa de estos dos compuestos, mediante la utilización de cromatografía de placa TLC (Thin Layer Chromatography) (Figura 38 B).

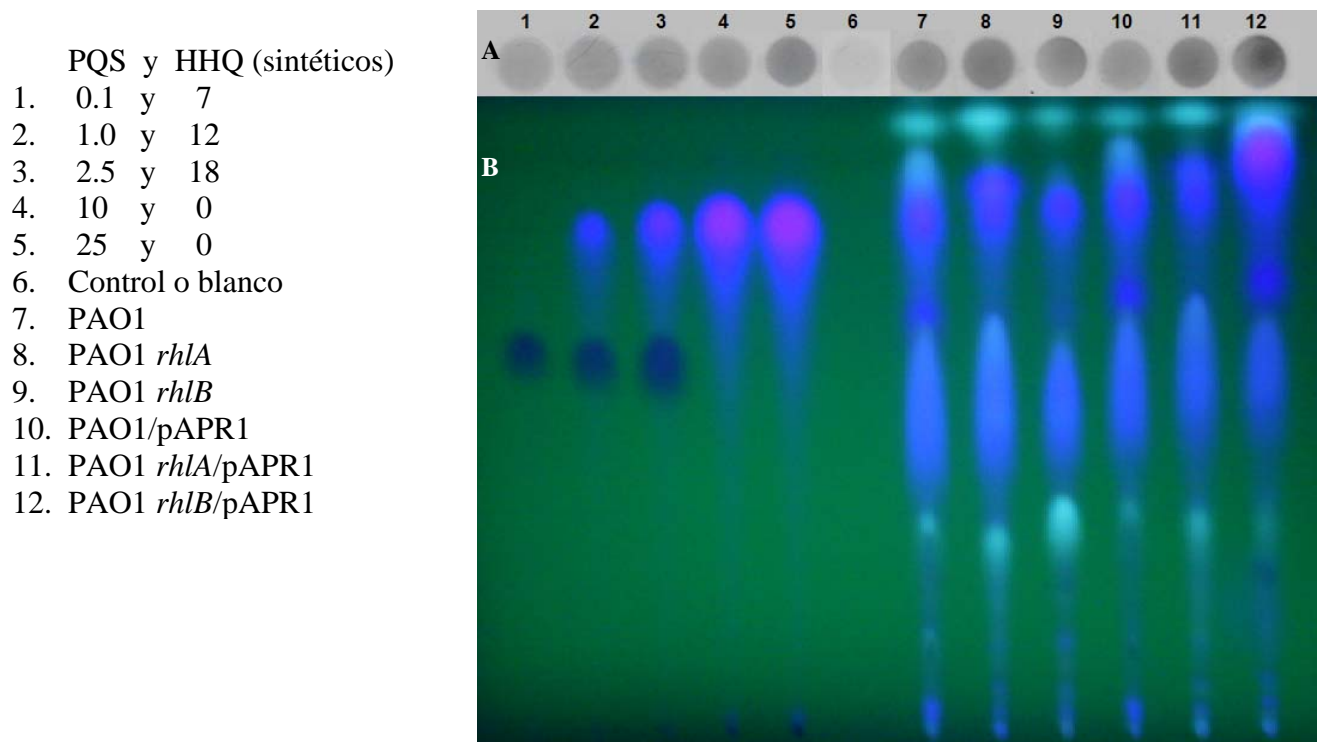
Como resultado de este experimento, se obtuvo que la mutante *rhlB* no produce altas concentraciones de la molécula señal PQS y de HHQ en comparación con la tipo silvestre, sin embargo esta misma mutante *rhlB* que lleva el plásmido con el gen *rhlA*, sí produjo altas concentraciones de PQS y HHQ incluso más que la tipo silvestre. Lo que sugiere que RhlA pudiera tener una actividad directa para contribuir en la síntesis de piocianina y no a través del aumento de PQS, aunque aún no se sabe bien de que forma se lleva a cabo esta relación.

Figura 38. Efecto de las hidroxialquil quinolonas PQS y HHQ sobre la expresión de la fusión *lecA::lux* en una mutante *pqsA*.

A. Empleo de la técnica de Dot Blot para detectar la producción de PQS y HHQ, empleando el biorreportero *lecA::lux*.

B. Placa de TLC (Cromatografía de Placa Fina) cubierta con un biorreportero HAQ y vista con un luminómetro, donde las muestras estándar y los extractos de PQS y HHQ (extraídos de los sobrenadantes de *P. aeruginosa*), se visualizaron mediante el empleo de un transiluminador como manchas bioluminiscentes.

Las líneas tienen el siguiente orden y todas las concentraciones se encuentran en μg .



5. Efecto de la temperatura en la producción de rhls y PHAs en *P. aeruginosa*.

Es importante mencionar que se observaron algunas diferencias a simple vista cuando los cultivos de *P. aeruginosa* (tanto la cepa silvestre como sus mutantes *rhlA* y *rhlB*) estuvieron creciendo a 30° (Figura 39) en comparación con los de 37° (Figura 34). Así, los

aspectos más representativos fueron la presencia o aumento de la pigmentación en los medios de cultivo debido a la producción de piocianina. También se pudo observar (Figura 39) que la proteína RhIA* a 30° se expresa poco y por lo tanto fue difícil ver su efecto en dichos cultivos.

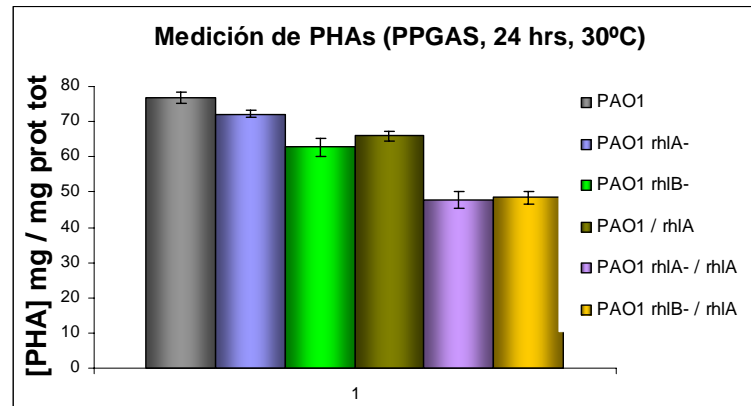


FIGURA 39. Producción de PHAs en *P. aeruginosa*. Se determinó en la cepa wt (barra gris), y en las mutantes *rhIA* (barra azul) y *rhIB* (barra verde) así como en la cepa wt/pAPR1-*rhIA** (barra dorada), y en las mutantes *rhIA* (barra morada) y *rhIB* (barra naranja) con el pAPR1-*rhIA**.

Todas las cepas de *P. aeruginosa* fueron cultivadas en matraces de 250 ml conteniendo 30 ml de medio PPGAS y la incubación fue hecha a 30° C por 24 hrs.

6. pAPR1 contiene una mutación en un sitio conservado de la proteína.

Por otro lado, para seguir con la caracterización de la proteína RhIA, dentro de las mismas investigaciones del laboratorio, se está purificando la proteína RhIA, por lo cual se mandó a secuenciar el pAPR1 y se encontró como ya se había mencionado, una mutación al compararse con la secuencia de la cepa PG201. La mutación consistió en un cambio significativo ya que se hace la sustitución de una leucina por una prolina y además de encontrarse en un sitio conservado (Tabla 7).

Por lo tanto, para poder especificar que los resultados anteriores corresponden a la actividad de la proteína RhlA* expresada por el pAPR1-*rhlA*(His)₁₀ en *P. putida* o en su caso pudieran ser debido a dicha mutación, se realizó la mutagénesis sitio dirigida para revertir la mutación y probar que la complementación observada en la mutante *phaG* de *P. putida* no cambia al expresar a la proteína RhlA silvestre y por tanto no afecta la mutación.

7. Mutagénesis sitio dirigida en la secuencia de RhlA*.

Se realizó la mutagénesis como se describió en Materiales y Métodos, de esta forma se restableció la proteína RhlA silvestre de la cepa PG201 codificada en el pAPR1, ahora denominado pAPRS.

Teniendo la proteína de forma silvestre es necesario comprobar que dicha mutación que se encuentra en un sitio conservado de la proteína no modifica los resultados encontrados en la producción de rhls, PHAs, piocianina, HHQ y PQS, al sobreexpresar a RhlA tanto en *P. putida* como en *P. aeruginosa*.

8. Transformación de *P. putida*, *P. aeruginosa* y *E. coli* con el pAPRS-*rhlA*(His)₁₀ proveniente de la mutagénesis.

Tanto *P. putida*, *P. aeruginosa* como *E. coli*, fueron transformadas con el pAPRS y se obtuvieron colonias, sin embargo al obtener el plásmido mediante un estuche comercial (Promega) para comprobar su presencia y luego su secuencia para asegurar que no se tuviera otra mutación, únicamente se observó el plásmido en *P. aeruginosa* y *E. coli* (Figura 40).

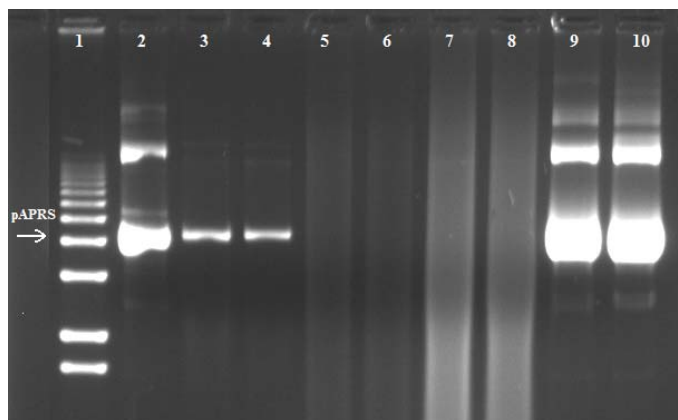


Figura 40. Screening de las cepas transformadas con el pAPRS.

- Carriles:
1. Marcador de peso molecular.
 2. Plásmido pAPRS obtenido de la mutagénesis, empleado como control.
 3. PAO1 wt/pAPRS.
 4. PAO1-*rhlA*⁻/pAPRS.
 - 5 y 6. *P. putida* KT2440/pAPRS.
 - 7 y 8. *P. putida* KT2440-*phaG*/pAPRS.
 - 9 y 10. *E. coli* XL1-Blue/ pAPRS.

También se observó que las cepas de *P. aeruginosa* como de *E. coli* transformadas con el plásmido pAPRS eran inestables, ya que cuando se intentó hacer la resiembra tanto de caja como de las conservadas criogénicamente mediante glicerol para obtención de más plásmido, no se pudieron recuperar, por lo que se requería volver a transformar.

Por otro lado, las técnicas de transformación para *P. putida* KT2440 probadas fueron químicas y de electroporación según lo recomendado en la literatura para esta bacteria (107 y 108). Mediante dichas técnicas se obtuvieron satisfactoriamente las transformantes cuando se empleó el pAPR1, sin embargo como se señaló, no fue posible observar la presencia del plásmido, aunque las cepas eran resistentes al antibiótico a diferencia de las cepas sin transformar que únicamente crecen en LB. Por lo anterior se llevó a cabo la transformación química clásica que se utiliza para *Pseudomonas* y para *E.coli*, (CaCl_2 y MgCl_2 respectivamente), sin embargo los resultados fueron idénticos.



CONCLUSIONES

Al expresar a la proteína RhlA* codificada en el pAPR1 en el fondo genético de *P. putida*, se genera un incremento en la producción de PHAs (Figura 33), indicando que:

- RhlA* es capaz de sintetizar derivados de ácidos grasos que pueden ser utilizados como sustrato de la PHA sintasa (PhaC) que polimeriza los PHAs, por lo cual se puede pensar que el producto de RhlA* son los HAAs-CoA (Figura 41).

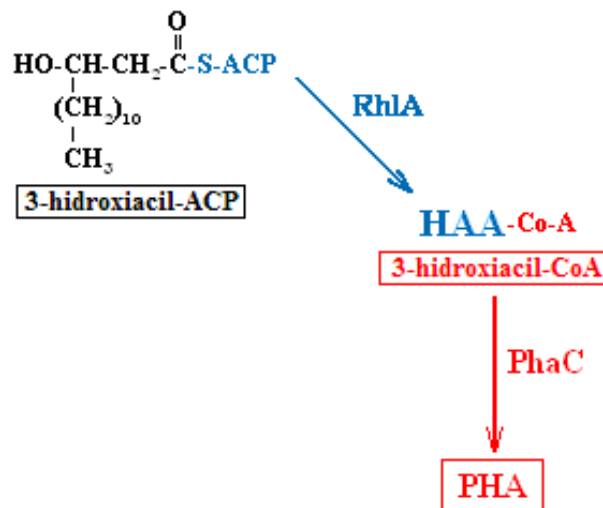


Figura 41. RhlA* contribuye en la producción de los polihidroxiacanoatos (PHAs).

- RhlA* tiene una función de transacilación similar a la de PhaG, sin excluir que probablemente RhlA* estuviera produciendo también los HAAs-ACP.

Además, en las mutantes *rhIA* y *rhIB* de *P. aeruginosa* donde la síntesis de ramnolípidos está bloqueada debido a la polaridad de la mutación (41), y llevando el plásmido pAPR1, los resultados encontrados sugieren que:

- *P. aeruginosa* puede emplear dos rutas (que se suman) para la síntesis de PHAs cuando usa un azúcar como fuente de carbono. Una depende de PhaG al igual que en *P. putida* y la otra depende de RhlA*.
- La expresión de RhlA* (pAPR1) en *P. aeruginosa* genera cierta competencia en el flujo de carbono en las síntesis de rhIs y de PHAs, favoreciéndose la ruta de los rhIs al estar en función las dos vías, e incrementándose la de PHAs cuando se bloquea la de rhIs (Figura 42), debido a que las actividades de RhlA y RhlB están acopladas para la síntesis de ramnolípidos (45).

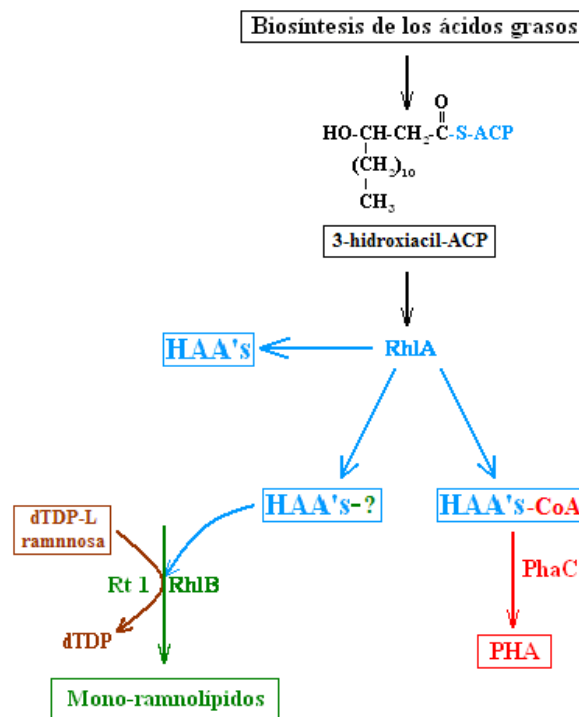


Figura 42. RhlA* puede generar sustrato para las biosíntesis de ramnolípidos (rhIs) y polihidroxi-alcanoatos (PHAs).

Aunque se sabe que en *P. aeruginosa* los HAAs son utilizados por RhlB para la síntesis de mono-ramnolípidos (45 y 52), se desconoce la especificidad que tiene RhlB por su sustrato para producirlos, pudiendo ser los HAAs libres, HAA-ACP ó HAA-CoA (Figura 42) (ver perspectivas).

Cabe señalar que el efecto de la expresión de RhlA* (del pAPR1) en la mutante *rhlB*, causó un incremento de los PHAs y en la producción de PYO, aunque dicho aumento no correlacionó con el incremento en la producción de PQS y HHQ, como se ha mostrado en algunas investigaciones, sugiriendo que pudiera ser debido a:

- Que de alguna forma el producto de la catálisis de RhlA* modifica el flujo de carbono celular para generar el sustrato de la síntesis para PYO, cuando la biosíntesis de ramnolípidos se encuentra bloqueada por la falta de actividad de RhlB.

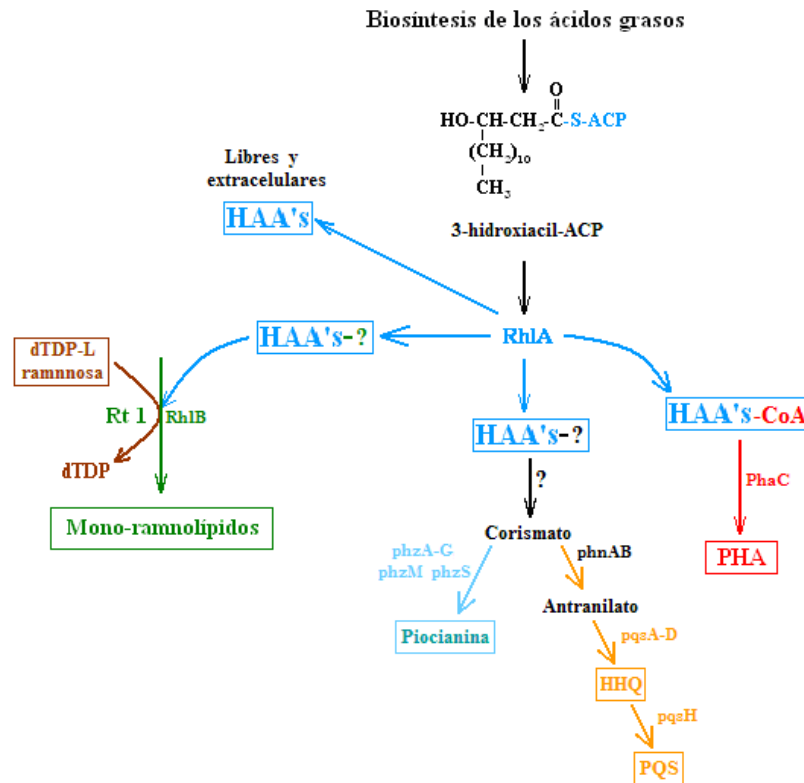


Figura 43. Interacción de RhlA* con otras vías de acuerdo a los resultados de esta investigación.

Al recuperar la proteína silvestre RhlA mediante mutagénesis (pAPRS), mostró una marcada inestabilidad tanto en las transformantes de *Pseudomonas* como de *E.coli*, por lo que las células tienen un corto tiempo de vida y es necesario retransformar cada que va a utilizar la cepa. Se cree que la sobreexpresión de RhlA pudiera resultar desfavorable en los diferentes fondos genéticos que se emplearon, ocurriendo la primera mutación en el pAPR1, lo que hizo a la proteína más estable y reduciendo su concentración (Figura 36).

Sin embargo, en el caso de *P. putida*, se cree que quizá las células se inestabilizan por el pAPRS y en los pases preparativos a la purificación del plásmido (donde no se utiliza antibiótico), se estuviera perdiendo el plásmido, aunque faltaría comprobar este punto (ver perspectivas), aunque no se descarta que el tiempo de vida sea corto como sucede con las demás cepas.

Una posible alternativa que por el momento no podemos excluir es que RhlA* (pAPR1) tenga una actividad enzimática distinta a la proteína silvestre y no sólo una mayor inestabilidad. El hecho de que mantenga su actividad en la síntesis de ramnolípidos cuando se coexpresa con RhlB en *P. aeruginosa* (Figura 32), sugiere que la mutación no cambia cualitativamente a la enzima. Sin embargo ésto todavía hay que demostrarlo.



PERSPECTIVAS

Dentro de este apartado se presentan los puntos más importantes que requieren realizarse mediante experimentación, ya que permitirán demostrar la verdadera función de la proteína silvestre RhlA de *P. aeruginosa* PG201 codificada en el pAPRS, en comparación con los resultados obtenidos mediante la expresión de RhlA* codificada en el pAPR1, además de dar seguimiento a esta investigación permitiéndose explorar otros parámetros referentes al tema en estudio.

Así, al utilizar a *P. putida*, se podrá demostrar que RhlA puede proveer de sustrato a la vía de síntesis de polihidroxicanoatos, para lo cual se requiere:

- Primeramente, corroborar que *P. putida* KT2440 y su mutante *phaG* no pierdan el plásmido pAPRS, para lo cual se requiere crecer siempre a las transformantes en antibiótico.
- Cuantificar la producción de PHAs en las cepas de *P. putida* KT2440, y en las cepas transformadas conteniendo el plásmido pAPRS.

De igual manera deberá emplearse el fondo genético de PAO1, y algunas mutantes para ver el efecto de la sobreexpresión de RhlA, por lo cual se requiere:

- Cuantificar la producción de mono-rhls, PHAs, piocianina, PQS y HHQ, en

la cepa silvestre PAO1 así y sus mutantes *rhlA* y *rhlB* así como en sus respectivas transformantes conteniendo el plásmido pAPRS.

- Cuantificar la producción de PHAs en la mutante *phaG* de *P. aeruginosa* con y sin el plásmido pAPRS.
- Medir la producción de HAAs libres usando tanto RhlA* (pAPR1) como la proteína silvestre.

Por otra parte es importante conocer si RhlB puede usar HAA-Co-A como sustrato por lo que se requiere emplear un sistema como el de *E. coli* y generar mediante una estrategia ingenieril que permita alcanzar dicho punto, por lo cual se necesita:

- Clonar al gen *rhlB* en un vector de expresión con promotor inducible de arabinosa y transformar una cepa de *E. coli* para cuantificar la producción de rhls, en diferentes fuentes de carbono.
- Cuantificar la producción de rhls en una cepa de *E. coli* donde se estén expresando los genes de *rmlBDAC* y *rhlB* en dos fuentes diferentes de carbono (glucosa y ácido oleico) para determinar si RhlB es capaz de usar los ácidos grasos unidos a CoA como sustrato en la síntesis de ramnolípidos.



REFERENCIAS

- (1) Palleroni, N. 1984. Family I. *Pseudomonaceae*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. p. 141–199.
- (2) Garrity, G.M. Bell, J.A. and Lilburn, T.G. 2004. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed 2^a. Springer New York Berlin Heidelberg.
- (3) <http://stri.discoverlife.org/mp/20m?tree=Proteobacteria&res=800> Proteobacteria. Discover Life: Tree of Life.
- (4) Madigan, M. and Martinko, J. (editors). 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th ed. Prentice Hall. ISBN 0131443291.
- (5) Davis, B.D. Dulbecco, R. Eisen, H.N. Ginsberg, H.S. Wood, W.B. McCarty, M. 1978. *Tratado de Microbiología*. 2^a. ed. Barcelona (España), Ed. Salvat, 1978. pág. 80.
- (6) Swing, W.H., Davis, B.R., and Martín, W. J. 1966. *Outline the Methods for the Isolation and Identification of Vibrio cholerae*. Atlanta, National Communicable Disease Center.
- (7) *Pseudomonas*, Vol. 1, 2004. Plenum Publishers, New York.
- (8) La Universidad Computense de Madrid. *Guía Clínica*. España. 2002. <http://www.ucm.es/info/mfar/PDF/Guia clinica.PDF>.
- (9) Hardalo, C. and Edberg, S.C. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23:47-75.
- (10) Schaeffer, T.L. Cantwell, S.G. Brown, J.L. Watt, D.S. and Fall, R.R. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:742-746.
- (11) Maier, M.R. and Soberón-Chávez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:625-633.
- (12) Miller, R.M. 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl):59-62.
- (13) Olivera, E.R. Cenicero, D. Jodra, R. Minambres, B. García, B. 2001. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3:612-618.
- (14) Martínez, A. and Soberón-Chávez, G. 2001. Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:731-735.
- (15) Soberón-Chávez, G. and Palmeros, B. 1994. *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol.* 20:95-105.
- (16) Hays, E.E. Wells, I.C. Katzman, P.A. Cain, C.K. Jacobs, F.A. Thayer, S.A. and Doisy, E.A. 1945. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Biol. Chem. St. Louis (USA)*. 159:725.
- (17) Valera-Luna, C. y Delgado-Calva L.M. 2002. Obtención de un bactericida a partir de *Pseudomonas aeruginosa* para emplearse en la desinfección de aguas residuales. *TESE*. 1-113.
- (18) <http://www.chiron.com>, <http://www.novartisclinicaltrials.com/webapp/etrial/DiseaseID99/Cystic-Fibrosis-clinical-trials.go>. http://www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp.
- (19) Stover, C.K. Pham, X.Q. Erwin, A.L. Miizoguchi, S.D. Warrener, P. Hickey, M.J. Brinkman, F.S.L. Hufnagle, W.O. Kowalik, D.J. Lagrou, M. Garber, R.L. Goltry, L. Tolentino, E. Westbrook-Wadman, S. Yuan, Y. Brody, I.L. Coulter, S.N. Folger, K.R. Kas, A. Larbig, K. Lim, R. Smith, K. Spencer, D. Wong, G.K.-S. Wu, Z. Paulsen, I.T. Reizer, J. Saier, M.H. Hancock, R.E.W. Lory, S. and Olson. M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406:959-964.
- (20) www.pseudomonas.com
- (21) Nelson, K.E. Weinel, C. Paulsen, I.T. Dodson, R.J. Hilbert, H. Martins dos Santos, V.A.P. Fouts, D.E. Gill, S.R. Pop, M. Holmes, M. Brinkac, L. Beanan, M. DeBoy, R. T. Daugherty, S. Kolonay, J. Madupu, R. Nelson, W. White, O. Peterson, J. Khouri, H. Hance, I. Chris Lee, P. Holtzapple, E. Scanlan, D. Tran, K. Moazzez, A. Utterback, T. Rizzo, M. Lee, K. Kosack, D. Moestl, D. Wedler, H. Lauber, J. Stjepandic, D. Hoheisel, J. Straetz, M. Heim, S. Kiewitz, C. Eisen, J. Timmis, K.N. Dusterhöft, A. Tümmeler, B. and Fraser, C.M. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* (4) 12:799–808.
- (22) Nickel, J.C. Ruseska, I. Wright, J.B. and Costerton, J.W. 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimic. Agents Chemoth.* 27:619-624.

- (23) Nikaido, H. Okusu, H. Ma, D. and Li, X.-Z. 1996. Multidrug efflux pumps make a major contribution to drug resistance in *Pseudomonads*. In: Molecular biology of *Pseudomonads*. T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas and S. Silver (eds.) ASM Washington DC. 353-362.
- (24) Yoshimura, F. and Nikaido, H. 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* 152:636-642.
- (25) Van Delden, C. Iglewski, B.H. 1998. Cell-to cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4:551-560.
- (26) http://www.drlera.com/bacterial_diseases/pseudomonas_aeruginosa.htm
- (27) Zulianello, L. Canard, C. Köhler, T. Caille, D. Lacroix, J.-S. and Meda, P. 2006. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelium by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74:3134-3147.
- (28) Landunski, A.M. Ventre, I. and Sturgis, J.N. 2004. Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. *Microbiol.* 2:581-592
- (29) Smith, R.S. and Iglewski, B.H. 2003. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:56-60.
- (30) Soberón-Chávez, G. Aguirre-Ramírez, M. and Ordóñez, L.G. 2005a. Is *Pseudomonas aeruginosa* only sensing quorum? *Critical. Rev. Microbiol.* 31:171-182.
- (31) Diggle, S.P. Cornelis, P.W. Williams, P. and Cámara, M. 2006a. 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules new perspectives. *Int. J. Med. Microbiol.* 296:83-91.
- (32) Bredenbruch, F. Nimitz, M. Wray, V. Morr, M. Müller, and R. Häussler, S. 2005. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. *J. Bacteriol.* 187:3630-3635.
- (33) Greenberg, E.P. 1997. Quorum sensing in gram-negative bacteria. *A.S.M. News.* 63:371-7.
- (34) Déziel, E. Lépine, F. Milot, S. He, J. Mindrinos, M.N. Tompkins, R.G. and Rahme, L.G. 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:1339-1344.
- (35) Pesci, E.C. Milbank, J.B. Pearson, J.P. McKnight, S. Kende, A.S. Greenberg, E.P. and Iglewski, B.H. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:11229-11234.
- (36) Pearson, J.P. Passador, L. Iglewski B.H. and Greenberg, E.P. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 92:1490-1494.
- (37) Pearson, J.P. Gray, K.M. Passador, L. Tucker, K.D. Eberhard, A. and Iglewski, B.H. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:197-201.
- (38) Lépine, F. Déziel, E. Milot, S. and Rahme, L.G. 2003. A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas* cultures. *Elsevier. Science.* 36-41.
- (39) Déziel, E. Lépine, F. Dennie, D. Boismenu, D. Mamer, O.A. and Villemur, R. 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta-Molec. Cell Biol. Lipids.* 1440:244-252.
- (40) Rahim, R. Ochsner, U.A. Olvera, C. Graninger, M. Messner, P. Lam, J.S. and Soberón-Chávez, G. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40:708-718.
- (41) Ochsner, U.A. Fiechter, A. and Reiser, J. 1994. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* 269:19787-19795.
- (42) Burger, M.M. Glaser, L. and Burton, R.M. 1963. The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 238:2595-2602.
- (43) Burger, M.M. Glaser, L. and Burton, R.M. 1966. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol.* 8:441-445.
- (44) Déziel, E. Lépine, F. Milot, S. and Villemur, R. 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.-UK.* 149:2005-2013.
- (45) Cabrera-Valladares, N. Richardson, A.P. Olvera, C. Treviño, L.G. Déziel, E. Lépine, F. and Soberón-Chávez, G. 2006. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:187-194.
- (46) Bernd, H.A. Rehm, A. Krüger, N. and Steinbüchel, A. 1998. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 272:24044-24051.

- (47) Fiedler, S. Steinbüchel, A. Brend, H. and Rehm, A. 2000. PhaG-mediated synthesis of poly(3-hidroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. Microbiol. 66:2117-2124.
- (48) Jarvis, F.G. and Johnson, M.J. 1949. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. 71: 4124-4126.
- (49) Collier, D.N. Anderson, L. McKnight, S.L. Noah, T.L. Knowles, M. Boucher, R. Schwab, U. Gillian, P. and Pesci, E.C. 2002. A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. FEMS. Microbiol. Lett. 215:41– 46.
- (50) Calfee, M.W. Coleman, J.P. and Pesci, E.C. 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:11637–11663.
- (51) D'Argenio, D.A. Calfee, M.W. Rainey, P.B. and Pesci, E.C. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants, J. Bacteriol. (23) 184:6481– 6489.
- (52) Ochsner, U.A. Koch, A.K. Fiechter, A. and Reiser, J. 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 176:2044–2054.
- (53) Ochsner, U.A. and Reiser, J. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6424–6428.
- (54) Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:22–32.
- (55) Déziel, E. Lépine, F. Milot, S. and Villemur, R. 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochim. Biophys. Acta. 1485:145–152.
- (56) Nitschke, M. Costa, S.G.V.A.O. and Contiero, J. 2005. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. Biotechnol. 21:1593-1600.
- (57) Chayabutra, C. Wu, J. and Ju, L.K. 2001. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrate. Biotechnol. Bioeng. 72:25-33.
- (58) Guerra-Santos, L.H. Kapelli, O. and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:443-448.
- (59) Sylđatk, C. Lang, S. Matulovic, U. Wagner, F. 1985. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas species* DSM 2874. Z. Naturforsch. 40c:61-67.
- (60) Hommel, R.F. and Ratledge, C. 1993. Biosurfactants: Production, properties, applications. Surfactant Series, N. Kosaric, ed. Marcel Dekker, New York. 48:3-63
- (61) Rosenberg, E. 1986. Microbial surfactants. CRC. Crit. Rev. Biotechnol. 3:109-132.
- (62) Miller, R. M. 1995. Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. Bioremediation-Science & Applications. H. Skipper and R. Turco, eds. Soil Science Society of America, Madison, WI. 33-54.
- (63) Essar, D.W. Eberly, L. Hadero, A. and Crawford, I.P. 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. J. of Bacteriol. (2) 172:884-900.
- (64) Canaday, C.H. Wyatt, J.E., and Mullins, J.A. 1991. Resistance in broccoli to bacterial soft rot caused by *Pseudomonas marginalis* and fluorescent *Pseudomonas* species. Plant Dis. 75:715-720.
- (65) Hildebrand, P.D. 1989. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. Can. J. Plant Pathol. 11:205-214.
- (66) Rendell, N.B. Taylor, G.W. Somerville, M. Todd, H. Wilson, T. and Cole, P.J. 1990. Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids. Biochim. Biophys. Acta 1045:189-193.
- (67) Bunster, L. Fokkema, N. J. and Schippers, B. 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas spp.* on leaf wettability. Appl. Environ. Microbiol. 55:1340-1345.
- (68) Herman, D.C. Artiola, J.F. and Miller, R.M. 1995. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. Environ. Sci. Technol. 29:2280-2285.
- (69) Miller, R.M. 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. Environ. Health Perspec. (Suppl. 1) 103:59-62.
- (70) Robert, M. Mercade, M.E. Bosch, M.P. Parra, J.L. Espuny, M.J. Manresa, M.A. and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. Biotechnol. Lett. 11:871–874.
- (71) Hisatsuka, K. Nakahara, T. Sano, N. and Yamada, K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations. Agric. Biol. Chem. 35:686–692.
- (72) Parra, J.L. Guinea, J. Manresa, M.A. Robert, M. Mercade, M.E. Comelles, F. and Bosch. M.P. 1989. Chemical characterization and physicochemical behaviour of biosurfactants. J. Am. Oil Chem. Soc. 66:141–145.

- (73) Lang, S. and Wagner, F. 1987. Structure and properties of biosurfactants. N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed.). *Biosurfactants and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 21–47.
- (74) Rapp, P. Bock, H. Wray, V. and Wagner, F. 1979. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *J. Gen. Microbiol.* 115:491–503.
- (75) Margaritis, A. Kennedy, K. and Zajic, J.E. 1980. Application of an air lift fermenter in the production of biosurfactants. *Dev. Ind. Microbiol.* 21:285–294.
- (76) Margaritis, A. Zajic, J.E. and Gerson, D.F. 1979. Production and surface active properties of microbial surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* 21:1151–1162.
- (77) Cooper, D.G. Liss, S.N. Longay, R. and Zajic, J.E. 1989. Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. *J. Ferment. Technol.* 59:97–101.
- (78) Gobbert, U. Lang, S. and Wagner, F. 1984. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 6:225–230.
- (79) Hommel, R.K. Stuver, O. Stuber, W. Haferburg, D. and Kleber, H.P. 1987. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:199–205.
- (80) Tulloch, P. Hill, A. and Spencer. J.F.T. 1967. A new type of macrocyclic lactone from *Torulopsis apicola*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1967:584–586.
- (81) Cooper, D.G. and Paddock, D.A. 1983. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1426–1429.
- (82) Boothroyd, B. Thorn, J.A. and Haskins, R.H. 1956. Biochemistry of the ustilaginales. XII. Characterization of extracellular glycolipids produced by *Ustilago sp.* *Can. J. Biochem. Physiol.* 34:10–14.
- (83) Sylđatk, C. Lang, S. and Wagner, F. 1985. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas sp.* DSM 2874 grown on n-alkanes. *Z. Naturforsch.* 40c:51–60.
- (84) Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. and Mol. Biol.* (1) 61:47–64.
- (85) Leisinger, T. and Margraff, R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiol. Rev.* (3) 4:422–442.
- (86) Sambrook, J. Fritsch, E.F. Maniatis, T. 1980. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (87) Chandrasekaran, E.V. Bemiller, J.N. 1980. Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* 8:89–96.
- (88) Campos-García, J. Caro, A.D. Nájera, R. Miller-Maier, R.M. Al-Tahhan, R.A. and Soberón-Chávez, G. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* 180:4442–4451.
- (89) Diggle, S.P. Winzer, K. Chhabra, S.R. Worrall, K. Cámara, M. Williams, P. 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* 50:29–43.
- (90) Stanghellini, M.E. and Miller, R.M. 1997. Biosurfactants their identity and potencial efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Am. Phytopathol. Soc.* (1) 81:4–12.
- (91) Xiao, G. Déziel. E. He, J. Lépine, F. Lesic, B. Castonguay, M.H. Milot, S. Tampakaki, A.P. Stachel, S.E. and Rahme, L.G. 2006. MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol. Microbiol.* (6) 62:1689–1699.
- (92) Soberón-Chávez, G. Aguirre-Ramírez, M. Sánchez, R. 2005. The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is not only involved in rhamnolipid, but also in polyhydroxyalkanoate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:675–677.
- (93) Soberón-Chávez, G. Sánchez, R. Treviño-Quintanilla, L.G. and Cabrera, N. 2003, The *Pseudomonas aeruginosa* rhamnosyltransferase 1 (RhlAB) is responsible for the synthesis of the fatty-acid dimer of rhamnolipids. *FEMS. Microbiol. Lett. Manuscrito en preparación.*
- (94) Law, J.H. and Slepecky, R.A. 1961. Assay of poly-13-hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82:33–36.
- (95) Martínez, P. Guzmán, J. and Espín, G. 1997. A mutation impairing alginate production increased accumulation of poly-b-hydroxybutyrate in *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnol. Lett.* (9) 19:909–912.
- (96) Law, J.H. and Slepecky, R.A. 1960. A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Anal. Chem.* 32:1697–1699.
- (97) Timm, A. Steinbüchel, A. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3360–3367.

- (98) Timm, A. Steinbüchel, A. 1992. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoates acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Eur. J. Biochem. 209: 15-30.
- (99) Hancock, R.E.W. Carey, A.M. 1979. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. J. Bacteriol. 140:902-910.
- (100) Pearson, J.P. Pesci, E.C. and Iglewski, B.H. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol. 179:5756-5767.
- (101) Pesci, E.C. Pearson, J.P. Seed, P.C. and Iglewski, B.H. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 179:3127-3132.
- (102) Köhler, T. Curty, L.K. Barja, F. Van Delden, C. and Pechère, J.-C. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol. 182:5990-5996.
- (103) Lépine, F. Déziel, E. Milot, S. and Villemur, R. 2002. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. J. Mass Spectrom. 37:41-46.
- (104) Rehm, B.H.A. Mitsky, T.A. and Steinbüchel, A. 2001. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *Pseudomonads*: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 67:3102-3109.
- (105) Morrissey, J.P. Cullinane, M. Abbas, A. Mark, G.L. and O'gara, F. 2004. Biosynthesis and regulation of anti-fungal metabolites by *Pseudomonads*. Plenum Publishers. 3:637-670.
- (106) Weinel, C. Nelson, K.E. and Tümmler, B. 2002. Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. Environ. Microbiol. (4) 12:809-818.
- (107) Chakrabarty, A.M. Mylroie, J.R. Friello, D.A. and Vacca, J.G. 1975. Transformation of *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* with plasmid-linked drug-resistance factor DNA. Proc. Nat. (9) 72:3647-3651.
- (108) Cho, J.H. Kim, E.K. and So, J.S. 1995. Improved transformation of *Pseudomonas putida* KT2440 by electroporation. Biotechnol. Tech. 9:41-44.
- (109) Gallagher, L.A. McKnight, S.L. Kuznetsova, M.S. Pesci, E.C. and Manoil, C. 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Bacteriol. (23) 184:6472-6480.
- (110) Croft, L. Beatson, S.A. Whitchurch, C.B. Huang, B. Blakeley, R.L. and Mattick, J.S. 2000. An interactive webbased *Pseudomonas aeruginosa* genome database: discovery of new genes, pathways and structures. Microbiol. 146:2351-2364.
- (111) Salzberg, S.L. Delcher, A.L. Kasif, S. and White, O. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. Nucleic Acids Res. 26:544-548.
- (112) Timmis, K.N. 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. Environ. Microbiol. 4:779-781.
- (113) Dejonghe, W. Boon, N. Seghers, D. Top, E.M. and Verstraete, W. 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. Environ. Microbiol. 3:649-657.
- (114) Schmid, A. Dordick, J.S. Hauer, B. Kiener, A. Wubbolts, M. and Witholt, B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature. 409:258-268.
- (115) Walsh, U.F. Morrissey, J.P. and O'Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Curr. Opin. Biotechnol. 12:289-295.
- (116) Bagdasarian, M. Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. Gene. 16: 237-247.
- (117) Regenhardt, D. Heuer, H. Heim, S. Fernandez, D.U. Strömpl, C. Moore, E.R.B. and Timmis, K.N. 2002. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. Environ. Microbiol. 4:912-915.
- (118) Kojima, Y. Fujisawa, H. Nakazawa, A. Nakazawa, T. Kanetsuna, F. and Taniuchi, H. 1967. Studies on pyrocatechase. I. Purification and spectral properties. J. Biol. Chem. 242:3270-3278.
- (119) Williams, P.A. and Murray, K. 1974. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. J. Bacteriol. 120:416-423.
- (120) Nakazawa, T. 2002. Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. Environ. Microbiol. 4:782-786.
- (121) Federal Register. 1982. Certified host-vector systems. p. 17197.
- (122) Ramos, J.L. Wasserfallen, A. Rose, K. and Timmis, K.N. 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. Science. 235: 593-596.
- (123) Espinosa-Urgel, M. Kolter, R. and Ramos, J.L. 2002. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. Microbiol. 148:341-343.
- (124) Bodey, G.P. Bolivar, R. Fainstein, V. and Jadeja, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 5:279-313.

- (125) García, B. Olivera, E.R. Minambres, B. Fernandez-Valverde, M. Canedo, L.M. and Prieto, M.A. 1999. Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-coa catabolon. *J. Biol. Chem.* 274:29228–29241.
- (126) Gorenflo, V. Schmack, G. Vogel, R. and Steinbüchel, A. 2001. Development of a process for the biotechnological large-scale production of 4-Hydroxyvalerate-containing polyesters and characterization of their physical and mechanical properties. *Biomacromolecules.* 2:45–57.
- (127) Luengo, J.M. Garcia, J.L. and Olivera, E.R. 2001. The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* 39:1434–1442.
- (128) Kesting, W. Tummuscheit, M. Schacht, H. and Schollmeyer, E. 1996. Ecological washing of textiles with microbial surfactants. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* 101:125-130.
- (129) Raiders, R.A. Knapp, R.M. and McInerney, M.J. 1989. Microbial selective plugging and enhanced oil recovery. *J. Ind. Microbiol.* 4:215-230.
- (130) Banat, I.M. 1995. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal ± state of the art (review). *Acta Biotechnol.* 15:251-267.
- (131) Klekner, V. and Kosaric, N. 1993. Biosurfactants for cosmetics. In: Kosaric N (ed) *Biosurfactants.* (Surfactant Science Series, Dekker, New York, Basel Hong Kong, (48) 373-384.
- (132) Lang, S. and Wagner, F. 1993b. Biological activities of biosurfactants. In: Kosaric N (ed) *Biosurfactants.* (Surfactant Science Series) Dekker, New York Basel Hong Kong, (48)251-268.
- (133) Ishigami, Y. Gama, Y. Uji, Y. Masui, K. and Shibayama, Y. 1988. Japanese Patent Kokai. 63-77, 535.
- (134) Duxbury, T. 1981. Toxicity of heavy metals to soil bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 11:217-220.
- (135) <http://www.qb.fcen.uba.ar/genbac/>
- (136) Madison, L.L. and Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* (1) 63:21–53.
- (137) Dawes, E.A. and Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 10:135–266.
- (138) Almeida, A. Ruiz, J.A. López, N.I. y Pettinari, M.J. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Química Viva. Año 3* (3) 122-133.
- (139) Lemoigne, M. 1926. Produits de déshydratation et de polymerisation de l'acide b -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8:770-782.
- (140) Doi, Y. 1990. *Microbial polyesters.* VCH. Publishers, Inc. Yokohama, Japan.
- (141) Williams, S. F. and Peoples, O.P. 1996. Biodegradable plastics from plants. *Chemtech.* 26:38–44.
- (142) Jendrossek, D. Schirmer, A. and Schlegel, H.G. 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:451–463.
- (143) Hoffmann, N. Amara, A.A. Beermann, B.B. Qi, Q. Hinz, H.J. and Rehm, B.H.A. 2002. Biochemical characterization of the *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid de novo biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277:42926–42936.
- (144) Mavrodi, D.V. Blankenfeldt, W. and Thomashow, L.S. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:417-445.
- (145) Byng, G.S. Eustice, D.C. and Jensen, R. 1979. Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 138:846–52.
- (146) Hassan, H.M. and Fridovich, I. 1980. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J. Bacteriol.* 141:156–63.
- (147) Norman, R.S. Moeller, P. McDonald, T.J. and Morris, P.J. 2004. Effect of pyocyanin on a crude oil-degrading microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4004–11.
- (148) Mavrodi, D. V. Bonsall, R.F. Delaney, S.M. Soule, M.J. Phillips, G. and Thomashow, L.S. 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. of Bacteriol.* (21) 183:6454–6465.
- (149) Ankenbauer, R.G. and Cox, C.D. 1988. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants requiring salicylic acid for pyochelin biosynthesis. *J. of Bacteriol.* (11) 170:5364-5367.
- (150) Meyer, J.M. Geoffroy, V.A. Baida, N. Gardan, L. IZARD, D. Lemanceau, P. Achouak, W. and Palleroni, N.J. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *Appl. and Environ. Microbiol.* (6) 68:2745–2753.
- (151) Lau, G.W. Hassett, D.J. Ran, H. and Kong, F. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *TRENDS. in Mol. Med.* (12) 10:599-605.
- (152) Raisman, S.J. 2000. Pigmentos. México. <http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro9.htm>., 4 págs.
- (153) Laboratorio Británico. Nuevos productos. México. http://www.britanialab.com.ar/k11_07.html. 70 págs.

- (154) Davis, B.D. Dulbecco, R. Eisen, H.N. Ginsberg, H.S. Wood, W.B. and McCarty, M. 1978. Tratado de microbiología. Caps. 2,13,29,46. ed. 2ª. Ed. Salvat. Barcelona (España). 34-35, 328-329, 778, 781-785, 797-801, 804-810, 1131-1134.
- (155) Burton, M.O. Campbell, J.J.R. and Eagles, B.A. 1948. The mineral requirements for pyocyanin production. Can. J. of Res. 26:15-.
- (156) Longley, R.P. Halliwell, J.E. Campbell, J.J.R. and Indlew, W.M. 1972. The brachpoin of pyocyanine biosynthesis. Can. J. of Microbiol. (9) 18: 1357-1363.
- (157) Dietrich, L.E.P. Price-Whelan, A. Petersen, A. Whiteley, M. and Newman, D.K. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. (5) 61:1308–1321.
- (158) Byng, G.S. and Turner, J.M. 1977. Incorporation of [¹⁴C]shkimate into phenazines and their further metabolism by *Pseudomonas phenazinium*. Biochem. J. 164:139-145.
- (159) Jensen, V. Löns, D Zaoui, C. Bredenbruch, F. Meissner, A. Dieterich, G. Münch, R. and Häussler, S. 2006. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. J. of Bacteriol. (24) 188:8601–8606.
- (160) Valappil, S.P. Boccaccini, A.R. Bucke, C. and Roy, I. 2007. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. Antonie van Leeuwenhoek. 91:1–17.



ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium that has different potential biotechnological applications. Among these, is the production of the biosurfactants rhamnolipids and the 3-hydroxyl fatty acids polymer polyhydroxyalkanoates (PHA) that can be used to produce biodegradable plastics.

There are two types of rhamnolipids, monorhamnolipids that contains one rhamnose molecule linked to a fatty acid dimer and di-rhamnolipids that contains an additional rhamnose molecule. Mono-rhamnolipid is produced by rhamnosyltransferase RhlB which catalyses the transfer of one rhamnose molecule from dTDP-L-rhamnose to a dimer of 3-hydroxy fatty acids (HAA) that are produced by RhlA. Di-rhamnolipids, in turn are produced by rhamnosyltransferase RhlC by the transfer of a second rhamnose molecule from dTDP-L-rhamnose to mono-rhamnolipid. RhlA has been shown to use ACP-fatty acids produced by de novo synthesis, but there are some data that suggest that this enzyme is also able to use CoA linked fatty acids as precursors.

PHA is produced as a carbon storage compound and is produced by PHA-synthase PhaC. This enzyme produces the polymer using CoA-linked 3-hydroxyfatty acids as precursors. When cells are cultivated using glucose or another sugar as carbon source, the precursors of PHA are produced by PhaG, which catalyses the transfer of fatty acids produced by the novo synthesis, which are linked to ACP, to CoA- linked fatty acids.

The aim of this work is the study of RhlA role in the synthesis of PHA, determining whether the fatty acid dimer produced by this enzyme can be used for PHA synthesis,

which would imply that it catalysis the transfer of ACP- to CoA- linked fatty acids, and whether the presence of these two biosynthetic pathways in the same bacterium, results in some type of competition for common substrates i. e. fatty acid molecules.

We found that RhIA* is indeed able to produced CoA-fatty acid dimmers, as judge by the complementation for PHA production of a *Pseudomonas putida phaG* mutant. It was also apparent that RhIA* overproduction in the *Pseudomonas aeruginosa* background results in a higher production of PHA, when rhamnolipids biosynthesis was blocked (in the *rhlB* mutant, for example), and in an over-production of rhamnolipids with a decreased PHA synthesis in the wild type background. These results confirm the hypothesis that RhIA has an important role in modulating the metabolic flux between rhamnolipids and PHA biosynthetic pathways.

Additionally we noticed that RhIA* overproduction correlates with a higher production of pyocyanin a blue pigments phenazine that is a *Pseudomonas aeruginosa* virulence associated trait. We tried to correlate pyocyanin hyperproduction with a higher level of the *Pseudomonas* quinolone signal which has been reported to have a fatty acid moiety as precursor, but we could not demonstrate that this correlation exists.

All the above mentioned results were done with a cloned *rhlA* gene in plasmid pUCP18, rendering plasmid pAPR1. During the course of this investigation it was determined that this gene contains a miss-sense mutation and thus we call its product RhIA*. The *rhlA* gene with no mutations was cloned in the same vector and the experiments to determine the role of RhIA in rhamnolipids and PHA metabolism remain to be done.

* This symbol (*) is for the designation of the *rhlA** gene cloned in the pAPR1 vector, which express the RhIA* protein, which have to change in one conserved amino acid.



Title: *Pseudomonas aeruginosa* RhlA is involved in the production of the secondary metabolites rhamnolipids, polyhydroxyalkanoates (PHA) and pyocyanin.

Authors: Gloria Soberón-Chávez^{1*}, Luz María Delgado¹, Marisela Aguirre-Ramírez¹ and Anne-Pascale Richardson².

Addresses: ¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ²INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Qc. Canada.

*Corresponding author mailing address; Apdo. Postal 70228 México, D. F. 04510. Tel.: (52-55) 56223870. Fax: (52-55) 56223855. E-mail: gloria@biomedicas.unam.mx

Running title: RhlA is a key enzyme in *P. aeruginosa* secondary metabolism.

Key words: rhamnolipids, polyhydroxyalkanoates (PHA), pyocyanin.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a γ -proteobacteria that produces several compounds with potential biotechnological applications such as rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates (PHA). This bacterium is also an opportunistic pathogen that represents an important health problem. Several *P. aeruginosa* virulence-associated traits are regulated by the quorum-sensing response (QS). One of the signal molecules involved in QS is 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)quinolone, called *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). RhIA is the enzyme responsible for the synthesis of 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the direct precursor of rhamnolipids. Here we show that at least part of the HAAs produced by RhIA are CoA-linked and thus are directly used by the PHA synthase (PhaC) that uses CoA-linked fatty acids as substrates. We also present evidence suggesting that the product of RhIA can be used as substrate for the production of pyocyanin, although the direct enzymatic steps are not known yet. The enhanced pyocyanin production due to RhIA hyperproduction is not strictly correlated with an increased production of the quorum sensing signal PQS. Thus RhIA is a key enzyme in the synthesis of several *P. aeruginosa* secondary metabolites.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a γ -proteobacteria that can be isolated from different environments (Hardalo and Edberg, 1997), but is also an opportunistic human pathogen causing serious nosocomial infections (Lyzack *et al.*, 2000). The virulence of this bacterium correlates with the secretion of numerous hydrolytic enzymes and toxic compounds, including rhamnolipids (rhls) which are tensio-active glycolipids (Zulianello *et al.*, 2006). Several of the compounds involved in bacterial pathogenesis are coordinately expressed at specific bacterial densities by a complex genetic regulatory network called quorum-sensing (QS) (van Delden and Iglewski, 1998; Smith and Iglewski, 2003; Soberón-Chávez *et al.*, 2005a).

2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)quinolone (PQS) is a key QS signal molecule that has a central role in the expression of many virulence-associated traits (Déziel *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2006a) such as pyocyanin (Gallagher *et al.*, 2002) and the PA-I lectin encoded by *lecA* (Diggle *et al.*, 2003). The synthesis of PQS proceeds through the condensation of a 3-ketodecanoyl precursor with anthranilic acid by the activity of the enzymes encoded by the *pqsABCD* operon yielding 2-heptyl-4(1H)-quinolone (HHQ) and its conversion to PQS by the enzyme PqsH (Fig. 1) (Déziel *et al.*, 2004; Bredenbruch *et al.*, 2005). PQS plays a role in the activation of gene expression by directly interacting (Wade *et al.*, 2005) with the LysR-transcriptional regulator MvfR (or PqsR) (Déziel *et al.*, 2005). HHQ the immediate precursor of PQS has been shown to be an inter-cell signalling molecule (Déziel *et al.*, 2004) and recently this compound was shown to interact with MvfR (Xiao *et al.*, 2006). Interestingly the activation of the genes encoding for the enzymes involved in pyocyanin production that are encoded in an operon (*phzA-G*) responds only to PQS concentration, while genes encoding for other virulence factors such as PA-I lectin (*lecA*) are activated both by PQS and HHQ (Xiao *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* produces mainly two types of rhls, mono-rhamnolipids constituted by one rhamnose moiety and a dimer of 3-hydroxyfatty acids, and di-rhamnolipids containing two rhamnose moieties

attached to the fatty acid dimer. The rhls biosynthetic pathway (Fig. 1) has been reviewed recently (Soberón-Chávez *et al.*, 2005c) and will only be described briefly. Rhls are produced by three sequential reactions (Fig. 1). RhIA is involved in the synthesis of the fatty acid dimer moiety of rhls and free 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) (Déziel *et al.*, 2003; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). The next reaction in rhamnolipid (rhl) synthesis is catalyzed by the RhIB rhamnosyltransferase and uses deoxythymidine diphosphate (dTDP)-L-rhamnose and a HAA as precursors, yielding mono-rhamnolipids (Ochsner *et al.*, 1994). Mono-rhamnolipids are in turn the substrate, together with dTDP-L-rhamnose, of RhIC to produce di-rhamnolipids (Rahim *et al.* 2001). RhIA specificity determines the profile of the fatty acid moiety of rhls and HAAs. The most abundant HAA and rhl fatty acid dimers congener, produced by RhIA activity are decanoic acid dimers (C₁₀-C₁₀) (Lépine *et al.*, 2002; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). RhIA is able to drain ACP-fatty acids from *de novo* synthesis pathway to produce HAAs (Fig. 1), but can also use the CoA-linked fatty acids as substrates (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). It is not known whether RhIB uses as substrate the CoA- or ACP-fatty acid dimer for mono-rhamnolipid synthesis, but it is known that its activity is coupled with that of RhIA (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). That is, when the *rhlAB* operon is expressed in *Escherichia coli* and RhIB activity is increased by increasing the availability of its substrate dTDP-L-rhamnose, the production of HAAs by RhIA is also incremented.

Rhls production is regulated by the QS response (Soberón-Chávez *et al.*, 2005a; 2005c) dependent on the transcription activator RhIR and the autoinducer (AI) *N*-butyryl homoserine lactone (C₄-HSL) synthesized by RhII (Pearson *et al.*, 1997), and is only partially affected by the PQS-dependent QS response (Déziel *et al.*, 2005). The genes coding for RhIA and RhIB are arranged as an operon (Ochsner *et al.*, 1994); *rhlC* is the second gene of an unlinked operon, the first gene encoding a protein with unknown function (Rahim *et al.*, 2001).

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are bacterial storage compounds synthesized by the polymerization of 3-hydroxyfatty acids by the polyhydroxyalkanoate synthases (PhaC), using the CoA-linked fatty acids as substrates (Fig. 1) (Timm and Steinbüchel, 1990). When *Pseudomonads* are grown on glucose or gluconate, the enzyme PhaG converts the ACP-fatty acids to their corresponding CoA-linked molecules that can be used by PhaC to synthesise PHA (Rehm *et al.*, 1998; 2001). The synthesis of PHA when *Pseudomonas putida* is grown on gluconate is dependent on the activity of PhaG (Rehm *et al.*, 1998), while *P. aeruginosa phaG* mutants are still able to produce 40% of the PHA made by the wild type strain (Rehm *et al.*, 2001). These results suggest that *P. aeruginosa* contains an enzyme that can partially substitute PhaG activity.

PhaG and RhIA have more than 40% identity in their amino acid sequence and have been proposed to have similar activities (Rehm *et al.*, 1998; Déziel *et al.*, 2003). *P. aeruginosa* mainly produces PHA consisting of medium-chain-length polymers, mainly poly-3-hydroxydecanoate (Timm and Steinbüchel, 1990) which, as mentioned above, is also the most abundant lipid moiety in rhls and HAAs (Lépine *et al.*, 2002; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Rhls and PHA synthesis use 3-hydroxydecanoate as common precursor and a close metabolic relation has been shown to exist between these pathways in *P. aeruginosa* (Rehm *et al.*, 2001). Under some conditions *P. aeruginosa* redirects its carbon flux increasing PHA production and decreasing the synthesis of rhls (Soberón-Chávez *et al.*, 2005b).

Although *P. aeruginosa* constitutes an important medical problem, this bacterium is of biotechnological interest since it produces useful compounds such as rhls and PHA. Rhls have several potential industrial and environmental applications due to their tensio-active properties (Lang and Wullbrandt, 1999; Maier and Soberón-Chávez, 2000; Nitschke *et al.*, 2005). These uses include the production of fine chemicals, surface coatings, use as additives for environmental remediation, and they have even been reported to be useful as a biological control agent (Stanghellini and Miller, 1997).

PHA is of biotechnological importance since it can be used to produce “biodegradable plastics” (Madison and Huisman, 1999).

The aim of this work is to investigate the role of RhlA in *P. aeruginosa* secondary metabolism, determining how is the production of different compounds that have fatty acid precursors, such as rhls and PHA, affected by its activity. We report here that RhlA has a central role in the production of both compounds that are of biotechnological interest. We also show that RhlA activity is involved in the production of pyocyanin, an important trait for the virulence of this bacterium (Rahme *et al.*, 1995), and can influence the production of PQS and HHQ. The results presented here highlight the importance of understanding not only the genetic regulation, but also the metabolic interrelation between different compounds in order to establish a rational strategy for the overproduction of compounds of biotechnological interest and the reduction of the expression of virulence-associated traits.

Results

RhlA synthesises CoA-fatty acid derivatives. To study the role of RhlA activity on the production of PHA, plasmid pAPR1 coding for RhlA-His₁₀ was transferred to different *P. aeruginosa* and *P. putida* strains.

We determined that RhlA-His₁₀ encoded by this plasmid is expressed in these bacteria by immunoblotting using an anti-polyhistidine antibody to detect the protein (Fig. 2).

To determine whether the RhlA product is a CoA fatty acid derivative, presumably CoA-HAAs, we determined whether plasmid pAPR1 complemented a *P. putida* KT2440 *phaG* mutant (Table 1) for PHA synthesis. Figure 3 shows that RhlA-His₁₀ expression from plasmid pAPR1 not only enables *P. putida* KT2440 *phaG* mutant to produce PHA to a similar extent as the wild type KT2440 strain, but also increases PHA production in the wild type bacterium. These results show that, as hypothesized

previously (Rehm *et al.*, 1998; Déziel *et al.*, 2003), at least a fraction of the HAAs produced by RhIA are linked to CoA.

Effect of rhIs synthesis blockage on the synthesis of PHA and pyocyanin. We hypothesized that if RhIA is contributing to PHA synthesis in *P. aeruginosa* by supplying PhaC substrates, the production of this polymer would be considerably increased in a *rhlB* mutant compared to the wild type strain. Table 2 shows this to be the case, thus supporting our hypothesis.

During the development of these experiments we noticed that PAO1-*rhlB* mutant produced high levels of the blue pigment pyocyanin (Table 2). A straight correlation between PQS production and pyocyanin synthesis has been reported (Gallagher *et al.*, 2002; Bredenbruch *et al.*, 2005).

PQS and HHQ synthesis comprises a fatty acid precursor that has been proposed to be common to rhIs synthesis (Bredenbruch *et al.*, 2005). Thus we hypothesized that the enhanced availability of HAAs in the PAO1-*rhlB* mutant, might cause an increased concentration of this QS signal, as PHA synthesis is, causing the increased pyocyanin synthesis.

To have a qualitative estimate of the relative amount of PQS and HHQ produced by the different strains studied we use a bioassay based on the PQS-dependent activation of a *lecA::lux* fusion in a *P. aeruginosa pqsA* deletion-mutant background (see Experimental Procedures section, Fig. 4A). The relative abundance of these compounds was also estimated by TLC (see Experimental Procedures section, Fig. 4B).

Using these techniques we found that in contradiction with our hypothesis, PAO1-*rhlB* do not produce a higher concentration of HHQ + PQS as compared to the wild type strain (Fig. 4, lane 8). This result suggests that RhIA activity is directly contributing to the synthesis of pyocyanin and does not affect the synthesis of the QS signals PQS and HHQ.

Effect of the over-expression of RhIA on the synthesis rhIs, PHA and pyocyanin. To determine the role of RhIA activity on *P. aeruginosa* production of rhIs, PHA and pyocyanin we transferred plasmid

pAPR1 to the wild type PAO1 strain and its *rhlA* and *rhlB* mutant derivatives. Table 2 shows that in the PAO1 background the overexpression of RhlA-His₁₀ causes a marked increment of rhIs production, while PHA synthesis is considerably decreased and pyocyanin is not significantly affected. In contrast RhlA-His₁₀ overexpression in the *rhlA* PAO1 derived mutant, which is unable to produce rhIs, caused an increased production of the polymer PHA and of pyocyanin (Table 2).

In the case of the PAO1 derived *rhlB* mutant the overexpression of RhlA-His₁₀ has no significant effect on the expression of PHA and pyocyanin (Table 2). Interestingly, however, RhlA-His₁₀ expression in PAO-*rhlB* caused an increased PQS production (Fig. 4, lane 12).

Discussion

Here we show that RhlA catalyze the synthesis of a CoA-linked fatty acid derivative, presumably CoA-HAAs, that can be used as PhaC substrate for the synthesis of PHA (Fig. 3). Thus we propose that when *P. aeruginosa* is growing with glucose or gluconate as carbon source it can use two pathways for the synthesis of the carbon-storage polymer PHA, the RhlA- and the PhaG- dependent pathways. The presence of these two metabolic routes explains the fact that when grown with gluconate as carbon source *P. aeruginosa phaG* mutants are able to produce 40% PHA and that an *rhlA* mutant has a reduced PHA production under the same conditions (Rehm *et al.*, 2001).

There is published evidence showing that RhlA directly produces the HAAs that are secreted from the cell (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006) and we have shown here that it can also produce CoA-HAAs. We cannot rule out that, together with these two products (HAAs and CoA-HAAs), RhlA produces ACP-HAAs. It has been determined that the ACP-CoA transacylase reaction catalyzed by PhaG, the paralog of RhlA, is reversible (Rehm *et al.*, 1998), so it is possible that both activated HAAs could be produce by RhlA.

The rhl fatty acid dimer moiety is also the product of RhlA activity (Fig. 1) (Déziel *et al.*, 2003; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006), but RhlB substrate specificity with respect to the activated HAAs, has not been determined yet.

The results presented here show that RhlA overexpression in the absence of RhlB, such as that presented in PAO1-*rhlA*/pAPR1 [PAO1-*rhlA* mutant is unable to express both RhlA and RhlB due to polarity of the mutation (Ochsner *et al.*, 1994)] or PAO1-*rhlB*, causes an increment of PHA and pyocyanin production (Table 2). These data suggest that the product of RhlA catalysis can be used as substrate for the synthesis of these compounds when rhls biosynthesis is blocked by the lack of RhlB activity (Fig. 1). The increased pyocyanin production of these strains do not correlate with an enhanced PQS and HHQ production (Fig. 4). The synthesis of pyocyanin of PAO1-*rhlB* is not further increased by the overexpression of RhlA by the introduction of plasmid pAPR1, even though PQS production is considerably increased (Fig. 4).

It has been reported that an *rhlC* mutant overproduces pyocyanin (Rahim *et al.*, 2001). It is very much likely, in the light of the results presented here, that the hyperpigmentation of this mutant is due to the blockage of di-rhamnolipid synthesis causing accumulation of RhlA products, but this hypothesis remains to be experimentally validated.

Pyocyanin biosynthetic pathway is very well documented (Mavrodi *et al.*, 2006). It is known to branch from the central metabolic pathways at the production of chorismate (Longley *et al.*, 1972) which is the substrate of the Phz enzymes (A-G, M and S) that synthesize pyocyanin (Fig. 1) (Mavrodi *et al.*, 2006). Hydroxyalkylquinolines (HAQs), such as HHQ and PQS, are synthesized from chorismate by the activity of PhnA and PhnB anthranilate synthase (Essar *et al.*, 1990) and the Pqs enzymes (A-D and H in the case of PQS) (Fig. 1). There is no direct metabolic link between HAAs synthesis and the synthesis of chorismate (Fig. 1), so it is possible that the effect of RhlA activity on the production of pyocyanin is due to a change in the cell carbon flow that results in an enhanced availability of

precursors for the synthesis secondary metabolites. It would be interesting to determine whether the increased pyocyanin production of *P. aeruginosa* derivatives that have an increased RhlA activity in the absence of RhlB, is accompanied by an increased expression of the *phz* genes, or is only due to a metabolic effect.

Recently it was shown that pyocyanin is a QS signal for itself (Dietrich *et al.*, 2006), so it will be interesting to determine whether the expression of other virulence associated traits is increased in the strains with a high pyocyanin production described in this work.

On the other hand, RhlA overexpression in the presence of RhlB results in the overproduction of rhls and in a reduced PHA production (PAO1/pAPR1, Table 2). This is much likely due to the fact that RhlA and RhlB activities are coupled for rhls synthesis (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006), so this rhamnosyltransferase preferentially use HAAs as substrates for rhl synthesis, while these compounds become limiting for PHA synthesis.

It was reported that the activity of the NADPH-dependent ketoacyl reductase RhlG is essential for *P. aeruginosa* rhls production and affect PHA synthesis (Campos-García *et al.*, 1998; Rehm *et al.*, 2001). On the other hand, RhlG activity was also implicated in the production of PQS fatty acid precursors (Bredenbruch *et al.*, 2005). This protein was postulated to drain fatty acid derivatives from the *de novo* fatty acid synthesis cycle for the production of these surfactants (Campos-García *et al.*, 1998; Bredenbruch *et al.*, 2005). However, it was reported recently that RhlG has a very low affinity for the ACP participating in *de novo* fatty acid synthesis (Miller *et al.*, 2006), so it cannot drain fatty acid intermediaries for the synthesis of these *P. aeruginosa* secondary metabolites. The precise role of RhlG in rhl synthesis remains to be determined. However, RhlA is able to drain fatty acid intermediates from *de novo* synthesis (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006) and affects the synthesis of these compounds (Table 2). This ability to drain fatty acids from *de novo* synthesis might explain the central role of this enzyme in redirecting the carbon flux for the production of secondary metabolites.

The precise understanding of *RhlA* role in the synthesis of *P. aeruginosa* secondary metabolites might enable the development of a metabolic engineering strategy to construct strains with increased synthesis of the biotechnological important compounds rhlA and PHA and a reduced production of virulence associated traits, such as pyocyanin.

Experimental Procedures

Microbiological techniques Strains and plasmid used in this work are shown on Table 1. All strains were grown on PPGAS medium (Zhang and Miller, 1998) for 24 hours. *P. aeruginosa* strains were grown at 37 °C and the *P. putida* ones at 30 °C. The antibiotic concentrations used were (in µg/ml): ampicillin (Ap) 200, carbenicillin (Cb) 300 and gentamycin (Gm) 150.

Analytical methods Total rhamnolipids concentration was determined from cell culture supernatants by measuring rhamnose concentration after acid hydrolysis using the orcinol method (Chandrasekaran and Bemiller, 1980). PHA was measured as described previously (Campos-García et al, 1998).

The concentration of Hydroxyalkylquinolines (HAQs) by TLC was done as reported by Diggle *et al.*, 2003. Briefly, ethyl acetate extracts of *P. aeruginosa* culture supernatants were spotted onto a normal phase silica TLC plate which was soaked for 30 min in 5% KH₂PO₄ and activated at 100°C for 1 h. HAQs were separated using a dichlorometane:methanol (95:5) system. The plate was visualized using a UV transilluminator and photographed.

Construction of plasmid pAPR1. Standard DNA manipulation techniques were used for pAPR1 construction (Sambrook *et al.*, 1989). The DNA segment corresponding to *rhlA* coding sequence was amplified by PCR from plasmid pUO58 (Ochsner and Reiser, 1995) using the following oligonucleotides AF1: 5'-GATGAATTCGCGATAGCTGTTTGCCTGTTCG-3' and AR: 5'-CGAAAGCTT

TCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATGACGACCTTCGATGGC

GTAGCCGATGGCCATCTC-3'. AR contains a sequence coding for ten Histidine residues and a Factor Xa cleavage site on its 5' end. The PCR product was digested with *EcoR*I and *Hind*III endonucleases, and cloned on plasmid pUCP18 (West *et al.*, 1994), digested with the same enzymes, under the control of the *lac* promoter.

Immunoblotting techniques. Bacterial cultures were grown until they reached an optical density at 600 nm of 1.5. The cells were collected and lysed by boiling for 5 min in loading buffer (Sambrook *et al.*, 1989). Equal amounts of protein from each lysate were separated in a 14% SDS/PAGE. The proteins were transferred by electroblotting from the gel to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham Life Science Corp.). RhlA-His₁₀ was detected by using an anti-polyhistidine specific antibody according to the manufacturer's instructions ().

Bioassay for detection of PQS and HHQ. The qualitative measurement of the 4-alkyl-quinolones PQS and HHQ was based on the detection by autoradiography of the level of activation of a *lecA-lux* transcriptional fusion (Diggle *et al.*, 2003) on the PAO1 Δ *pqsA* chromosome, using different concentrations of synthetic PQS as internal standard. This strain was devised as a bioreporter for the detection of 2-alkylquinolones (Diggle *et al.*, 2006b), but its construction will be reported elsewhere. Briefly PAO1 *lecA::lux* Δ *pqsA* (Table 1) was grown to 0.6 O.D.₆₀₀ and incubated for 6 hrs at 37⁰C in microtiter plates containing ethyl-acetate extracts of the culture supernatants of the different strains tested or PQS standards. The activation of the *lecA* fusion was detected by autoradiography (Fig. 4A).

Acknowledgements

We acknowledge the fruitful collaboration in the discussion of this work of Eric Déziel and Francois Lépine. We are grateful to Stephen Diggle, Miguel Cámara and Paul Williams for providing PAO1 *lecA::lux* Δ *pqsA* bioreporter prior to its publication. This research was founded in part by Universidad

Nacional Autónoma de México through grants DGAPA PAPIIT IN203305 and IN200707; and by CONACYT 50201.

References

Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, Morr M, Müller R, Häussler S: Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. J Bacteriol 2005; 187:3630-3635.

Cabrera-Valladares N, Richardson A-P, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F, Soberón-Chávez G: Mono-rhamnolipid and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 173:187-194.

Campos-García J, Caro AD, Nájera R, Miller-Maier RM, Al-Tahhan RA, Soberón-Chávez G: The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. J Bacteriol 1998; 180:4442-4451.

Chandrasekaran EV, Bemiller JN: Constituent analyses of glycosaminoglycans. Methods Carbohydr Chem 1980; 8:89-96.

Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R: Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from growing cultures of *Pseudomonas aeruginosa* 57RP. Biochim Biophys Acta 2000; 1485:145-152.

Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R : *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids) (HAAs), the precursors of rhamnolipids. Microbiol-UK 2003; 149:2005-2013.

Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG, Rahme LG: Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:1339-1344.

Déziel E, Gopalan S, Tompakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G, Rahme LG: The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry

regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 2005; 55:998-1014.

Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK: The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2006; 61:1308-1321.

Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall K, Cámara M, Williams P: The *Pseudomonas aeruginosa* signal overcomes the cell density-dependency of quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 2003; 50:29-43.

Diggle SP, Cornelis PW, Williams P, Cámara M: 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules new perspectives. *Int J Med Microbiol* 2006a; 296:83-91.

Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Cámara M, Williams P: Functional genetic analysis reveals a 2-alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem Biol* 2006b; 13:701-710.

Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford, IP: Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 1990; 172:884-990.

Gallagher LA, McKnight LS, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C: Functions required for extracellular quinolone signalling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2002; 184: 6472-6480.

Hancock, REW, Carey, AM: Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J Bacteriol* 1979; 140:902-910.

Hardalo C, Edberg SC: *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* 1997; 23:47-75.

Lang S, Wullbrandt D: Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 51:22-32.

Lépine F, Déziel E, Milot S, Villemur R : Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Mass Spectr* 2002; 37:41-46.

Longley RP, Halliwell JE, Campbell JJR, Ingledew WM: The branch point of pyocyanine biosynthesis. *Can J Microbiol* 1972; 18:1357-1363.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB: Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* 2000; 2:1051-1060

Madison LL, Huisman GW: Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:21-53.

Maier MR, Soberón-Chávez G: *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54:625-633.

Mavrodi DM, Blankenfeldt W, Thomashow L: Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. Biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol* 2006; 44:417-445.

Miller DJ, Zhang Y-M, Rock CO, White SW: Structure of RhlG an essential β -ketoacyl reductase in the biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2006; 281:18025-18032.

Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J: Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol Prog* 2005; 21:1593-1600.

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

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

Pearson, JP, Pesci EC, Iglewski BH: Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis. *J Bacteriol* 1997; 179:5756-5767.

Rahim R, Ochsner U, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberón-Chávez G: Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 2001; 40:708-718.

Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM: Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 1995; 268:1899-1902.

Rehm BHA, Krüger N, Steinbüchel A: A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *J Biol Chem* 1998; 273:24044-24051.

Rehm BHA, Mitsky TA, Steinbüchel A: Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by Pseudomonads: Establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:3102-3109.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition 1998. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Smith RS, Iglewski, BH: *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:56-60.

Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramírez M, Ordóñez LG: Is *Pseudomonas aeruginosa* only sensing quorum? *Critical Rev Microbiol* 2005a; 31:171-182.

Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramírez M, Sánchez R: The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is not only involved in rhamnolipid, but also in polyhydroxyalkanoate production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005b; 32:675-677.

Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E: Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol 2005c; 68: 718-725.

Stanghellini ME, Miller RM: Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. Plant Disease 1997; 81:4-12

Timm A, Steinbüchel A: Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent Pseudomonads. Appl Environ Microbiol 1990; 56:3360-3367.

van Delden C, Iglewski BH: Cell-to cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg Infect Dis 1998; 4:551-560.

Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, Pesci EC: Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2005; 187:4372-4380.

West SEH, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ: Construction of improved *Escherichia coli*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 1994; 128:81-86.

Worsey MJ, Williams PA: Metabolism of toluene and the xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. J Bacteriol 1975; 124:7-13.

Xiao G, Déziel E, He J, Lépine F, Lesic B, Castonguay M-H, Milot S, Tampakaki AP, Stachel SE, Rahme LG: MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein has dual ligands. Mol Microbiol 2006; 62:1689-1699.

Zhang Y, Miller RM, Enhancement of octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl Environ Microbio 1992 ; 58:3276-3282.

Zulianello L, Canard C, Köhler T, Caille D, Lacroix J-S, Meda P: Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelium by *Pseudomonas aeruginosa* 2006; Infect Immun 74:3134-3147.

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Relevant characteristics	Source or Reference
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> wild type strain	Hancock, Carey, 1979
PAO1- <i>rhIA</i>	PAO1 derived <i>rhIA</i> mutant by insertion of a Gm ^r cassette, polar on <i>rhIB</i>	Rahim <i>et al.</i> , 2001
PAO1- <i>rhIB</i>	PAO1 derived <i>rhIB</i> (PA3478) mutant by transposon insertion (12271), Tc ^r .	University of Washington collection
PAO1 <i>lecA::luxΔpqsA</i>	PAO1 derived <i>pqsA</i> deletion-mutant with a <i>lecA-lux</i> transcriptional fusion inserted in the chromosome	Diggle, Cámara and Williams, unpublished
KT2440	<i>Pseudomonas putida</i> wild type strain	Worsey <i>et al.</i> , 1975
KT2440- <i>phaG</i>	KT2440 derived <i>phaG</i> mutant	Rehm <i>et al.</i> , 1998
pUCP18	Vector devised to express proteins in Pseudomonads, Ap ^r .	West <i>et al.</i> , 1994
pAPR1	pUCP18 encoding RhlA-His ₁₀ under the <i>lac</i> promoter of plasmid pUCP18.	This work

Table 2. Production^a of some metabolites that use fatty acids as precursors by different *P. aeruginosa* strains.

Strain	Rhls	PHA	Pyocyanin
PAO1	766.87 ± 103	30.15 ± 1.53	3.75 ± 0.16
PAO1- <i>rhlA</i>	ND	33.73 ± 2.5	6.60 ± 0.13
PAO1- <i>rhlB</i>	ND	67.36 ± 1.0	13.98 ± 0.12
PAO1/pAPR1	1,066.53 ± 36	9.12 ± 1.0	4.89 ± 0.13
PAO1- <i>rhlA</i> /pAPR1	ND	70.50 ± 4.5	10.68 ± 0.10
PAO1- <i>rhlB</i> /pAPR1	ND	70.06 ± 2.0	12.47 ± 0.14

^aAll compounds were measured after 24 hours of culture on PPGAS medium at 37 °C. The concentration of rhamnolipids (rhls) and pyocyanin is expressed in µg/ml of culture supernatants ± standard deviation, and PHA concentration is expressed as µg/mg of protein ± standard deviation. ND means not detected.

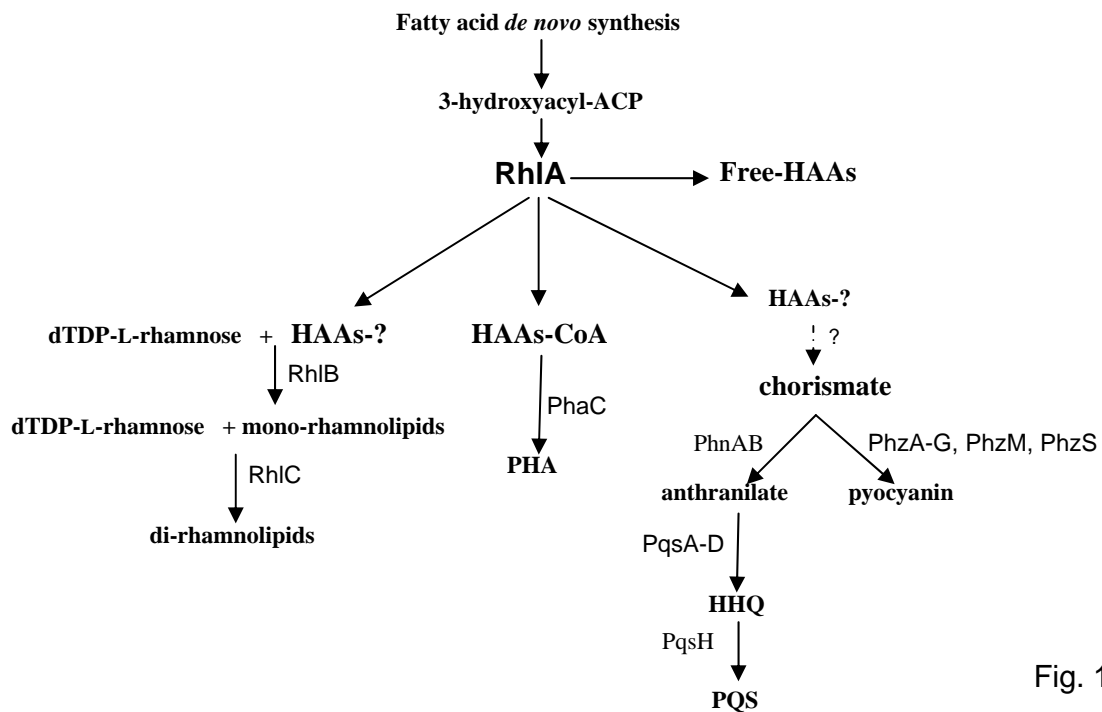


Fig. 1



Fig. 2

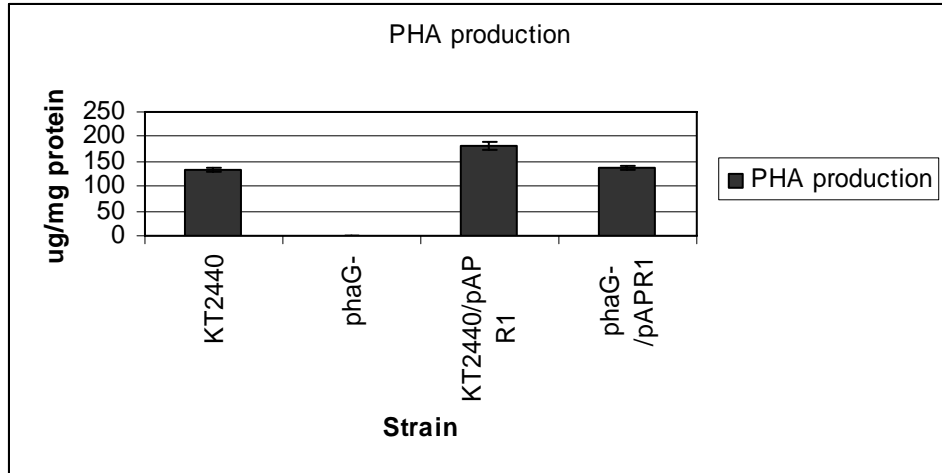


Fig. 3

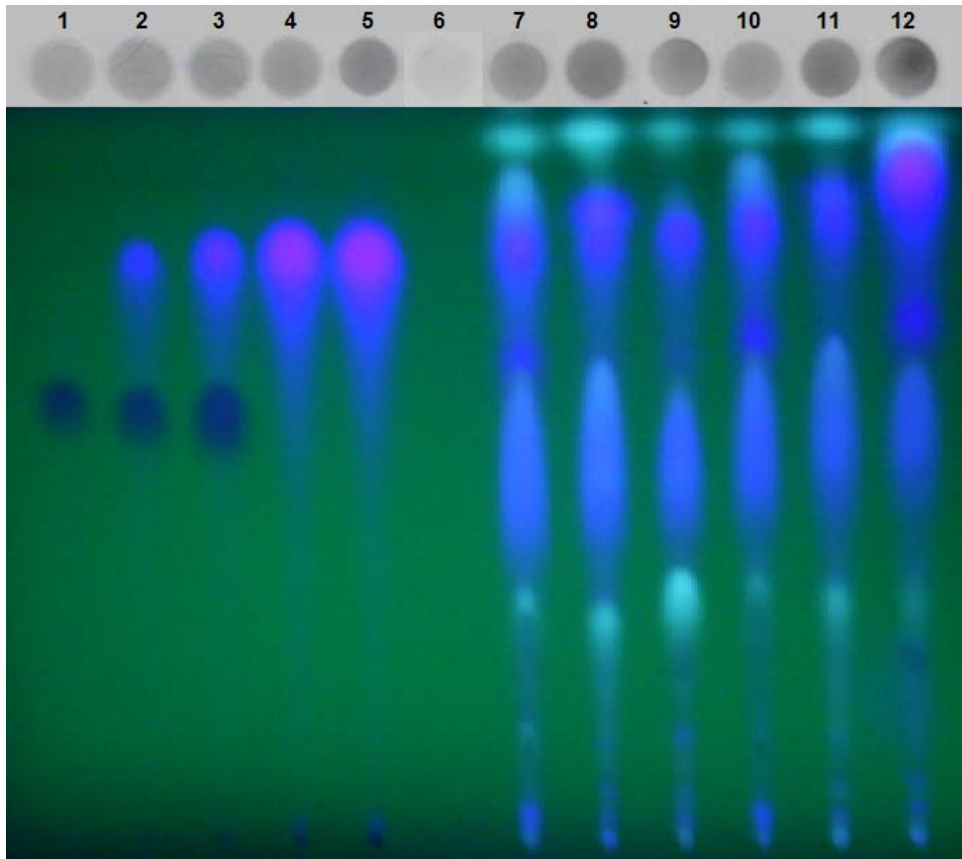


Fig. 4

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of RhlA role in the route of synthesis of rhamnolipids, 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), pyocyanin, polyhydroxyalkanoates (PHA), 2-heptyl-4(1H)quinolone (HHQ) and 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)quinolone (PQS).

Figure 2. Immunoblot detection of RhlA-His₁₀ using an anti-polyhistidine antibody. Lanes correspond to total proteins of the following strains: 1) PAO1, 2) PAO1/pAPR1, 3) PAO1*rhlA*, 4)PAO1*rhlA*/pAPR1, 5) PAO1*rhlB*, 6) PAO1*rhlB*/pAPR1, 7) *Escherichia coli* MC4100/pAPR1.

Figure 3. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production (in µg/mg of cell protein) of different *Pseudomonas putida* strains.

Figure 4. Detection of hydroxyalkyl quinolines (HAQs) on culture supernatants of different *P. aeruginosa* strains. These compounds were detected using the bioreporter strain PAO1 *lecA::luxAΔ pqsA* (A) or by TLC (B). Samples correspond to: 1) to 5) synthetic PQS and HHQ at the following concentrations (µg), respectively: 1) 0.1 and 7, 2) 1.0 and 12, 3) 2.5 and 18, 4) 10 and 0, 5) 25 and 0, 6) blank control, 7) PAO1, 8) PAO1*rhlA*, 9) PAO1*rhlB*, 10) PAO1/pAPR1, 11) PAO1*rhlA*/pAPR1, 12) PAO1*rhlB*/pAPR1.



APÉNDICE A

TABLA 1.

Algunas características de las enterobacterias y de otras bacterias gram-negativas (5).

Familia, género o especie	Metabolismo de la glucosa	Oxidasa	Crece en		Movilidad	Nitro a		Lisina ¹	Arginina ²	Ornitina ¹	Composición (% de G+C)
			MacC	SS		Nitrito	Gas				
Enterobacterias	F	-	+	+	+ ó -	+	-	d ⁴	d ⁴	d ⁴	36-57 ⁷
Yersinia	F	-	+	+,-	-, + ⁵	+	-	-	-	+ ó -	46-48
Vibrio	F	+	+	- ³	+	+	-	+	-	+	40-50
Aeromonas hydrophilia	F	+	+	+	+	+	-	-	+	-	52-59
Pasteurella	F	+	- ³	-	-	+	-	-	-	d	35-40
Pseudomonas	Ox	+ ⁶	+	+	+	-	+ ó -	-	+	-	57-70
Achromobacter	Ox	-	d	d	+ (-)	+ ó -	-	(NC)	NC	NC)	40-70
Acinetobacter anitratum (Herellea)	Ox	-	+	- ³	-	-	-	-	+, -	-	40-46
A. Iwoffii (Mima)	In	-	+	- ³	-	-	-	NC	NC	NC	40-46
Moraxella	In	+	- ó +	-	-	- ó +	-	NC	NC	NC	40-46
Flavobacterium	Ox ó In	+(-)	+(-)	-	+ (-)	-	+ ó -	NC	NC	NC	32-42
Alcaligenes	In	+	+	(+) -	+	+	+ ó -	NC	NC	NC	67-70

F=fermentativo;Ox=oxidativo; In=inactivo (en medio OF); MacC=agar de MacConkey SS=agar Salmonella-Shigella.[^]

+ = reacción positiva o crecimiento; - = sin reacción ó crecimiento; (+) = reacción positiva retardada o escaso crecimiento; d = reacciones distintas; +, (+) ó -; NC = sin cambio; +(-) = generalmente positivo, alguna cepa negativa.

1 = Descarboxilasa; 2 = dihidrolasa; 3 = pocas cepas crecen; 4 = reacciones de patrón diversos; 5 = movilidad, si existe, puede ponerse de manifiesto a 20-25°, pero no a 37°; 6 = excepto Pseudomonas maltophilia; 7 = la variación en la composición de bases del DNA en la casi totalidad de las enterobacterias es de 50=58 moles % de GC, excepto en el grupo Proteus-Providencia, en el que dichos valores son de 36-53.

Durante varios años, en diversos tratamientos los únicos antibióticos que resultaban efectivos eran la polimixina B, xolistina y gentamicina, que son un tanto tóxicos. Más recientemente, señalan el empleo de carbenicilina, que es menos tóxica, aunque ha dado lugar a que aparezcan cepas resistentes. Sin embargo en situaciones de vida o muerte (como lo son los pacientes quemados en los que la infección por *P. aeruginosa* es generalmente mortal), suministran carbenicilina en combinación con la gentamicina, además del empleo de la inmunoterapia (5).

TABLA 2.

Características diferenciales de los bacilos gram-negativos no fermentativos (5).

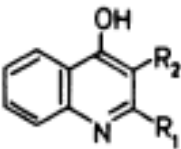
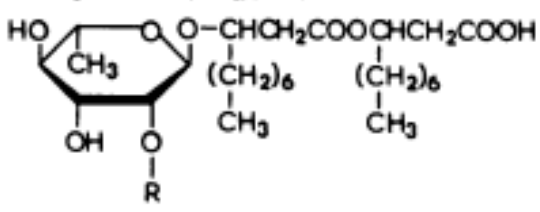
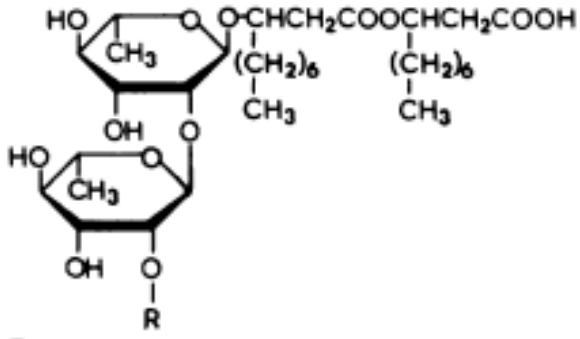
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. pseudomallei</i>	<i>P. mallei</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. acidovorans</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. maltophilia</i>	<i>A. anitratus (Herelleae)*</i>	<i>A. Iwoffi (Mima)**</i>	<i>Flavobacterium spp.</i>	<i>Alcaligenes</i>
Fluoresceína	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medio O-F	O	O	O	O	N	N	O	O	O	N	O/F	N
Agar de McConkey	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+
Motilidad	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+/-
Oxidasa	+	+	d+	d+	+	+	+	-	-	-	+	+
Crecimiento: 42°	+	-	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-
Crecimiento 4°	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?
Oxidación del gluconato	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa (O-F)	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+/-	-
Gelatinasa	+	+	+	-	-	-	-/+	+	-	-/+	+	-
Arginina dihidrolasa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

* Ácido del medio de lactosa al 10 % ** No producen ácido en medio de lactosa al 10%. O = Oxidativo; N = No oxidativo; F = Fermentativo ? = No determinado; +/- = Variable; + = Positivo; - = Negativo; d = débil.

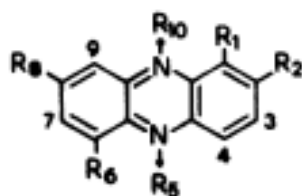
En la tabla anterior se indican algunas de las características diferenciales de otros patógenos oportunistas pertenecientes al grupo de las *Pseudomonas*, estos son: *P. fluorescens*, *P. maltophilia*, *P. multivorans (cepacia)*, *P. stutzeri*, *P. acidovorans*, *P. alcaligenes*. En general, estos microorganismos son más sensibles a los antibióticos que *P. aeruginosa* (5).

TABLA 3.

Estructuras de los metabolitos secundarios producidos por *P. aeruginosa* (85).

Compuesto (nombre común)	Estructura
LIPIDS	
Pyo compounds (pseudanes)	
2- <i>n</i> Pentyl-4-quinolinol Pyo Ib = pseudane VII Pyo Ic = pseudane IX Δ ¹ -Pseudane VII Pyo III = Δ ¹ -pseudane IX 2-Alkyl-4-hydroxyquinoline <i>N</i> -oxides 2-(2-Heptenyl)-3-methyl-4-quinolinol	$ \begin{array}{l} \text{R}_1 \\ \text{---}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \\ \text{---}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3 \\ \text{---}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3 \\ \text{---CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \\ \text{---CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3 \\ \text{---}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3, n = 6, 8, 10 \text{ (N-oxide)} \\ \text{---CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \end{array} \qquad \begin{array}{l} \text{R}_2 \\ \text{---H} \\ \text{---H} \\ \text{---H} \\ \text{---H} \\ \text{---H} \\ \text{---H} \\ \text{---CH}_3 \end{array} $
Rhamnolipids	
Pyolipic acid Compound B	$ \begin{array}{l} \text{R} \\ \text{---H} \\ \text{---COCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3 \end{array} $ 
Jarvis rhamnolipid Compound A	$ \begin{array}{l} \text{R} \\ \text{---H} \\ \text{---COCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3 \end{array} $

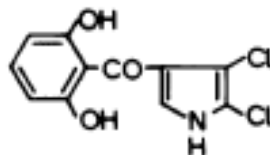
PHENAZINES



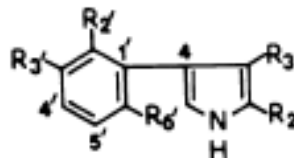
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	R ₈	R ₁₀
Pyocyanine	-OH	-H	-CH ₃	-H	-H	-
Hemipyocanine	-OH	-H	-	-H	-H	-
Idoinin	-OH	-H	-O	-OH	-H	-O
Phenazine-1-carboxylic acid (tubermysin B)	-COOH	-H	-	-H	-H	-
Chlororaphin	-CONH ₂	-H	-H	-H	-H	-H
Oxychlororaphin	-CONH ₂	-H	-	-H	-H	-
Aeruginosin A	-H	-NH ₂	-	-COOH	-H	-CH ₃
Aeruginosin B	-H	-NH ₂	-	-COOH	-SO ₃ H	-CH ₃

PYRROLES

Pyoluteorin

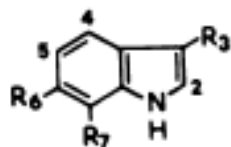


Phenylpyrroles



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₇	R ₆
Pyrrolnitrin	-H	-Cl	-NO ₂	-Cl	-H
Isopyrrolnitrin	-Cl	-Cl	-NO ₂	-H	-H
2-Chloropyrrolnitrin	-Cl	-Cl	-NO ₂	-Cl	-H
Aminopyrrolnitrin	-H	-Cl	-NH ₂	-Cl	-H
Oxypyrrolnitrin	-H	-Cl	-NO ₂	-Cl	-OH
Monodechloropyrrolnitrin	-H	-Cl	-NO ₂	-H	-H
4-(2'-Amino-3'-chlorophenyl)pyrrole-2-carboxylic acid	-COOH	-H	-NH ₂	-Cl	-H

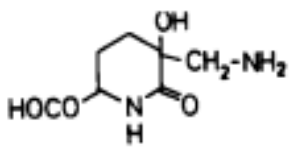
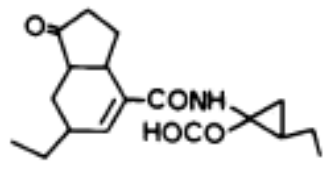
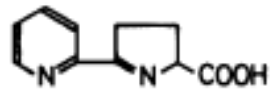
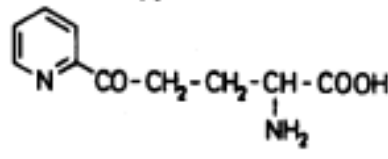
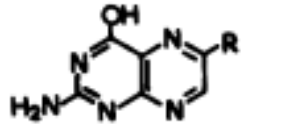
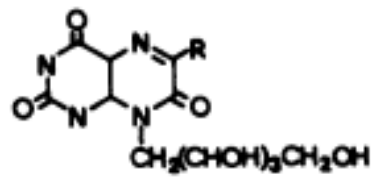
INDOLES

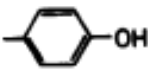
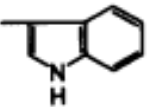
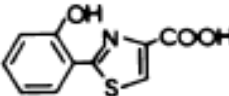
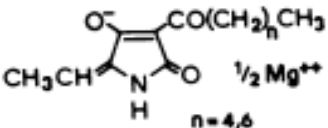
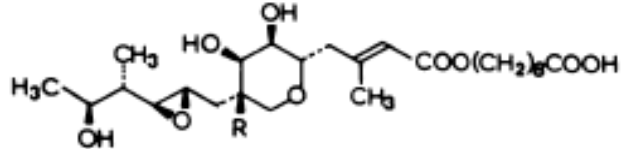
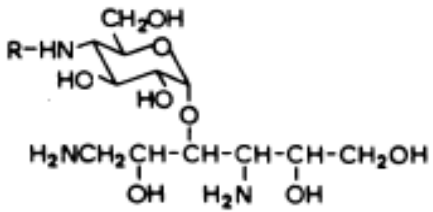
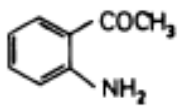
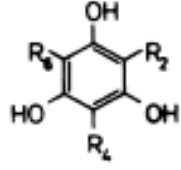


	R ₁	R ₆	R ₇
3-Chloroindole	-Cl	-H	-H
Indole-3-carboxaldehyde	-CHO	-H	-H
6-Bromoindole-3-carboxaldehyde	-CHO	-Br	-H
7-Chloroindoleacetic acid	-CH ₂ COOH	-H	-Cl
Indoleacryloisonitrile	-CH=CH-N≡C	-H	-H

AMINO ACIDS and PEPTIDES

L-2-Amino-4-methoxy <i>trans</i> -3-butenoic acid	$\text{CH}_3\text{-O}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
O-Ethyl homoserine	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Phaseotoxin A	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\underset{\text{OH}}{\text{NH}}-\underset{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Phaseolotoxins	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{(CH}_2\text{)}_3\text{O}}{\text{CH}}-\text{CO}-\underset{\text{NH}}{\text{CH}}-\underset{\text{CH}_2\text{R}}{\text{CO}}-\text{NH}-\underset{\text{(CH}_2\text{)}_6}{\text{CH}}-\underset{\text{NH-C-NH}_2}{\text{COOH}}$
Phaseolotoxin (2-Serine)-phaseolotoxin	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \text{---H} \\ \text{---OH} \end{array}$
Tabtoxins	$\text{HOCO}-\underset{\text{CHOH}}{\underset{\text{R}}{\text{CH}}}-\text{NH}-\text{CO}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{---} \\ \text{O} \end{array} \text{NH}$
Tabtoxin (2-Serine)-tabtoxin	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \text{---CH}_1 \\ \text{---H} \end{array}$
Isotabtoxins	$\text{HOCO}-\underset{\text{CHOH}}{\underset{\text{R}}{\text{CH}}}-\text{NH}-\text{CO}-\text{C} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{---} \\ \text{O} \end{array} \text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Isotabtoxin (2-Serine)-isotabtoxin	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \text{---CH}_1 \\ \text{---H} \end{array}$
Tabtoxinine	$\text{HOCO}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_2\text{-NH}_2}{\overset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{COOH}$
Tabtoxinine- β -lactam	$\text{HOCO}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{---} \\ \text{O} \end{array} \text{NH}$

Tabtoxinine- δ -lactam	
Coronatine	
Proferrorosamine A	 <p style="text-align: center;"> $\updownarrow + H_2O$ </p>
Pyrimine	
Viscosin	<p style="text-align: center;">D-β-hydroxydecanoyl-L-Leu-D-Glu</p> <p style="text-align: center;"> \rightarrowD-allo-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser </p> <p style="text-align: center;"> \uparrow L-Ile \leftarrow D-Ser \leftarrow L-Leu </p>
PTERINES	
Pterine 6-Aminopterine 6-Hydroxymethylpterine Monapterine	 <p style="text-align: center;"> $\begin{matrix} R \\ \equiv \\ H \\ -NH_2 \\ -CH_2OH \\ -CHOHCHOHCH_2OH \end{matrix}$ </p>
Ribitylumazine 6-Methyl-ribitylumazine Putidolumazine	 <p style="text-align: center;"> $\begin{matrix} R \\ \equiv \\ H \\ -CH_3 \\ -CH_2CH_2COOH \end{matrix}$ </p>

6-(<i>p</i> -Hydroxyphenyl)-ribityllumazine	
6-(3-Indolyl)-ribityllumazine	
MISCELLANEOUS COMPOUNDS	
Cyanhydric acid	HCN
Aeruginoic acid	
Magnesidin	
Pseudomonic acid	
Pseudomonic acid A	R = H
Pseudomonic acid B	R = OH
Antibiotic P-2563	
P-2563 (A)	R = COCH ₃
P-2563 (P)	R = COCH ₂ CH ₃
Amino-2-acetophenone	
C-acetyl phloroglucinols	
	R ₁ = COCH ₃
	R ₂ = COCH ₃
	R ₃ = COCH ₃
	R ₄ = H
	R ₄ = COCH ₃
	R ₄ = COCH ₃
	R ₅ = H
	R ₅ = H
	R ₅ = COCH ₃

Antibiotic DB-2073 (alkylresorcinol)

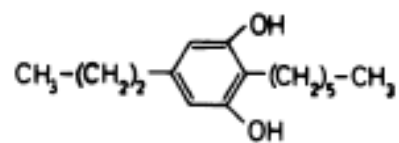


TABLA 4.

Composición del medio de cultivo PPGAS.

Reactivo	Concentración en gramos para 1L
Cloruro de Amonio [0.02M]	1.068
Cloruro de potasio [0.02M]	1.492
Tris-HCl ó MOPS [0.12M]	18.912
Peptona 1%	10.0
Glucosa 0.5%	25 ml
Sulfato de magnesio [0.0016M]	1.6 ml
Agua	cbp



APÉNDICE B

Proteobacterias Alpha.

Las proteobacterias alpha crecen con niveles bajos de nutrientes (oligotróficos), algunos poseen prostecas (prolongaciones celulares), además abarcan la mayoría de los géneros fotótrofos, bacterias fijadoras de nitrógeno, quimioautótrofos y quimioheterótrofos, (2) también varios géneros que metabolizan componentes C1, simbioses de plantas (por ejemplo, rhizobia) y de animales y un grupo de patógenos peligrosos, *Rickettsiaceae*. Por otra parte, se piensa que los precursores de las mitocondrias de las células eucariotas se han originado en este grupo bacteriano. (Teoría endosimbiótica) (3).

Proteobacterias Beta.

Las proteobacterias beta abarcan varios grupos de las bacterias aerobias o facultativas que son a menudo altamente versátiles en sus capacidades de degradación, muchas de ellas se encuentran en muestras ambientales, tales como aguas residuales o el suelo, siendo algunas patógenos humanos, teniendo dentro de esta clase a *Neisseriaceae* (que causa gonorrea y meningococcal meningitis) y las especies del género *Burkholderia* (2). Contiene géneros quimiolitotróficos (por ejemplo el género *Nitrosomonas* que oxida el amoníaco) y algunos fotótrofos (como los géneros *Rhodocyclus* y *Rubrivivax*). Este grupo de proteobacterias beta juegan un papel importante en la fijación de nitrógeno en varios tipos de plantas, oxidando amoníaco para producir nitrito, que es un producto químico importante para la función de las plantas (3).

Proteobacterias Delta.

Las proteobacterias delta abarcan un grupo de géneros predominante aerobios, myxobacteria, que forman cuerpos fructíferos y un grupo de géneros estrictamente anaerobios, que contienen la mayor parte de las bacterias reductoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, etc.) y de las bacterias reductoras de sulfuro (por ejemplo, *Desulfuromonas* y *desulfovibrio*) junto con otras bacterias anaerobias con diferente fisiología (por ejemplo, reductoras del hierro férrico *Geobacter* y los géneros sintróficos *Pelobacter* y *Syntrophus*) (3). Se incluyen los géneros *Mixococcus*, *Bdellovibrio* y parásitos de otras bacterias (2).

Proteobacterias Epsilon.

Las proteobacterias epsilon comprenden solamente unos pocos géneros, principalmente *Wolinella*, *Helicobacter* y *Campylobacter*, que tienen forma helicoidal y siendo estos dos últimos patógenos humanos. La mayor parte de las especies conocidas habitan en el tracto digestivo de seres humanos y animales y proporcionan servicio como simbioses (*Wolinella* en el ganado vacuno) o como ya se mencionó, como patógenos humanos (*Helicobacter* en el estómago, *Campylobacter* en el duodeno). También se han recuperado numerosas secuencias ambientales de respiraderos fríos e hidrotermales (2 y 3).