



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**El papel de RhlC sobre la producción de ramnolípidos en la cepa de  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Biól. Vázquez Bueno Paola Guadalupe

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Gloria Soberón Chávez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Katy Juárez López  
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Dr. Daniel Genaro Segura González  
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Ciudad de México, 2024.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



El presente trabajo se realizó en el laboratorio C-110 a cargo de la Dra. Gloria Soberón Chávez del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con los apoyos económicos de los programas: DGAPA-UNAM PAPIIT IN201819, DGAPA-UNAM PAPIIT IN201222 CONACyT CB-252269, Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) y la beca CONACyT por estudios de maestría.

**A María García ...**

Abuelita, guardo tu sonrisa en mis ojos, tu valentía en mis huesos  
y tu alegría en mi alma.

## AGRADECIMIENTOS

A mi máxima casa de estudio, la UNAM por haberme permitido crecer tanto profesionalmente y por brindarme todos los recursos necesarios en mi formación.

A mis profesores que trabajan arduamente día a día para que los estudiantes como yo, podamos superarnos día a día.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por permitirme realizar mis estudios en su laboratorio, por escucharme, tenerme tanta paciencia, por apoyarme a pesar de todo, por compartirme algo de sus tantos conocimientos, por motivarme y llenarme de admiración en lo que realiza día a día.

Al apoyo técnico que me brindó la Dra. Abigail González Valdez en la realización de este proyecto.

A los integrantes del laboratorio Soberón: Abi, Miguel, Gabriel, Selene, Martín, Enrique, Paulina, Fernando y Dianita por compartir diversas experiencias en el laboratorio. En especial a Uriel, que desde un inicio me brindó su apoyo tanto en lo técnico como en lo personal, y a Abi por alentarme cada día, brindarme su apoyo y escucharme siempre, sin sus consejos no podría haberlo logrado.

A mis pocos amigos de la maestría: Sarahí, Jesús y Arely, por ser un soporte tanto profesionalmente como personalmente y por siempre hacerme sonreír en los eventos desafortunados que pasé.

A todos mis amigos del antiguo laboratorio: Dr. Oropeza, Dr. Puente, Dra. Ale, Tephie, Inesita, Álvaro, Haydeé, Ismael, Jessica, Doña Rebe, Lili, Lucy, Marcos y Panchito, por estar aún presentes.

A mis amigos tallerines generación 2014 incondicionales: Alfredo Arteaga, Raquel Neri, Abraham Barajas, Steph Ortiz, Juan Salazar y Raúl

A más de mis amigos que he conocido en otras circunstancias: Brisa, Noemi, Alessandro, Gina, Diana Vázquez, Óscar, Eduardo Ángeles, Julián Pineda, Alan Valencia, Giselle, Karla, Ethel, Esme, Arely, Xochiquetzal, Sky, Ariadna, Ana Grizel, Addí Quiroz ... por ser unos ángeles en mi vida que siempre están conmigo.

A cada uno de los integrantes de mi familia, porque de ellos sigo aprendiendo y sin ellos no sería absolutamente nadie.

A mi mamá Julia por nunca dejarme caer y darme un ejemplo a seguir, a mis hermanos Luis y Julián al ser mis motivos para superarme, a Eduardo Hernández que ya es familia para mí, y quién se encuentra a mi lado incondicionalmente.

# CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.2 Ramnolípidos .....	2
1.2.1 Importancia de ramnolípidos .....	5
1.2.2 Ruta biosintética .....	7
1.2.3 Regulación genética.....	8
1.3. Clados de <i>P. aeruginosa</i> .....	10
2. ANTECEDENTES .....	11
3. JUSTIFICACIÓN .....	15
4. HIPÓTESIS .....	15
5. OBJETIVOS .....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares .....	15
6. MÉTODOS .....	16
6.1 Plásmidos y cepas utilizadas.....	16
6.2 Condiciones de crecimiento.....	18
6.3 Manipulación de material genético.....	18
6.4 Condiciones de PCR .....	18
6.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	19
6.6 Clonación .....	19
6.7 Transformación de <i>P. aeruginosa</i> .....	20
6.8 Extracción y cuantificación de RHLs .....	21
6.9 Extracción y cuantificación de PHAs .....	22
6.10 Cromatografía en capa fina de RHLs .....	22
6.11 Análisis de TLC con ImageJ.....	23
6.12 Ensayos de virulencia en larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	23
7. RESULTADOS .....	24
7.1 Cinética de crecimiento y producción de RHLs y PHAs de PAO 1 y ATCC 9027 en medio PPGAS. ....	24
7.2 Expresión de <i>rhlC</i> en trans en las cepas PAO 1 y ATCC 9027.....	27
7.3 Expresión de pRC y pABRC .....	34

7.4 Ensayos de virulencia en larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	40
8. CONCLUSIONES .....	43
9. PERSPECTIVAS.....	43
10. BIBLIOGRAFÍA .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición química de RHLs producidos por <i>P. aeruginosa</i> .....	3
Figura 2. Ruta biosintética de RHLs en <i>P. aeruginosa</i> .....	7
Figura 3. Modelo de regulación de RHLs por el sistema de quorum sensing.....	9
Figura 4. Producción de RHLs y PHAs en cepas recombinantes de PAO1 y ATCC 902.....	12
Figura 5. Expresión de <i>rhlAB</i> bajo 5 promotores distintos y coexpresando con <i>rhlC</i> bajo el promotor P <sub>T7</sub> en <i>E. coli</i> .....	14
Figura 6. Expresión de p30-C en PAO1 y ATCC 9027 bajo diferentes concentraciones de arabinosa.....	28
Figura 7. Expresión en trans de <i>rhlC</i> bajo el promotor <i>lac</i> en PAO 1 y ATCC 9027 .....	29
Figura 8. Expresión conjunta de <i>rhlC</i> con <i>rhlR</i> y <i>rhlABR</i> en la ATCC 9027 .....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos y cepas utilizadas.....	16
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados.....	17
Tabla 3. Valores usados para calcular los equivalentes de moléculas de ramnosa expresando a RhlC.....	32
Tabla 4. Valores usados para calcular los equivalentes de moléculas de ramnosa expresando a RhlC con RhlR y RhlABR.....	37

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y ATCC 9027 .....	25
Gráfica 2. Cinética de producción de PHAs de las cepas PAO1 y ATCC 9027.....	26
Gráfica 3. Cinética de producción de RHLs de las cepas PAO1 y ATCC9027.....	26
Gráfica 4. Expresión de p24-C sobre la síntesis de RHLs en PAO1 y ATCC 9027 .....	29
Gráfica 5. Expresión de p24-C sobre la síntesis de PHAs en PAO 1 y ATCC 9027.....	30
Gráfica 6. Relación entre los monoRHLs y diRHLs en TLC expresando RhIC.....	31
Gráfica 7. Equivalentes molares de RHLs en PAO1 y ATCC 9027 expresando <i>rhlC</i> .....	32
Gráfica 8. Porcentaje de moléculas de RHLs de PAO1 y ATCC 9027 expresando <i>rhlC</i> .....	33
Gráfica 9. Relación entre los monoRHLs y diRHLs expresando a RhIC, RhIRC y RhlABRC .....	35
Gráfica 10. Producción de RHLs (medidos por la cantidad de ramnosa) en la cepa ATCC 9027 con plásmidos que permiten la expresión de RhIC, RhIRC y RhlABRC.....	37
Gráfica 11. Equivalentes molares de RHLs en ATCC 9027 con RhIC, RhIRC y RhlABRC .....	38
Gráfica 12. Porcentaje de moléculas de RHLs de ATCC9027 con RhIC, RhIRC y RhlABRC .....	39
Gráfica 13. Porcentaje de larvas muertas .....	42
Gráfica 14. Conteo de UFCs de cada condición .....	42

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Infección de larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	41
---	----



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo que crece favorablemente entre 25 y 37°C, aunque soporta temperaturas hasta los 42°C (Oberhofer, 1979). Es un microorganismo ubicuo capaz de sobrevivir a diversos ambientes, necesita pocos requerimientos nutricionales y se adapta a condiciones que otras bacterias no pueden (Frimmersdorf et al., 2010; Moradali et al., 2017).

El genoma de *P. aeruginosa* consiste en un solo cromosoma circular de entre 5.5 a 7 Mb con un alto contenido en Guanina-Citosina (65-67%) (Wiehlmann et al., 2007). Posee 5,697 genes, de los cuales codifica para un gran número de enzimas involucradas en distintas rutas metabólicas, confiriéndole una gran versatilidad nutricional (Moradali et al., 2017). También, cerca del 8% de sus genes corresponden a genes de regulación confiriéndole la capacidad de adaptarse a distintos ambientes (Stover et al., 2000; Mathee et al., 2008; Frimmersdorf et al., 2010, Moradali et al., 2017).

Las cepas de *P. aeruginosa* son consideradas como potencialmente virulentas, ya que poseen un arsenal de factores que participan en la infección de plantas y animales (Starkey y Rahme, 2009; Alves et al., 2016). En humanos afecta principalmente a pacientes inmunocompromidos, por ejemplo: aquellos que padecen cáncer o fibrosis quística (Lyczak et al., 2002).

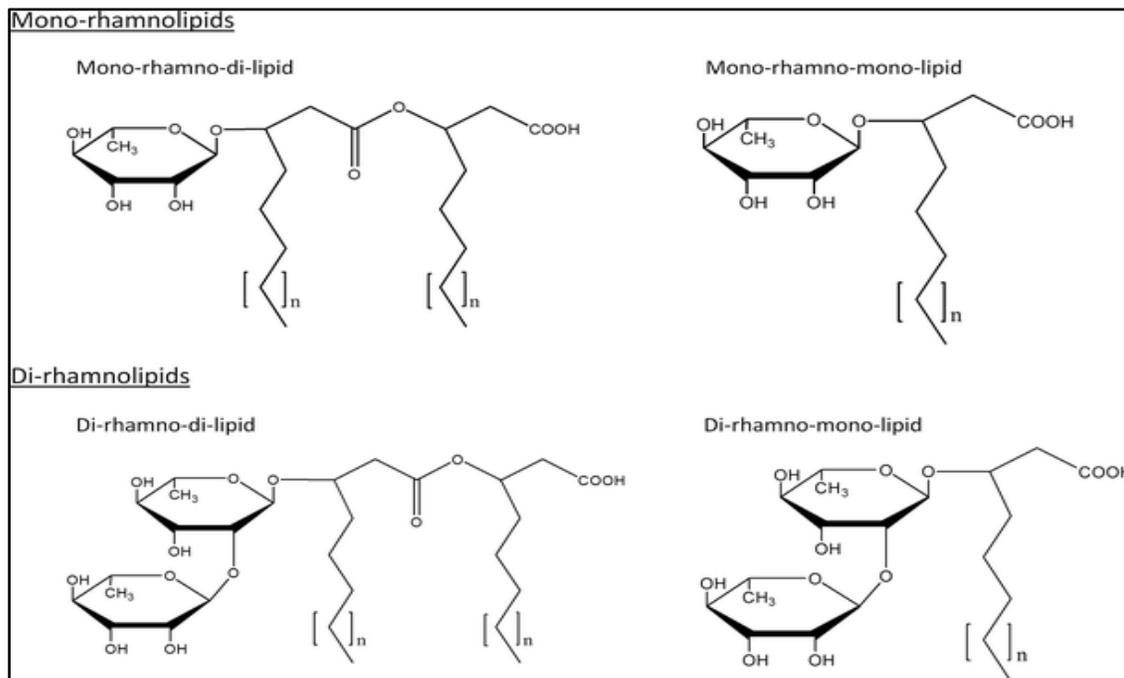
Entre los determinantes de virulencia encontramos al sistema de secreción tipo tres (SST3), una jeringa molecular que le permite a la bacteria translocar proteínas efectoras y toxinas que le ayudan a la infección del hospedero. Así como otros determinantes como: pigmentos (pioverdina, piocianina), hemolisinas, ramnolípidos, entre otros (Usher et al., 2002; Girard y Bloemberg, 2008)

## 1.2 Ramnolípidos

Los biosurfactantes ramnolípidos (RHLs) son moléculas anfipáticas sintetizadas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (Gunther et al., 2005,2006; Onbasli y Aslim, 2009; Grosso-Becerra et al., 2016; Gutiérrez-Gómez et al., 2018). Aunque otras especies bacterianas han sido reportadas como productoras de estos biosurfactantes: *Burkholderia sp.* (Pajarron et al., 1993; Dubeau et al., 2009), *P. alcaligenes* (Oliveira et al., 2009), *P. chlororaphis* (Gunther et al., 2005,2006) *P. putida* (Martínez-Toledo et al., 2006; Wittgens et al., 2011), *P. aeruginosa* sigue siendo una de las mejores productoras.

Los RHLs se producen en fase estacionaria, preferentemente en la estacionaria tardía, bajo condiciones de estrés nutricional, por privación nutricional de hierro, fosfatos o nitrógeno (Medina et al., 2003; Déziel, 2009). Además, las condiciones de cultivo como pH, temperatura y oxígeno impactan de manera significativa su síntesis (Mehdi et al., 2011; Nitschke et al., 2011; Zhu et al., 2012). Estos biosurfactantes están constituidos por una cabeza iónica polar de L-ramnosa unida, mediante un enlace glicosídico, a una cola hidrofóbica de ácidos grasos ( $\beta$ -hidroxiácidos) con 10 carbonos principalmente (Rendell et al., 1990; Wittgens et al., 2017). Dependiendo del número de moléculas de L-ramnosa y cadenas de ácidos grasos encontramos 4 congéneros principales en *P. aeruginosa* (Rendell et al., 1990): monoramnolípidos (monoRHLs) compuestos de una o dos cadenas de  $\beta$ -hidroxiácidos y diramnolípidos (diRHLs) que poseen dos ramnosas unidas a una o dos cadenas de  $\beta$ -hidroxiácidos (**Figura 1**).

Tanto los monoRHLs como los diRHLs, poseen diferentes propiedades fisicoquímicas. De acuerdo con Guo et al. (2009) los diRHLs son más polares que los monoRHLs al tener dos ramnosas. A diferencia de los monoRHLs, los diRHL presentan unas estructuras más compactas y capaces de interaccionar con electrolitos, poseen una menor concentración micelar crítica (CMC) y reducen en más la cantidad la tensión superficial del agua. Además, los monoRHLs son más propensos a agregarse a concentraciones bajas.



**Figura 1. Composición química de RHLs producidos por *P. aeruginosa*.** (Wittgens et al., 2017)

La función de los RHLs aún no ha quedado clara, se ha especulado que participan de manera activa en el desarrollo de infecciones clínicas al solubilizar el surfactante mucociliar pulmonar, alterando el movimiento mucociliar del epitelio pulmonar (Read, 1992), disruptiendo el epitelio de las vías respiratorias (Zulianello et al., 2006), o en la prevalencia de las infecciones al inducir la formación de biopelículas al presentarse como una barrera biológica ante antibióticos (Lequette y Greenberg , 2005; Pamp y Tolker-Nielsen, 2007; Wilhelm et al., 2007; Van Gennip et al., 2009).

Por otra parte, los RHLs le permiten a *P. aeruginosa* solubilizar hidrocarburos del medio, internalizarlos y metabolizarlos, y esto causa que en medios contaminados por hidrocarburos se encuentran bacterias productoras de estos y otros biosurfactantes (Chrzanowski et al., 2012). Además, en medios contaminados por hidrocarburos la disposición de nutrientes como nitrógeno o fosfatos es baja, y esto propicia un estrés metabólico en el que la secreción de RHLs le permite a la bacteria, usarlos como sustrato

para crecer y migrar hacia nichos ricos en nutrientes (Tremblay et al., 2007; Verstraeten et al., 2008).

Los RHLs se han relacionado con la motilidad microbiana conocida como nado en enjambre o “swarming” bajo condiciones de deprivación de nitrógeno (Köhler et al., 2000). Esta motilidad también es considerada por muchos investigadores como una parte integral del proceso de formación de biopelícula (Sharma y Anand, 2002; Verstraeten et al., 2008). Wilhelm y colaboradores (2007) mostraron que *P. aeruginosa* PAO1 forma biopelícula cuando produce y secreta RHLs, por lo que su síntesis se correlaciona con el cambio del tipo de vida bacteriano (de planctónica a biopelícula).

Debido a que los RHLs son una mezcla de congéneros con diferentes características físicoquímicas, existe una controversia acerca de qué tipo de RHL es el agente inductor de un cambio particular en el tipo de vida bacteriano, por lo que se han realizado diversos estudios para conocerlo. Principalmente encontramos los estudios experimentales de Caiazza et al., (2005) que muestra a estos surfactantes como inhibidores de la motilidad celular bacteriana, mientras que sus precursores HAAs funcionan sólo como tensioactivos. Sin embargo, el grupo de Tremblay (2007) presenta algo totalmente diferente, su grupo extrajo cada uno de los congéneros de monoRHLs, diRHLs y HAAs, los purificó y realizó ensayos de motilidad encontrando que existe un sistema quimiotáxico en el que los precursores HAAs funcionan como “repelentes” de bacterias, los monoRHLs no afectan el movimiento bacteriano por swarming y los diRHLs participan como moléculas “atrayentes” que son reconocidos por bacterias con el tipo de motilidad swarming.

Por otra parte, se ha discutido la participación de RHLs en la modificación de la membrana celular de *P. aeruginosa* y las cepas productoras de estos compuestos. Zhang y Miller (1994,1995) fueron los primeros en observar que los RHLs contribuyen al cambio de la hidrofobicidad de la superficie celular (CSH) en distintas bacterias. Posteriormente Chrzanowski y colaboradores (2009<sup>a</sup>) mostraron que estos cambios son resultado de la

absorción de RHLs (u otros surfactantes) y que podrían alterar aquellos factores que intervienen en el transporte de sustratos extracelulares.

En el 2011 Zhao, Selvam y Wong observaron que los RHLs disminuyen la CSH de las células que tienen una envoltura hidrofóbica, mientras que incrementan la CSH de las células que son hidrofílicas. Aunado a esto, al ser biosurfactantes aniónicos, su adsorción sobre la superficie celular y la modificación de la estructura química de la célula pueden alterar las propiedades de carga de la superficie celular de cada especie (Zeng et al., 2011; Liu et al., 2012).

Al-Tahhan et al., (2000), estudiaron los efectos de RHLs en dos cepas de *P. aeruginosa*: *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. aeruginosa* ATCC 9027, obteniendo que estos surfactantes son capaces de modificar la composición de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana celular.

Anteriormente, se creía que la producción de RHLs se incrementaba en cepas con membranas hidrofílicas capaces de resistir altas concentraciones de surfactantes hidrofóbicos, específicamente los monRHLs (Cooper et al., 1984; Guerra Santos et al., 1984; Arino et al., 1996). Después, nuevos estudios en cepas de *P. aeruginosa* mostraron que, sin importar las concentraciones de RHLs, no se presenta un efecto significativo en la carga de la superficie celular (Zhong et al., 2007; Zhong Jiang et al., 2015; Zhong Liu et al., 2016), lo cual es contradictorio lo que Al-Tahhan y colaboradores (2000) obtuvieron.

### **1.2.1 Importancia de los ramnolípidos**

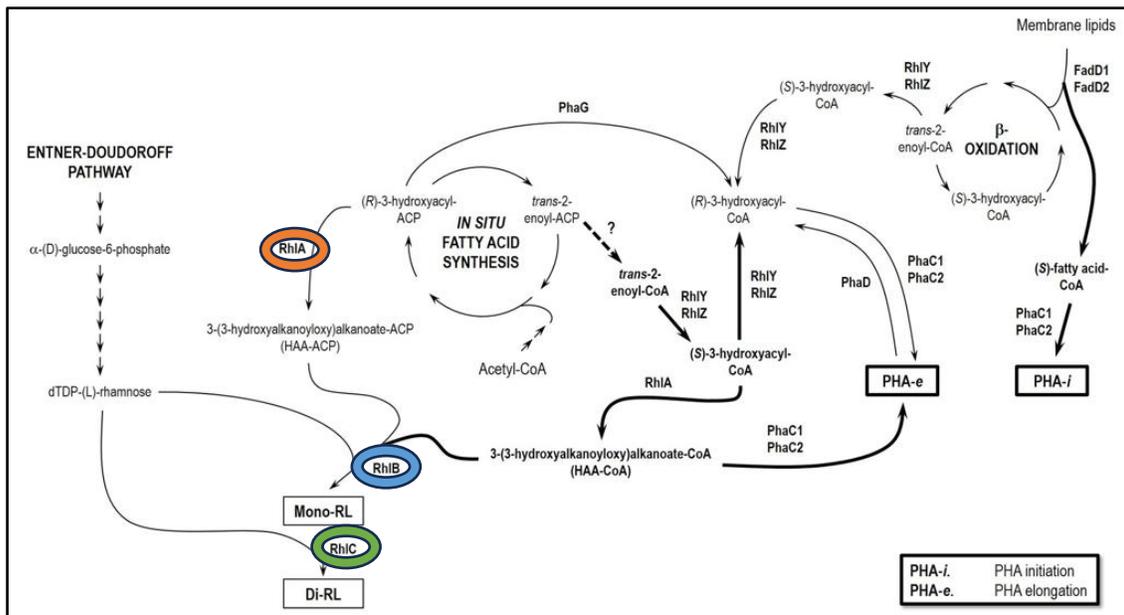
Actualmente, los RHLS, han llamado la atención de diversas industrias y se han convertido en un rival de los surfactantes químicos por ser biodegradables, muy poco tóxicos, estables a diferentes temperaturas, concentraciones de pH y salinidad (Dobler et al., 2016).

Se han propuesto diversos usos potenciales (Maier y Soberón, 2000), entre los que destacan los siguientes:

- 1) Agricultura: Se les ha utilizado para limpiar suelos contaminados, para la eliminación de patógenos (zoospóricos), como biopesticidas y como fertilizantes (Stanghellini M y Miller R, 1997; Sachdev y Cameotra, 2013)
- 2) Biorremediación y recuperación de hidrocarburos: Al ser buenos emulsificadores, se han utilizado para separar fases oleosas y facilitar la biorremediación de hidrocarburos (Rahman et al., 2003; Costa et al., 2010). También recubren a las partículas de hierro cerovalentes unidas a paladio (NZVI), evitando que estas reaccionen con otras sustancias y haciendo más eficiente las labores de biorremediación (Bhattacharjee et al., 2016).
- 3) Detergentes y limpiadores: Al ser agentes tensioactivos y emulsificadores naturales, pueden usarse para fabricar shampoos, lavatrastes, jabones de tocador y detergentes para ropa (Parry et al., 2013)
- 4) Farmacia: Al ser muy poco tóxicos y presentar actividad antimicrobiana, potencialmente podrían utilizarse para tratamientos médicos (Magalhaes y Nitschke, 2013). También pueden utilizarse en diversos tratamientos dermatológicos, así como en quemaduras (Piljac y Piljac, 2007)
- 5) Recubrimientos: Al recubrir nanopartículas de plata y óxido de hierro evitan la adhesión y formación de biopelículas bacterianas (Khalid et al., 2019). También, adherirse a nanopartículas de plata, fungen como antimicrobianos de potente espectro (Bharali et al., 2013)
- 6) Nanopartículas: Los ramnolípidos tienen la capacidad de autoensamblarse en microtúbulos blandos que se unen a nanopartículas de oro. Los microtúbulos compuestos de nanopartículas de ramnolípidos-oro se tratan térmicamente para producir estructuras similares a microhilos de oro poroso con características nanoestructurales que pueden tener aplicaciones en catálisis, biosensores y electrónica (Rehman et al., 2010).

### 1.2.2 Ruta biosintética

La biosíntesis de RHLs (**Figura 2**) depende de dos vías metabólicas centrales para obtener a sus precursores: vía de TDP-L-ramnosa y síntesis *de novo* de ácidos grasos. Su síntesis consiste en tres reacciones enzimáticas consecutivas: primero RhlA (codificado por el gene *rhlA*) sintetiza β-hidroxiacil- β-hidroxiacanoatos (HAAs) por medio de la dimerización de ® 3-hidroxiacil-CoA (intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos), posteriormente RhlB (gene *rhlB*) une los HAAs a una dTDP-L-ramnosa formando el monoRHL (Déziel et al., 2009), finalmente el monoRL sirve como sustrato a la enzima ramnosiltransferase RhlC (gene *rhlC*) para formar diRL, uniendo otra dTDP-L-ramnosa (Rahim et al., 2001).



**Figura 2. Ruta biosintética de RHLs en *P. aeruginosa*.** Se enmarca a RhlA, RhlB y RhlC (Gutiérrez-Gómez et al., 2019)

El intermediario ®-3-hidroxiacil-CoA, utilizado por RhlA, también juega un papel importante en la elongación de otros metabolitos secundarios llamados polihidroxiacanoatos (PHAs) cuando las cadenas de ácidos grasos se obtienen de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y β-oxidación (Gutiérrez-Gómez et al., 2019).

Los PHAs son producidos bajo condiciones de estrés nutricional y sirven a la bacteria como reservas de carbono y energía. La mayoría de PHAs producidos por microorganismos están constituidos por monómeros intermediarios de las rutas de biosíntesis o  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Anderson y Dawes, 1990; Luengo et al., 2003; Gutiérrez-Gómez et al., 2019).

Debido a que los RHLs y PHAs utilizan precursores provenientes de la síntesis de ácidos grasos, la sobreproducción de RHLs se compromete al competir con la síntesis de PHAs. Algunos trabajos han logrado aumentar los niveles de RHLs finales al redirigir el flujo a favor de estos, por medio de la sobreexpresión de genes de la biosíntesis como *rhLABR* o mutantes en las sintasas de PHAs (Grosso-Becerra et al., 2016; Gutiérrez-Gómez et al., 2019).

Los RHLs no sólo compiten por precursores con los PHAs, por parte de la síntesis de dTDP-L-ramnosa, la síntesis de lipopolisacáridos (LPS) y alginatos requieren de este precursor, por lo que la sobreproducción de RHLs podría verse limitada (Olvera et al., 1999).

### **1.2.3 Regulación genética**

El sistema del quorum sensing (QS), es un sistema de comunicación bacteriana caracterizado por la secreción y detección de moléculas señal llamada autoinductores. Los componentes esenciales del QS lo conforman: la sintasa de la molécula señal, la molécula señal y el receptor de la molécula señal (Williams, 2007)

En *P. aeruginosa* se han descrito tres sistemas de QS, dos de estos sistemas han sido más estudiados (Las y Rhl). Las sintasas LasI y RhlI producen las homoserín lactonas 3OC12-HSL y C4-HSL, respectivamente, que se unen a sus receptores correspondientes, LasR y RhlR.

El tercer sistema QS lo conforma el factor transcripcional PqsR (Cao et al., 2001). PqsR es responsable de activar la transcripción de los operones *phnAB* y *pqsABCDE*, requeridos

para la producción de 4-hidroxi-2-alkilquinolonas (HAQs) entre las que se encuentra la quinolona señal de *Pseudomonas* (PQS), que regula factores de virulencia como elastasa, piocianina y lectina PA-1L (Déziel et al., 2005).

La producción de RHLs en *P. aeruginosa* está directamente regulada por el QS a través del regulador RhIR. Los genes que codifican para las enzimas RhIA/B se encuentran formando un operón junto con RhIR y RhII. Por su parte, el gene de RhIC, se encuentra codificado en un operón bicistrónico junto con PA1131, gene que según la Pseudomonas Database está descrita como un gen que codifica a una proteína tipo “probable major facilitator superfamily (MFS) transportes y de acuerdo a Wittgens 2017, no interviene en la síntesis de RHLs.

Se sabe que el gene *rhIR*, tiene cuatro sitios de inicio transcripcional diferentes (Medina et al., 2003). En condiciones de medio rico, la expresión de RhIR depende de LasR, pero bajo condiciones limitantes de fosfatos RhIR se puede expresar de manera independiente de LasR (Soto-Aceves, datos no publicados) y se ha propuesto que el regulador transcripcional Vfr también participa en su expresión (Croda-García et al., 2011). RhIR al unirse con su molécula señal (C4-hsl) activa la transcripción de sus genes blanco como el promotor *rhIA* y el de PA1131 (Figura 3).

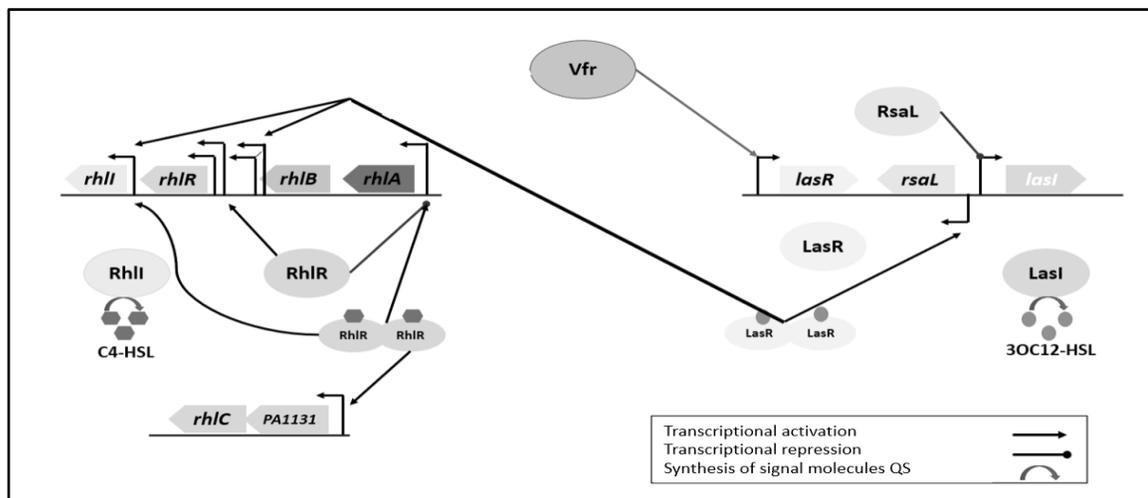


Figura 3. Modelo de regulación de RHLs por el sistema de quorum sensing.

### **1.3. Clados de *P. aeruginosa***

De acuerdo a la composición genética presente en las cepas de *P. aeruginosa*, se les agrupa en tres clados filogenéticos (Freschi et al., 2015).

El primer clado es representado por la cepa PAO1, que ha sido el modelo para estudios del quórum sensing desde hace varios años (Albus et al., 1997; de Kievit, 2000). Estas cepas son patógenas debido a la exportación de toxinas al hospedero por medio del Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3), además de utilizar otros factores como la elastasa o la piocianina para infectar (Lee et al., 2005; Hauser, 2009).

La cepa PA14, representante del segundo clado. Es un aislado altamente virulento (He et al., 2004). Las cepas de este clado tienen en su genoma dos islas genómicas que están ausentes en los otros dos clados (He et al., 2004; Harrison et al., 2010) y que llevan genes implicados en virulencia como la toxina ExoU (He et al., 2004), además de ser mutantes en el gene *ladS* (represor del SST3) que contribuye positivamente al desarrollo de infecciones (Mikkelsen et al., 2011).

De los tres clados, el tercero se caracteriza por ser el más diverso genéticamente (García-Ulloa et al., 2019). La cepa representativa de este clado es la PA7, un aislado clínico de Argentina (Roy et al., 2010). En este clado podemos encontrar cepas avirulentas en modelos de laboratorio (Grosso-Becerra et al., 2016; Reboud et al., 2016).

La ausencia del fenotipo de patogenicidad se asocia a la delección de los genes que codifican para el SST3 que es crucial para la virulencia de los otros clados (Roy et al., 2010; Elsen et al., 2014; Grosso-Becerra et al., 2016). Actualmente, se han encontrado cepas del clado 3 que son capaces de desarrollar infecciones más graves que la PAO1 debido a las hemolisinas ExlA/B (Elsen et al., 2014; Basso et al., 2017). Así pues, aunque las cepas reportadas dentro del clado 3 presentan en su genoma los genes que codifican para estas hemolisinas, se ha reportado que no todas son capaces de sintetizarlas por lo que no desarrollan infecciones (Reboud et al., 2016).

Otras características del clado 3, es que no contienen los genes que codifican para la lectina A (LecA) asociada al efecto citotóxico en el hospedero (Chemani et al., 2009), y la ramnosil transferasa 2 (RhlC) por lo que solo producen mono-RHLs (Roy et al., 2010).

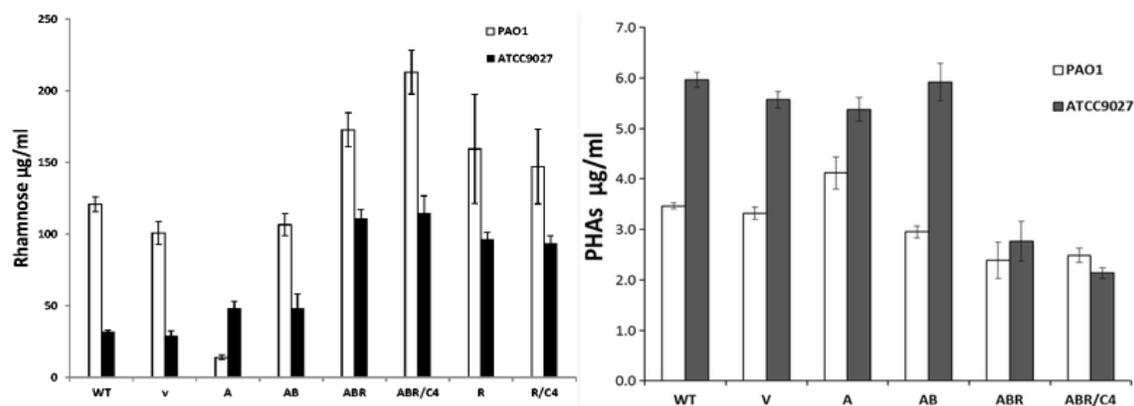
## 2. ANTECEDENTES

La cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027 (DMS 1128) pertenece al clado 3 (Roy et al., 2010; Grosso-Becerra, et al., 2016), al igual que las cepas de este clado no presenta el SST3, ni los genes *lecA* y *rhlC* (Grosso-Becerra et al., 2016). Fue aislada de una infección de oído medio en EUA en 1980 y se ha demostrado que, en modelos de infección como ratón, no desarrolla virulencia (Grosso-Becerra et al., 2016) a pesar de tener los genes que codifican para las hemolisinas ExlA/B, que no expresa (Elsen et al., 2014).

Dentro de la producción de RHLs, produce un título de cuatro tipos de congéneros de mono-RHLs de los cuales los más abundantes son: RhaC<sub>10</sub>C<sub>10</sub> y RhaC<sub>10</sub>C<sub>12</sub>, y los menos abundantes: RhaC<sub>10</sub>C<sub>12:1</sub> y RhaC<sub>10</sub>C<sub>8</sub>, utilizando glucosa como fuente de carbono (Zhang et al., 2014).

Clarke et al. (2010), cultivaron a la ATCC 9027 bajo condiciones de limitación de fosfato y con glucosa como fuente de carbono, logrando una producción de 4.261 g/L en biorreactor y demostrando que el estrés por fosfatos desencadena un aumento en la producción de los RHLs en esta cepa e, inclusive, produce más que aquellas cepas que producen mezcla de mono y diRHLs.

En el 2016, Grosso-Becerra y colaboradores produjeron RHLs en medio con bajos fosfatos y con glucosa como fuente de carbono, aumentando significativamente la producción de RHLs en la cepa ATCC 9027 expresando en *trans* a los genes *rhlABR* y *rhlR* de la cepa PAO1, en un vector que tiene el promotor *lac*, además de llevar sus propios promotores (**Figura 4**).



**Figura 4. Producción de RHLs y PHAs en cepas recombinantes de PAO1 y ATCC 9027.** Con V se presentan las cepas con el vector pUCP24, pJMG2-*rhlA* (A), pJMG3-*rhlAB* (AB), pJMG-*rhlAB-R* (ABR), pJMG1-*rhlR*®, ABR/C4 y R/C4 suplementados con C4-HSL (Grosso-Becerra, et al. 2016).

Los niveles de RHLs obtenidos de la ATCC 9027 expresando *rhlA* incrementan en la cepa ATCC 9027 y disminuye en la PAO1, esto correlaciona con los niveles de PHAs en donde disminuyen en la ATCC 9027 y aumentan en la PAO1. La expresión de *rhlAB* sólo aumenta los RHLs en la ATCC 9027 y los PHAs permanecen igual que las cepas silvestres.

Sólo las cepas que llevan a *rhlR* aumentan la producción de RHLs debido a que RhlR inicia la transcripción del operón *rhlAB* cromosomal, a través de un ciclo positivo al unirse con C4-HSL. Asimismo, la expresión de *rhlABR* aumenta los niveles por un ciclo de regulación positiva sobre los genes *rhlABR* cromosomales y plasmídicos. El incremento de la producción de RHLs correlaciona con la disminución de los PHAs, debido a que se redirecciona el flujo de HAAs a favor de los RHLs. Por lo que en esta condición parece no haber una limitante de ácidos grasos para la producción de RHLs.

Aun cuando la cepa ATCC 9027 es un modelo avirulento de de sobreproducción de RHLs, se desconoce si al expresar a *rhlC* el título de RHLs total aumentará o si el diRHL ejercerá efectos fisiológicos sobre esta cepa.

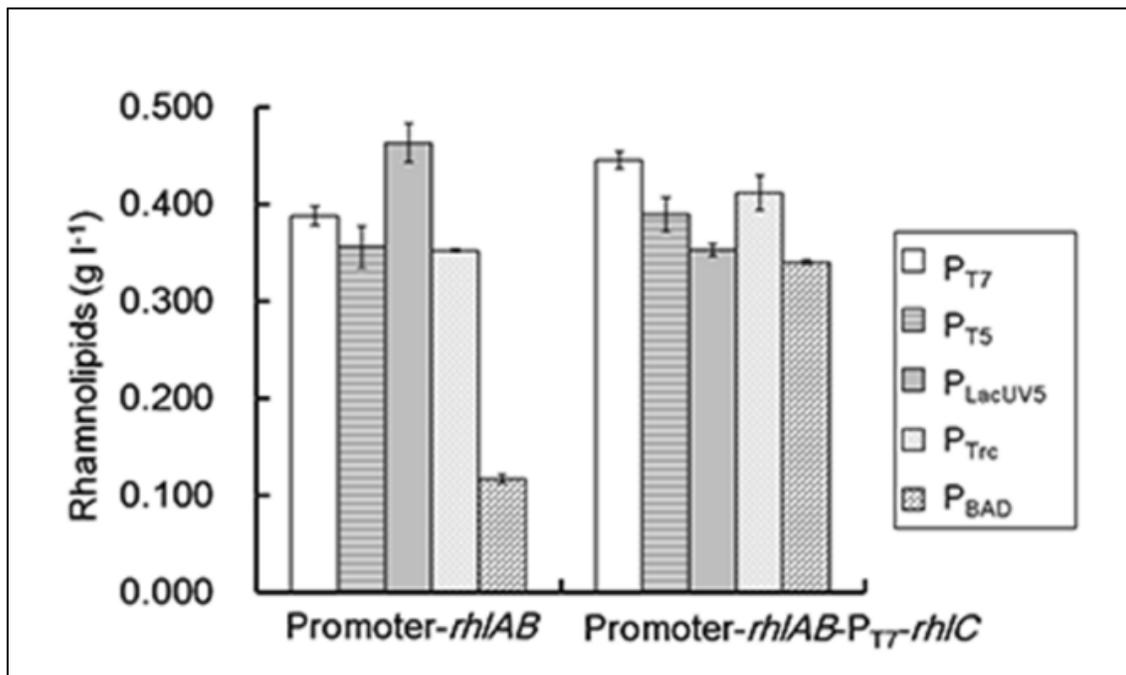
En el 2001 Rahim y colaboradores, caracterizaron al gene *rhlC*, encontrando que está localizado río abajo del gene PA1131, con el que se sobrelapan 13 pares de bases y comparten el mismo promotor regulado por RhlR. Su expresión, así como la de *rhlAB*, se da preferentemente en la fase estacionaria intermedia, aunque de menor medida comparado con los niveles de expresión de *rhlAB* en condiciones de bajos fosfatos (Syed et al., 2019).

Hasta el día de hoy, muy pocos trabajos se han enfocado al estudio de RhlC sobre la producción de diRHLs. Dentro de las principales aplicaciones que se podría dar a este tipo de surfactante se encuentra la biorremediación (Liu et al., 2017), por lo que su valor económico es mayor que el de los monoRHLs.

Entre los estudios que se enfocan en producir diRHLs encontramos a Dubeau y colaboradores (2009) quienes lograron producir mayoritariamente diRHLs en la cepa de *Burkholderia thailandensis* E264. Aunque esta cepa posee dos clústeres de genes homólogos de *rhlAB* y *rhlC* de *P. aeruginosa* PAO1, no logra superar los títulos reportados para *P. aeruginosa* de 150 g L<sup>-1</sup> (con 2.5% de aceite de girasol como fuente de carbono), obteniendo 1473.72 mg/L (con 4% de aceite de canola).

Du y colaboradores (2017), por su parte, se centraron en sobreproducir diRHLs en *Escherichia coli* inicialmente coexpresando a *rhlAB* bajo 5 diferentes promotores: P<sub>T7</sub>, P<sub>T5</sub>, P<sub>LacUV5</sub>, P<sub>BAD</sub> y P<sub>Trc</sub>, y *rhlC* bajo P<sub>T7</sub>, todos los genes provenientes de la PAO1 y optimizados para *E. coli*, obteniendo que la expresión de *rhlAB* aumentó los monoRHLs cuando se expresaron bajo el promotor P<sub>LacUV5</sub> (0.470 g L<sup>-1</sup>), pero cuando se expresaron con *rhlC* inexplicablemente los niveles descendieron (0.350 g L<sup>-1</sup>). El mayor incremento de RHLs expresando a *rhlC* (bajo el promotor P<sub>T7</sub>) se obtuvo al expresar *rhlAB* con el promotor P<sub>BAD</sub> (incremento de 0.100 a 0.320 g L<sup>-1</sup>). Sin embargo, el mayor título alcanzado fue cuando se expresó a *rhlAB* y *rhlC* con el promotor P<sub>T7</sub> (0.450 g L<sup>-1</sup>). Esto podría representar que un incremento de RHLs totales puede estar en función con el tipo de promotor con el cual se expresan *rhlAB* y *rhlC* (**Figura 5**).

Del trabajo de Du et al., (2017) se debe destacar que los niveles de producción de RHLs dependen del promotor con el que se expresan, además de que al sintetizar diRHLs la producción se ve limitada por la cantidad de precursores (principalmente la ramnosa) y la tolerancia de la célula a los RHLs, específicamente al diRHL, ya que al ser más hidrofóbico que el monoRHL podría comprometer la estabilidad de la membrana celular.



**Figura 5. Expresión de *rhlAB* bajo 5 promotores distintos y coexpresando con *rhlC* bajo el promotor P<sub>T7</sub> en *E. coli*.** Las cinco barras de la izquierda representan los niveles de RHLs obtenidos al expresar a *rhlAB* bajo los promotores: P<sub>T7</sub> (blanco), P<sub>T5</sub> (rayas), P<sub>LacUV5</sub> (gris fuerte), P<sub>Trc</sub> (gris claro) y P<sub>BAD</sub> (cuadros). Las barras de la derecha representan la coexpresión de *rhlAB* bajo los mismo 5 promotores de la izquierda junto con *rhlC* bajo el promotor P<sub>T7</sub> (Du et al., 2017)

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las aplicaciones de los RHLs son muy diversas y, al ser compuestos biodegradables, se perfilan como una alternativa ecológica para reemplazar a los surfactantes químicos. Sin embargo, su utilización está limitado por los bajos niveles de producción hasta ahora reportados.

*P. aeruginosa* es la bacteria que produce los niveles más altos de RHLs, pero su producción a gran escala se restringe por la virulencia potencial que presenta. La cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027 es una cepa avirulenta que ha sido utilizado para sobreproducir monoRHLs y figura como candidata para llevar a escala la producción de estos surfactantes.

Por otra parte, la expresión de RhlC ha mostrado aumentar los niveles de RHLs totales, así como producir varios congéneros de diRHLs con un valor comercial alto, por lo que la expresión en trans de RhlC para producir diRHLs debe estudiarse.

### 4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de RhlC aumentará los niveles de RHLs totales al redireccionar para la síntesis de estos biosurfactantes el flujo de los precursores de ácidos grasos y de la d-TDP L-ramnosa.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de RhlC sobre la producción de RHLs en *P. aeruginosa* ATCC 9027.

#### 5.2 Objetivos particulares

1. Determinar el tiempo de máxima producción de RHLs y PHAs *P. aeruginosa* ATCC 9027.
2. Cuantificar la producción de RHLs y PHAs expresando a *rhlC* en un vector en *P. aeruginosa* ATCC 9027.

3. Aumentar la producción de monoRHLs y diRHLs por medio de la expresión de *rhlR-rhlC* y *rhlABR-C* en un vector .

4. Evaluar el efecto de la producción de RHLs de *P. aeruginosa* ATCC 9027 sobre la virulencia en larvas de *Galleria mellonella*.

## 6. MÉTODOS

### 6.1 Plásmidos y cepas utilizadas.

En este trabajo se emplearon los plásmidos, cepas y oligonucleótidos descritos en la Tabla 1 y 2.

**Tabla 1. Plásmidos y cepas utilizadas.**

Plásmido	Descripción	Referencia
pHERD30T	Vector de expresión bajo el promotor AraBAD. Gm <sup>R</sup>	Qiu et al. (2008)
p30-C	Derivado de pHERD30T que expresa <i>rhlC</i> bajo el promotor AraBAD.	Este trabajo
pUCP24	Vector de expresión bajo el promotor <i>lac</i> . Gm <sup>R</sup>	West et al. (1994)
pJMG1- <i>rhlR</i>	Derivado del pUCP24 que expresa <i>rhlR</i> de PAO1 bajo su propio promotor.	Grosso-Becerra et al. (2016)
pJMG4- <i>rhlAB-R</i>	Derivado del pUCP24 que expresa el operón <i>rhlAB-R</i> de PAO1 bajo su propio promotor.	Grosso-Becerra et al. (2016)
p24-C	Derivado del pUCP24 que expresa <i>rhlC</i> de PAO1 bajo el promotor <i>lac</i> .	Este trabajo
pRC	Derivado del pJMG1- <i>rhlR</i> que expresa <i>rhlC</i> de PAO1 bajo el promotor de <i>rhlR</i> .	Este trabajo
pABRC	Derivado del pJMG4- <i>rhlAB-R</i> que expresa <i>rhlC</i> de PAO1 bajo el promotor de <i>rhlAB-R</i> .	Este trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
DH5a	Φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ[ <i>lacZYA-argF</i> ]U169 <i>endA recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44</i>	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	MPAO1 silvestre, aislada en Australia (1950)	Holloway (1955)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	Aislado de infección de oído medio.	ATCC

Gm= Gentamicina.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados**

Número	Nombre	Secuencia (5'-3')	TM
1	rhlCFwN1 <i>NcoI</i>	GGAGA <u>ACCATGGT</u> CATGGACCGGATAGACATGGG	60°C
2	rhlCFwE1 <i>EcoRI</i>	AGAAGAG <u>AATTC</u> ATGGACCGGATAGACATGGG	60°C
3	rhlCReH3 <i>HindIII</i>	GCGTTT <u>AAGCTT</u> CTAGGCCTTGGCCTTGCCGG	60°C
4	FwH3rhlC <i>HindIII</i>	CGGGCT <u>AAGCTT</u> GGCCTGGCAACTTCGACCTA	60°C
5	m13 hind-F	CCCAGTCACA <u>AAGCTT</u> GTAAAAC	60°C
6	m13/pUC RE	TTGTGAGCGGATAACAATTTC	60°C
7	pHERD20T_Fw	ATTAGCGGATCCTACCTGAC	60°C
8	pHERD20T_Rv	CTGCAAGGCGATTAAGTTGG	60°C
9	rhlRInFw	TTCGACGCGCCGAACAAGAC	60°C
10	rhlCInFw	CGCACCTCGTTCCTGATCTC	60°C
11	rhlCInRe	AGTTCCTCGTCGAAGTGGCC	60°C

Los nucleótidos subrayados indican el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción utilizadas (en negrita).

## 6.2 Condiciones de crecimiento

Todos los preinóculos se crecieron ON (Over Night) a 37 °C con agitación (225 rpm) en 15 mL de medio LB (Luria-Bertani: triptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) con antibiótico, en caso de ser necesario, para *P. aeruginosa*: Gm 100 µg/mL, para *E. coli*: 30 µg/mL.

El medio PPGAS (Protease Peptone-Glucose-Ammonium Salts) utilizado para la producción de RHLs fue inoculado a partir del ON a una DO inicial= 0.01, y crecido por 24 horas a 37 °C con 225 rpm.

## 6.3 Manipulación de material genético

Para la extracción de DNA genómico y plasmídico se utilizaron los kits DNeasy® Blood & Tissue Kit y Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, respectivamente, siguiendo al pie de la letra los instructivos.

## 6.4 Condiciones de PCR

Con el fin de amplificar y verificar las construcciones se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes volúmenes:

Reactivo	Phusion	GoTaq
DNA/plásmido (100 ng/µL)	1 µL	1 µL
Oligo Forward (10 pmol/ µL)	0.5 µL	0.5 µL
Oligo Reverse (10 pmol/ µL)	0.5 µL	0.5 µL
dNTPs (10 mM)	0.5 µL	0.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	-	4 µL
Buffer 5x + MgCl <sub>2</sub>	5 µL	5 µL
H <sub>2</sub> O dd	17.25 µL	13.3 µL
Polimerasa	0.25 µL	0.25 µL

Los programas utilizados para cada polimerasa fueron:

<b>Phusion</b>		<b>GoTaq</b>
30 seg. ----98°C		3 min. ----95°C
10 seg. ----98°C	} 29 ciclos	30 seg. ----95°C
30 seg. ----60°C		30 seg. ----60°C
1:10 min. ----72°C		1: 10 min. ----72°C
5 min. ----72°C		5 min. ----72°C

### 6.5 Electroforesis en gel de agarosa

Todas las muestras derivadas de las extracciones genómicas, plasmídicas, digestiones enzimáticas y productos de PCR, se separaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa de entre 1 a 0.7 %, de acuerdo al tamaño de las bandas esperadas, con amortiguador TAE 1X a 120V por 35 minutos. Terminada la corrida, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio por 15 minutos y finalmente se observaron bajo luz ultravioleta.

### 6.6 Clonación

Una vez que se amplificaron las bandas por medio de PCR con la polimerasa Phusion, las bandas correspondientes a *rhlC* se purificaron utilizando el kit Wizar® SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo el instructivo al pie de la letra. La siguiente tabla muestra los oligos y sitios utilizados para cada construcción realizada:

<b>Plásmido</b>	<b>Sitios</b>	<b>Número de oligo</b>
<b>p30-C</b>	<i>NcoI-HindIII</i>	1-3
<b>p24-C</b>	<i>EcoRI-HindIII</i>	2-3
<b>pR-C</b>	<i>HindIII-HindIII</i>	3-4
<b>pABR-C</b>	<i>HindIII-HindIII</i>	3-4

Para las digestiones se utilizaron: 150 ng del producto de PCR purificado + 1.5  $\mu$ L de Buffer correspondiente + 1  $\mu$ L de enzima + H<sub>2</sub>O dd (llevándolo a un volumen de 15  $\mu$ L) y 200 ng de vector + 3  $\mu$ L de Buffer correspondiente + 1  $\mu$ L de enzima + H<sub>2</sub>O dd (llevándolo a un volumen final de 30  $\mu$ L). Las digestiones se realizaron utilizando ambas enzimas, y se incubaron por 3 horas a 37° C.

Los insertos y los vectores digeridos se ligaron utilizando: 50 ng de vector + 100 ng de inserto + 2  $\mu$ L de buffer T4 ligase + 1  $\mu$ L de ligasa T4 (1U/  $\mu$ L) y se llevó a un volumen de 20  $\mu$ L finales con H<sub>2</sub>O dd. Esta mezcla se incubó a 4° ON.

Posteriormente se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y se dejaron crecer en cajas de LB agar Gm 30  $\mu$ g/mL. Al día siguiente se tomaron al menos dos candidatas, se les extrajo el DNA plasmídico y se mandaron a secuenciar con los oligos: 7 y 8 para el p30-C, 5 y 6 para el p24-C y 9,10 y 11 para los plásmidos pRC y pABRC, a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, IBt UNAM.

### **6.7 Transformación de *P. aeruginosa***

De un ON de 15 mL en medio LB, se tomó 1 mL de cultivo en esterilidad, y se centrifugó por 3 minutos a 14 000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió con 1 mL de solución con sacarosa al 10%, se repitió el paso 2 veces más para resuspender en un volumen final de 80  $\mu$ L de la solución con sacarosa al 10%.

Se mezclaron 3  $\mu$ L de plásmido (200 ng/  $\mu$ L) con 80  $\mu$ L de células competentes en una celda de electroporación y se les dio un pulso eléctrico E1 de Micropulser Biorad. Posteriormente se recolectaron las células en 1 mL de medio LB en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se incubaron por 1 hora a 37 °C con 225 rpm. Cuando terminó la incubación, los tubos se centrifugaron por 3 minutos a 140,00 rpm, se desecharon aproximadamente 900  $\mu$ L del sobrenadante y con el resto se resuspendió la pastilla celular para cultivarla en cajas de LB agar + Gm 100  $\mu$ g/mL, para incubarlas por 18 horas a 37 ° C.

### **6.8 Extracción y cuantificación de RHLs**

Se centrifugó 1 mL de medio (3 minutos a 14 000 rpm), se colectó el sobrenadante y se dividió en tres partes de 333  $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf. Posteriormente, se le adicionó a cada tubo, 1 mL de éter y se mezclaron vigorosamente en vórtex por 30 segundos, se centrifugó nuevamente. La fase orgánica (éter) se pasó a un nuevo tubo para evaporar el éter y se repitió una vez más esta extracción. Los tubos de éter se dejaron secar por un día dentro de la campana de extracción hasta evaporar completamente el solvente

Los RHLs extraídos se resuspendieron en 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  dd, se mezclaron y se incubaron a 37 °C por al menos 12 horas.

Para la cuantificación por medio de la técnica de orcinol (Chandrasekaran and Bemiller 1980), se preparó una solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 60% con orcinol al 1.6 %.

En tubos de ensaye de polipropileno, se elaboró una curva de ramnosa de 0 a 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por triplicado para cada concentración. También por triplicado, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se agregó 900  $\mu\text{L}$  de la mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ +orcinol. Los tubos se agitaron con vórtex e hirvieron a baño María por 30 minutos a 80 °C.

Las muestras se dejan enfriar y se cuantifican en una celda de cuarzo a 421 nm; las absorbancias obtenidas por las muestras se correlacionan con las absorbancias de la curva estándar de ramnosa para obtener los  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , utilizando a los tubos sin ramnosa como blancos.

Al igual que Grosso-Becerra et al. (2016), para observar la producción relativa de los ensayos, primero calculamos los equivalentes molares de ramnosa dividiendo la concentración de RHLs de la cuantificación por orcinol entre un factor de equivalencia obtenida al analizar la proporción de mono y diRHLs (ver Anexo). Para tener una comparación con una cepa dereceferncia, se correlacionaron los equivalentes molares de ramnosa de cada cepa con las obtenida para la cepa PAO1 (tomándola como el 100%).

### **6.9 Extracción y cuantificación de PHAs**

Se tomaron 2 mL de cada cultivo dentro de un mismo tubo eppendorf (por triplicado), se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se lavó con una solución salina al 0.8%. Posteriormente, se añadió 1mL de una solución de hipoclorito de sodio 10% y se incubaron a 37 °C por una hora.

Transcurrida la digestión por el hipoclorito desodio, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y se realizó un lavado con agua estéril para volver a centrifugar a 14,000 rpm, 10 minutos a 4 °C. Seguido de esto, la pastilla se lavó con 1 mL de acetona, se centrifugó bajo las mismas condiciones para posteriormente realizar otro lavado con 1 mL de isopropanol. La pastilla final se deja secar en campana de extracción por un día (Berger et al., 1989).

Para la cuantificación de PHAs, se incorporó 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a cada tubo, y se incubaron en baño María por 10 minutos. Las muestras frías se cuantifican en una celda de cuarzo a 235 nm, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro como blanco (Law y Slepecky, 1960).

A la absorbancia obtenida, se multiplica por el coeficiente 5.5128 µg/mL (que es el coeficiente de extinción del crotonato) para obtener la concentración de PHA en µg/mL.

### **6.10 Cromatografía en capa fina de RHLs**

Del sobrenadante del cultivo en PPGAS, se tomaron 5 mL y se les agregó 20 µL de HCl, para precipitar los RHLs a un un pH= 2. Se les colocó 5 mL de cloroformo:metanol (2:1) y se incorporó por 15 minutos. La mezcla se centrifugó a 4,000 rpm, 10 minutos a 4 °C , se recuperó la fase orgánica (cloroformo:metanol) dentro de un tubo de propileno limpio. La extracción se repitió una vez más, colectando la fase orgánica en el mismo tubo que en la primera extracción, los tubos se dejaron secar en la campana de extracción.

Una vez que quedaron aproximadamente 2 mL de la fase orgánica, se trasvasaron a un tubo eppendorf para secar completamente. Una vez seco, se añadió 100 µL de metanol.

En una placa de sílica (HPTLC 60 F254, MERK) de 10 cm de altura, se colocó 5  $\mu$ L de cada muestra (1  $\mu$ L por 1  $\mu$ L) en aproximadamente 1.5 cm del borde de la placa y dejando al menos 1.5 cm de separación entre cada muestra. Estándares de mono y diRHL o en su caso, extracto de la cepa PAO1 (productora de ambos RHLs) fueron utilizados.

Dentro de una cámara hermética de vidrio, se dispuso una mezcla de cloroformo:metanol:ácido acético (65:15:2) y se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente, la placa de sílica se introdujo a la cámara verticalmente, evitando que las muestras tuvieran contacto con la fase móvil. La cámara se cerró y la placa se mantuvo dentro hasta que el solvente llegó a 1cm antes del borde superior de esta. La placa se retiró y dejó secar, para asperjarla con una solución de  $\alpha$ -naftol. Para revelar las manchas rosas-rojas de ramnosa la placa se sometió a 80 °C.

#### **6.11 Análisis de TLC con ImageJ**

Las imágenes obtenidas de las TLCs se analizaron con el software ImageJ. Siguiendo las instrucciones para analizar bandas de western-blot (<https://www.youtube.com/watch?v=MINYgJeSKGY>). Posteriormente se hizo la relación del área de cada mancha tomando como 100% la suma de la dos manchas de mono y diRHL.

#### **6.12 Ensayos de virulencia en larvas de *Galleria mellonella*.**

Para realizar estos ensayos, las cepas se crecieron en medio LB con su respectivo antibiótico ON a 37 °C con 225 rpm. Al día siguiente, se reinocularon en 10 mL de medio LB sin antibiótico a una DO inicial de 0.1 y se dejaron crecer hasta una DO final de 0.4.

Posteriormente se tomaron 2 mL de cada cultivo por separado y se centrifugaron 3 minutos a 14,000 rpm. La pastilla celular se resuspendió en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril y uno de los tubos se leyó a una absorbancia de 600 nm, utilizando como blanco 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM, para conocer la DO final.

Una vez que se obtuvo la absorbancia, se realizaron los cálculos para diluir cada muestra a una DO igual a 0.1, se prosiguió a hacer 4 diluciones 1:100 (100µL de células + 900 µL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM), tomando 100 µL de cada disolución anterior, hasta llegar a tener una solución con  $1 \times 10^{-4}$  de células.

Se escogieron larvas de *Galleria mellonella*, de entre 2 y 3 cm de largo de color claro (sin pigmentación oscura), n=10 para cada cepa problema y n=5 para controles. De la dilución bacteriana  $1 \times 10^{-4}$  se inyectaron 20 µL, con una jeringa para insulina nueva y estéril, en el espacio entre las patas falsas y patas verdaderas de la larva.

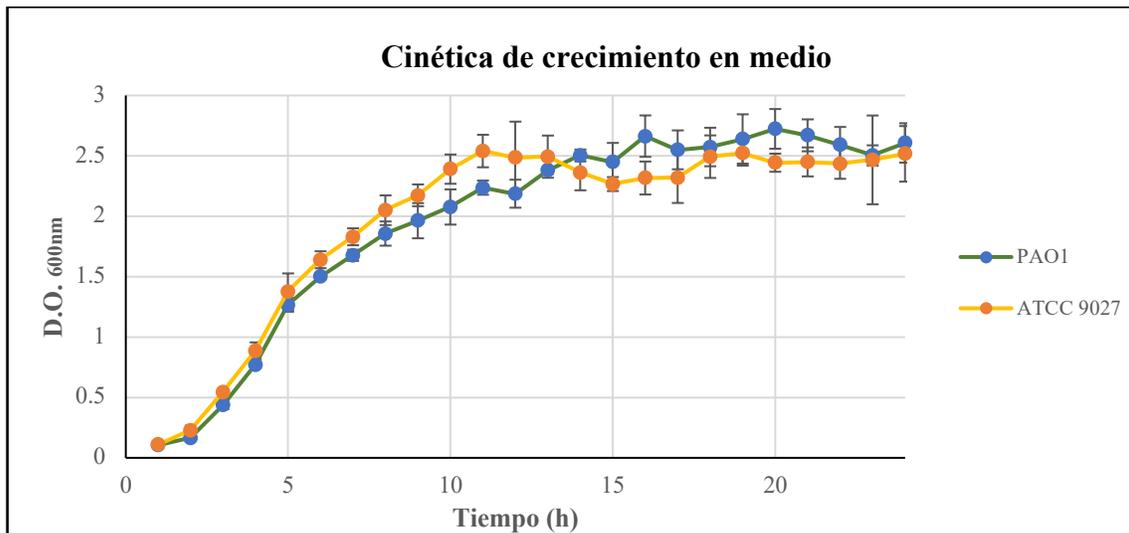
Como control positivo de infección se inyectó a la cepa PAO 1, como controles negativos se inyectaron MgSO<sub>4</sub> 10 mM y la cepa ATCC 9027. Las larvas se incubaron en cajas de Petri estériles a 37 °C por 24 horas.

Para el conteo de UFCs (Unidades Formadoras de Colonias), se cultivaron por goteo 10 µL de cada dilución en cajas de LB-Agar por sextuplicado, se incubaron ON a 37° C y se contaron. Posteriormente se correlacionó el número de UFCs a cada cepa (**Gráfica 14**).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Cinética de crecimiento y producción de RHLs y PHAs de PAO 1 y ATCC 9027 en medio PPGAS.**

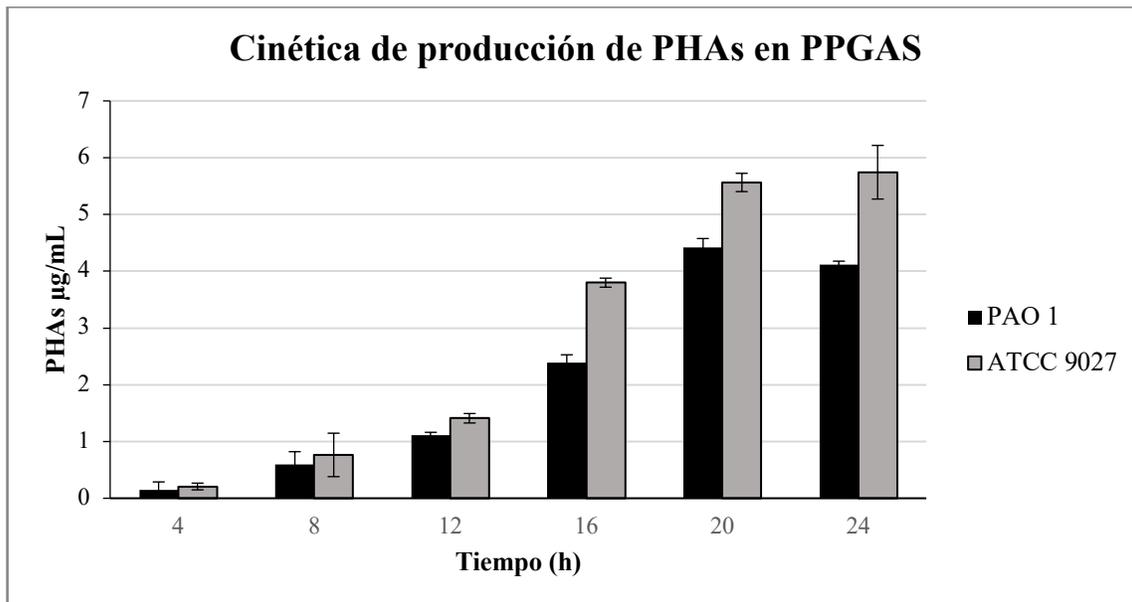
Como parte del proceso de producción, se realizaron curvas de crecimiento de la cepa tipo PAO 1 y de la ATCC 9027 en el medio de producción (PPGAS). Ambas cepas presentan un crecimiento similar, alcanzando la fase estacionaria a las 10 horas del cultivo (**Gráfica 1**). Este comportamiento se ha mostrado en cepas como la PA-14 bajo las mismas condiciones de cultivo (Gutiérrez-Gómez et al., 2018)



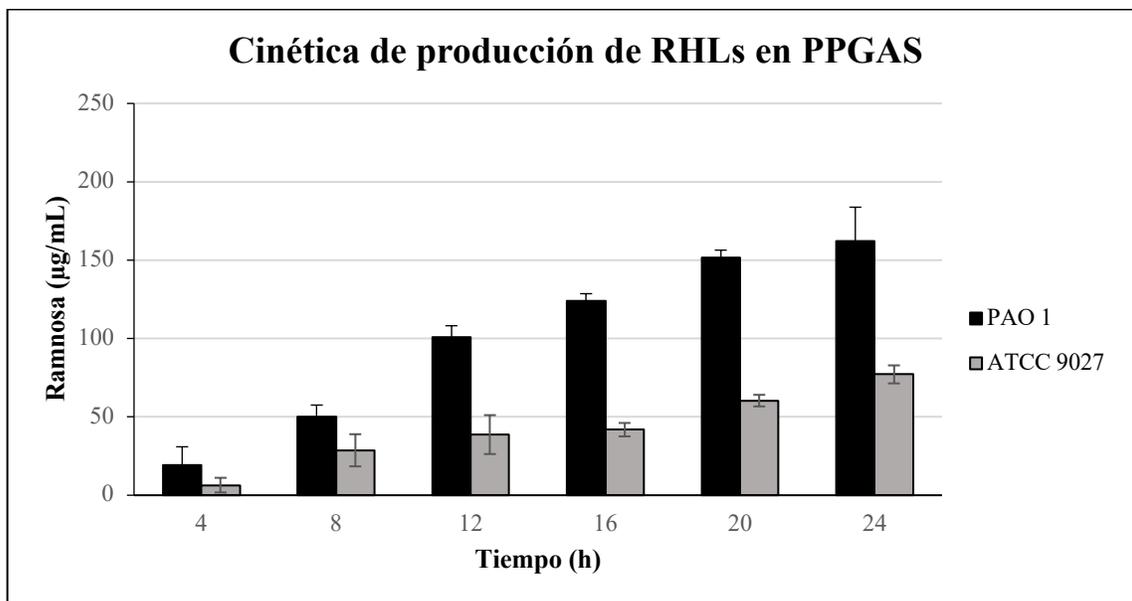
**Gráfica 1. Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 y ATCC 9027.** Cultivo en medio PPGAS a 37°C con 225 rpm, por 24 horas. Los puntos azules y naranjas representan el crecimiento de las cepas PAO1 y ATCC 9027, respectivamente.

Tanto en la PAO 1 como en la ATCC 9027, la síntesis de PHAs alcanza su punto máximo a las 20 horas (**Gráfica 2**), además la ATCC 9027 produce más PHAs que la PAO1 (4 µg/mL) a partir de las 16 horas, teniendo una concentración final de 5.74 µg/mL.

Por otra parte, en lo que concierne a la producción de RHLs, observamos que, a las 20 horas, la síntesis de RHLs alcanzó su punto máximo en ambas cepas (**Gráfica 3**). Dado esto, la toma para cuantificar los RHLs se estableció para las 24 horas.



**Gráfica 2. Cinética de producción de PHAs de las cepas PAO1 y ATCC 9027.** En barras negras se presenta la síntesis de PHAs ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en la cepa PAO1 y, en gris la de ATCC 9027.



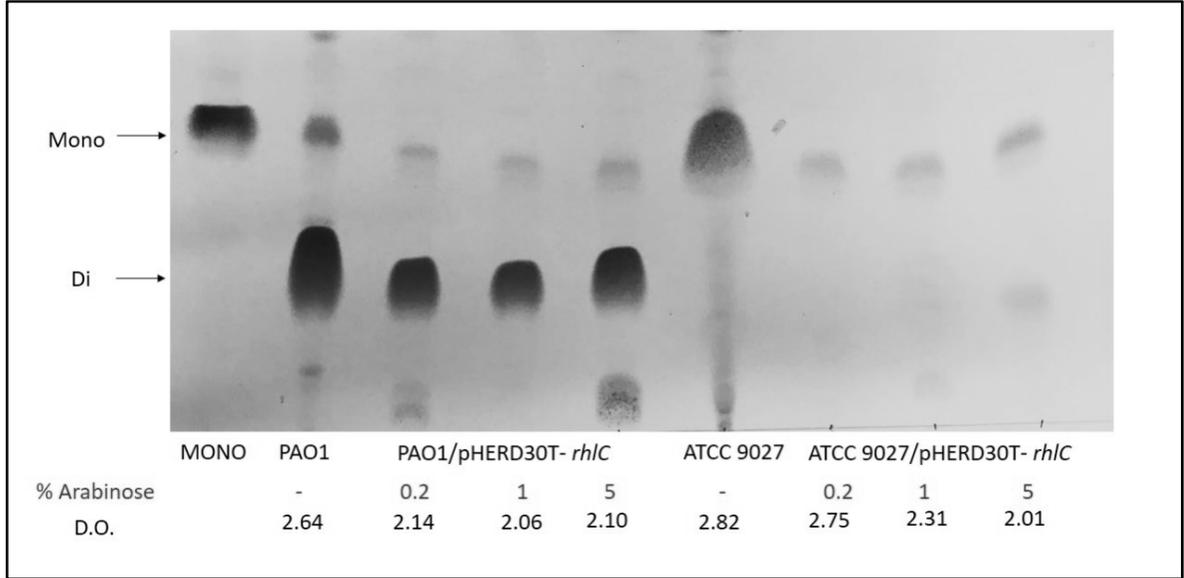
**Gráfica 3. Cinética de producción de RHLs de las cepas PAO1 y ATCC 9027.** En barras negras se presenta la producción de RHLs en la cepa PAO1, y en gris de la ATCC 9027.

## 7.2 Expresión de *rhIC* en trans en las cepas PAO1 y ATCC 9027.

Como se ha reportado que la expresión de RhIC aumenta los niveles totales de RHLs, probamos dos estrategias para sobreproducir RHLs expresando el gene bajo dos promotores diferentes: P<sub>BAD</sub> y P<sub>Lac</sub> (que es constitutivo en *P. aeruginosa*).

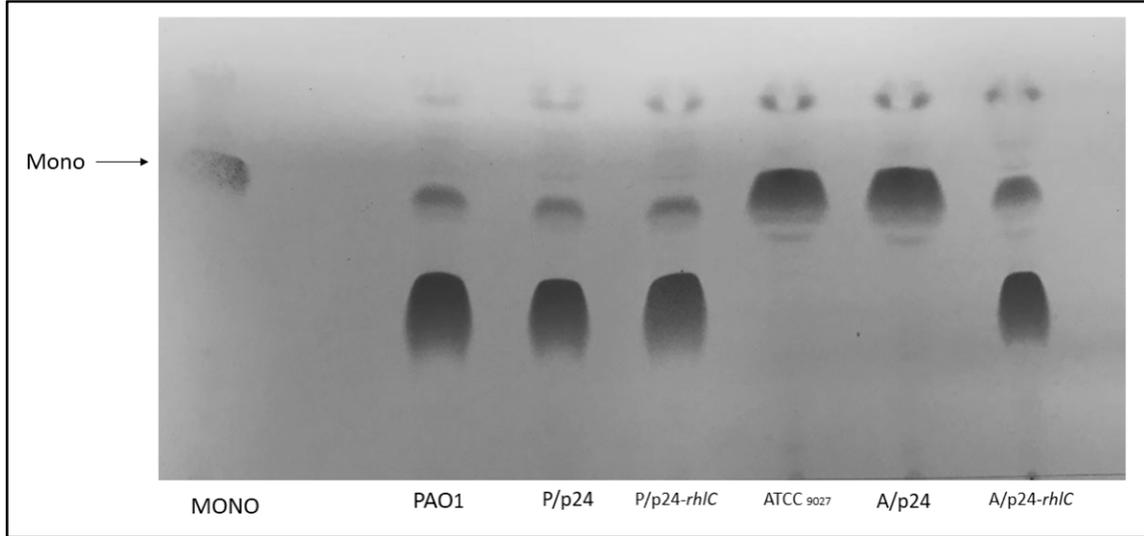
La expresión de RhIC bajo el promotor de arabinosa (p30T-C) no mostró la formación del diRHL en la cromatografía de capa fina (TLC), particularmente en la cepa ATCC 9027, cuando se indujo con 0.1% de arabinosa, por lo que se probaron diferentes concentraciones de arabinosa (0.2, 1 y 5%), en donde con 5% de arabinosa se observó la presencia de una mancha correspondiente al diRHL en la cepa ATCC 9027 (**Figura 6**).

Aunque, con la arabinosa se observó una disminución de monoRHLs en la TLC, el crecimiento celular en ambas cepas no se vió afectado (**Figura 6**). Los niveles de diRHLs presentados por la ATCC 9027/pHERD30T fueron tan bajos que apenas se observaron. Además, el uso de arabinosa para sobreproducir RHLs sólo aumenta los costos de producción e interfiere en el método de cuantificación al reaccionar con la mezcla de orcinol, por lo que esta estrategia no es viable para nuestros propósitos.

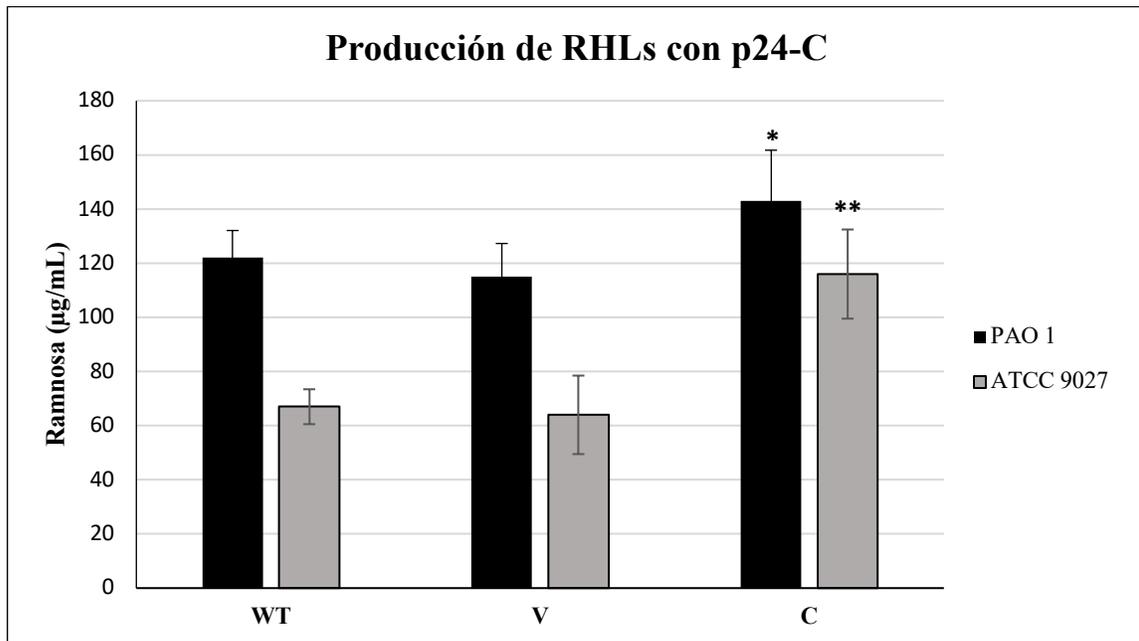


**Figura 6. Expresión de p30-C en PAO1 y ATCC 9027 bajo diferentes concentraciones de arabinosa.** Debajo de cada cepa se presentan: las concentraciones de arabinosa utilizadas, el – indica que no se añadió arabinosa, y las densidades ópticas (600nm) en medio PPGAS.

Por otra parte, al expresar a *rhlC* bajo el promotor *lac* (p24-C), se obtuvo la formación del diRHL en la cepa ATCC 9027 (**Figura 7**). En la cuantificación por orcinol de los RHLs, se obtuvo un incremento ( $117.54 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) respecto a la cepa silvestre ( $67.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la cepa con el vector vacío ( $62.48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (**Gráfica 4**).



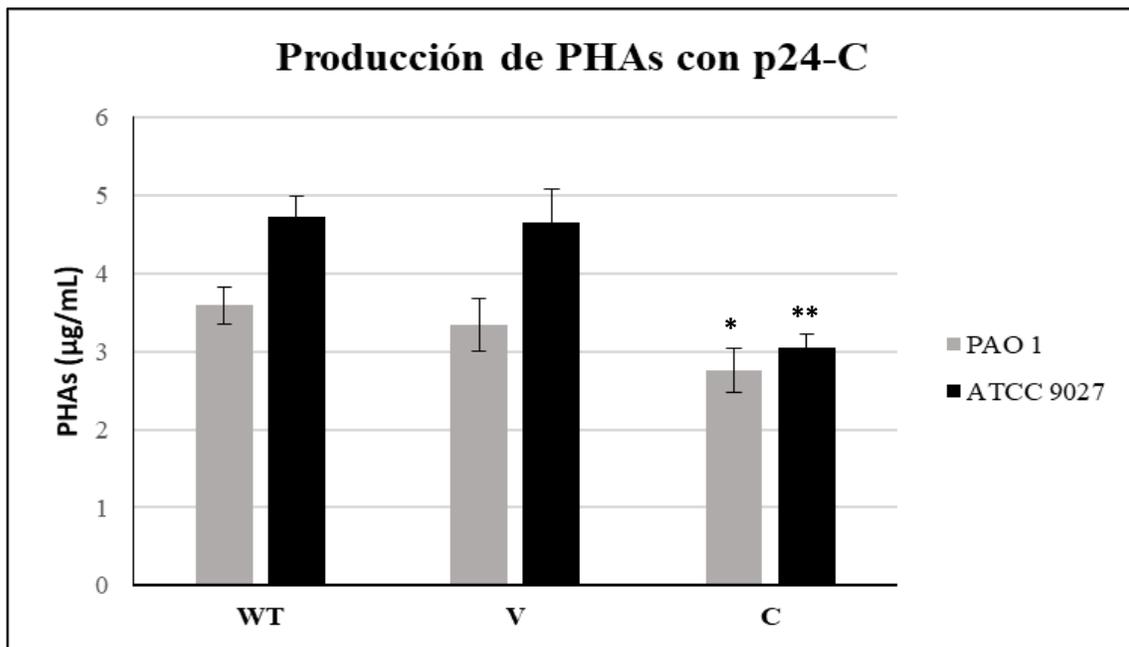
**Figura 7. Expresión en trans de *rhlC* bajo el promotor *lac* en PAO 1 y ATCC 9027.** Se presentan las cepas silvestres (PAO1 y ATCC9027), las cepas con el vector (P/p24 y A/p24) y expresando *rhlC* (P/p24-*rhlC* y A/p24-*rhlC*).



**Gráfica 4. Expresión de p24-C sobre la síntesis de RHLs en PAO 1 y ATCC 9027.** Se muestra la producción de RHLs en las cepas WT, con el vector (V) y expresando a *rhlC* bajo el  $P_{Lac}$  (C). Los asteriscos representan diferencias significativas, tomando como referencia las cepas WT, al realizar un ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ).

Por otra parte, la expresión de *rhlC* disminuyó los niveles de PHAs respecto a las cepas WT y con el vector, indicando que hay un redireccionamiento del flujo de los ácidos grasos hacia la ruta de los ramnolípidos (**Gráfica 5**). La presencia de RhlC en la ATCC 9027 evita el estancamiento de monoRHLs al tomarlos como precursores para la formación del diRHLs así RhlA compite con la ruta de PHAs en la toma de ácidos grasos disminuyéndolos.

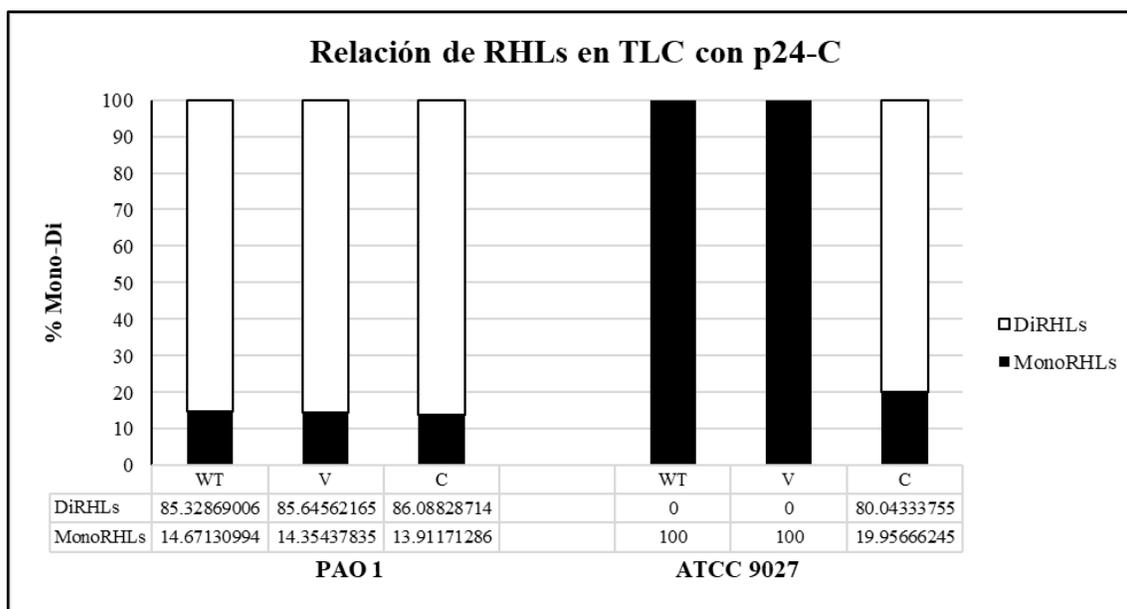
En la cepa PAO1, se observó incremento y disminución discreto en la síntesis de RHLs y PHAs, respectivamente. Este fenómeno podría deberse a: una limitación de dTDP-L-ramnosa, ya que como la PAO1 produce tanto mono como diRHLs, RhlC ya no tiene precursores de ramnosa para unirlos al monoRHL y sintetizar el diRHL (Olvera, 1999). Por otra parte, este estancamiento de diRHL, podría deberse a una inhibición por producto de RhlC o una regulación indirecta sobre esta enzima.



**Gráfica 5. Expresión de p24-C sobre la síntesis de PHAs en PAO 1 y ATCC 9027.** (WT) las cepas silvestres, (V) con vector vacío y (C) con el plásmido p24-C. Los asteriscos representan diferencias significativas, tomando como referencia las cepas WT, al realizar un ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ).

Como se mencionó antes, debido a que los diRHLs poseen dos moléculas de ramnosa y a que la cuantificación por método de orcinol se basa en la cantidad de ramnosas presentes, la cuantificación de los RHLs en cepas que producen diRHLs no corresponde directamente a la concentración de ramnosa que se mide por orcinol. Para obtener la cantidad de moléculas de RHLs se tomó el promedio de cuantificación de ramnosa de las cepas productoras de diRHL y se dividieron entre los factores de proporción de mono/diRHLs (**Gráfica 7**) obtenidas al analizar la relación de las manchas correspondientes al mono/diRHL en TLC (**Gráfica 6**).

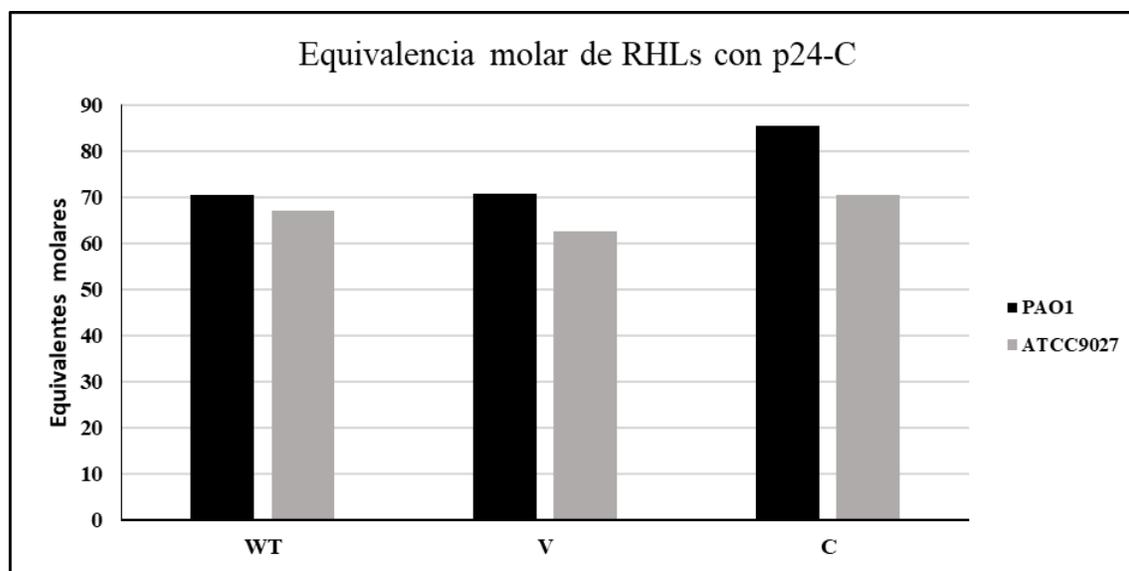
Los cálculos de factores de equivalencia molar y porcentaje de equivalentes de moléculas de RHLs expresando a RhIC bajo el promotor *lac*, se muestran en la **tabla 3**.



**Gráfica 6. Relación entre los monoRHLs y diRHLs en TLC expresando RhIC.** Se muestra el porcentaje entre el área de las manchas del mono y diRHL producidos por las cepas PAO1 y ATCC 9027 WT, (V) vector pUCP24 vacío y (C) p24-C.

**Tabla 3. Valores usados para calcular los equivalentes de moléculas de ramnosa expresando a RhlC.**

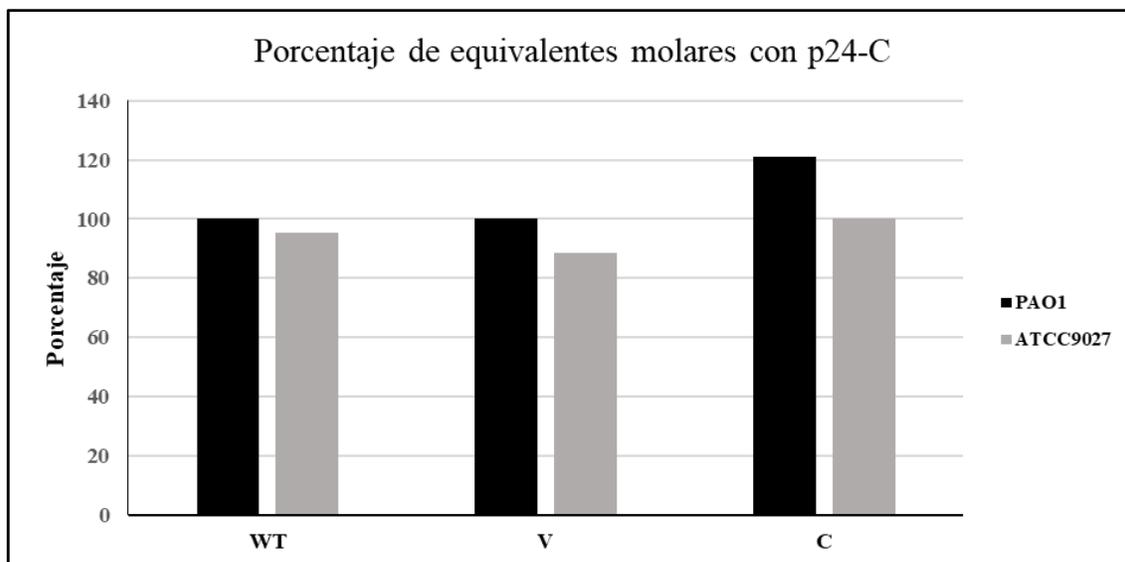
Cepa	Porcentaje de monoRHLs (A)	Porcentaje de diRHLs (B)	Factor de equi. A+B (C)	Concentración de ramnosa cuantificada (E)	Equivalente de moléculas de RHLs (C*E)	% de equivalentes de moléculas de RHLs con respecto a la PAO1
PAO1	0.15	0.425	0.575	122.705743	70.55580225	100
PAO1/p24	0.14	0.43	0.57	124.1207815	70.74884547	100.273604
PAO1/p24-C	0.14	0.43	0.57	149.8164594	85.39538188	121.032402
ATCC9027	1		1	67.17584369	67.17584369	95.2095243
ATCC9027/p24	1		1	62.48194198	62.48194198	88.5567735
ATCC9027/p24-C	0.2	0.4	0.6	117.5488455	70.52930728	99.9624482



**Gráfica 7. Equivalentes molares de RHLs en PAO1 y ATCC 9027 expresando *rhlC*.** Cepas silvestres (WT), vector (V) y con p24-C (C), para obtener los RHLs equivalentes se dividió el promedio total de las cepas entre su factor de equivalencia molar.

Una vez que obtuvimos el valor de equivalentes molares de RHLs, los valores de la ATCC 9027 se correlacionaron con los de la PAO1, tomando los valores de la cepa PAO1 WT como el 100% (**Gráfica 8**), para conocer el porcentaje de moléculas producidas por cada cepa.

En la gráfica 7 se presenta la proporción de moléculas entre las cepas, de las cepas silvestres PAO1 y ATCC 9027 la cantidad de moléculas son muy similares. Este resultado en particular se debe a que en la cuantificación por método de orcinol los niveles de la ATCC 9027 ( $67.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) corresponden aproximadamente al 50% de los niveles obtenidos en la PAO1 ( $122.70 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



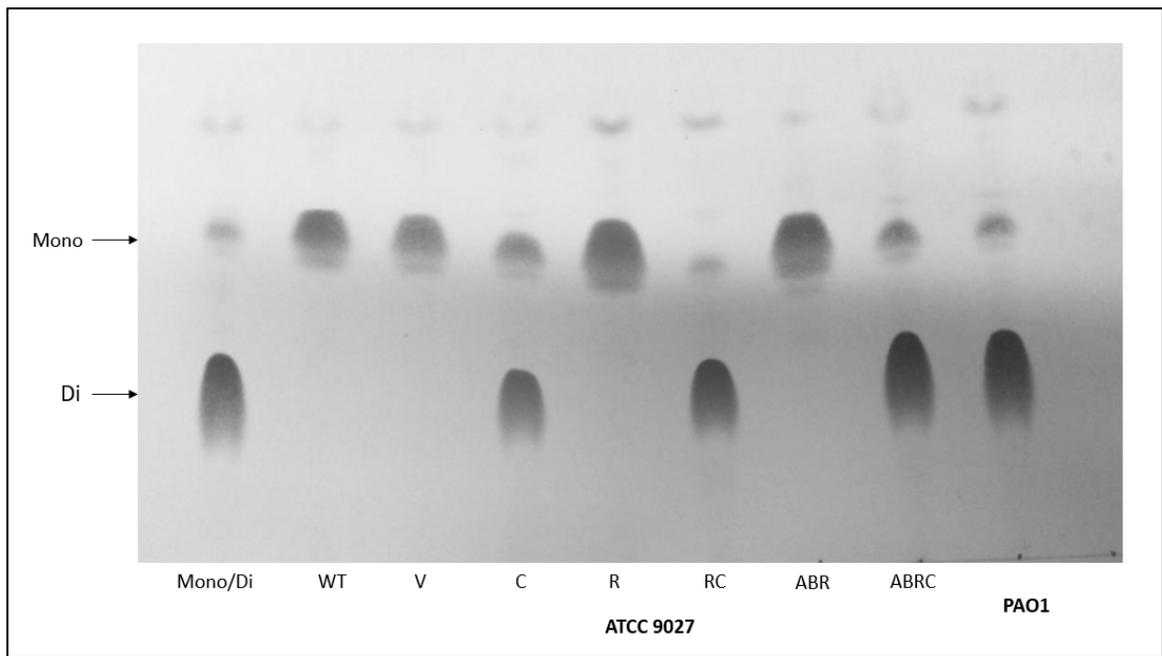
**Gráfica 8. Porcentaje de moléculas de RHLs de PAO1 y ATCC 9027 expresando *rhlC*.** Cepas silvestres (WT), vector (V) y con p24-C (C), para obtener la relación en porcentaje.

Al expresar a *rhlC* en ambas cepas se observó un incremento de la concentración de ramnosa a  $149.81 \mu\text{g mL}^{-1}$  en la PAO1 y, a  $117.54 \mu\text{g mL}^{-1}$  en la ATCC 9027, pero en la PAO1 la producción cuando expresa *rhlC* no aumentó como al expresar *rhlABR* o *rhlR*

(Grosso-Becerra et al., 2016), haciéndonos suponer que si existe una regulación a través de la síntesis del diRHL. Sin embargo, como anteriormente se mencionó, en la cepa ATCC 9027 este efecto no es tan visible, ya que el 80% de los RHLs producidos son diRHLs (**Gráfica 6**), y no se alcanza la proporción de la PAO1 (85%).

### 7.3 Expresión de pRC y pABRC

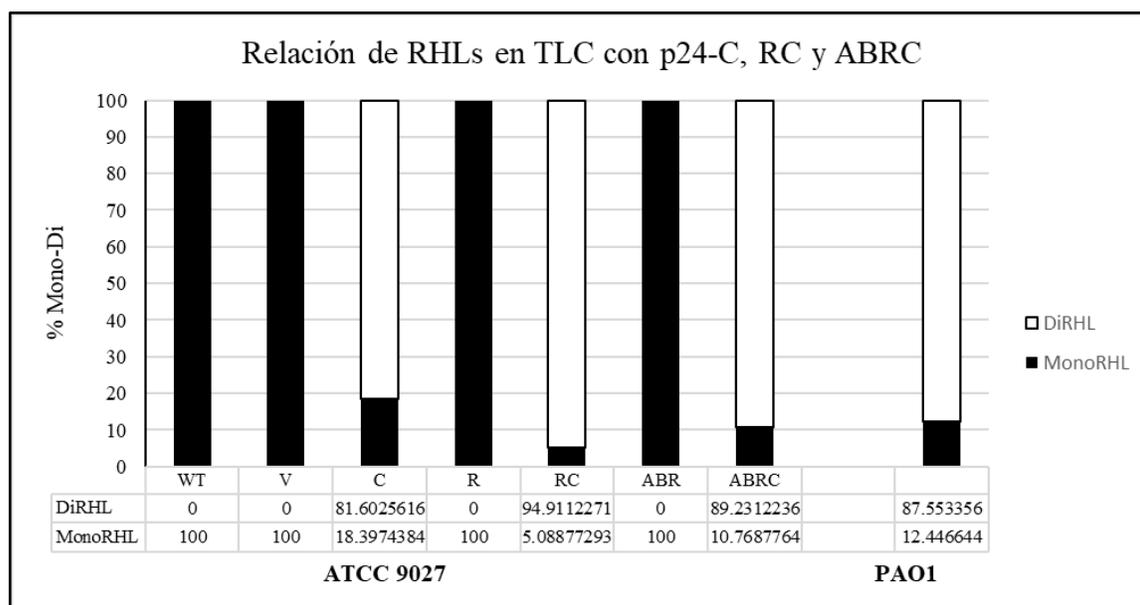
Ya que anteriormente se había obtenido un incremento de RHLs expresando *rhlR* y *rhlABR* que en la cepa ATCC9027 (Grosso-Becerra et al., 2016), se decidió expresar *rhlC* junto a *rhlR* o a *rhlABR* para aumentar los niveles de diRHLs.



**Figura 8. Expresión conjunta de *rhlC* con *rhlR* y *rhlABR* en la ATCC 9027.** Se muestra a la cepa PAO1 y sólo a la ATCC 9027 (WT) con: (V) vector pUCP24, ® p24-®(R) pJMG1-*rhlR*, (RC) p-RC, (ABR) pJMG-*rhlAB-R* y (ABRC) p-ABRC. Como RHLs estándar para RHLs se utilizó extracto de PAO1 (mono/di).

Las proporciones de mono y diRHLs se muestran en la **figura 7**, la cepa parental ATCC 9027 y con el vector, produjeron sólo monoRHLs al igual que las que llevan a *RhlR* y

RhlABR, sin embargo, la mancha del monoRHL fué visualmente menor tanto en la cepa parental como en la que lleva el vector. Al expresar RhlR-RhlC se obtuvo una disminución de la mancha correspondiente a monoRHLs en comparación con el monoRHL producido de todas las demás construcciones que llevan a *rhlC*. Sólo rhlABR-rhlC mostró un perfil de producción de mono y diRHL muy similar al de la PAO1.



**Gráfica 9. Relación entre los monoRHLs y diRHLs expresando a RhlC, RhlRC y RhlABRC.** Se muestra el porcentaje entre el área de las manchas del mono y diRHL producidos por la cepa ATCC 9027 (WT), (V) vector pU<sup>®</sup>4, (C<sup>®</sup>24-C, (R) pJMG1-*rhlR*, (RC) p-RC, (ABR) pJMG-*rhlAB-R* y (ABRC) p-ABRC y de la cepa PAO1.

Nuevamente en la ATCC 9027, la expresión de RhlC indujo la síntesis de diRHLs a una proporción del 81%, cuando RhlC fue expresado con RhlR la proporción de diRHLs se vió favorecida aumentando hasta el 95%, siendo esta la condición en la que más moléculas de diRHLs se obtuvieron. Con RhlABRC la proporción de mono/di cambió y fue parecido al perfil mono/di al de la PAO1, mono(11%)-di(89%) y mono(12%)-di(88%) respectivamente (**Gráfica 9**).

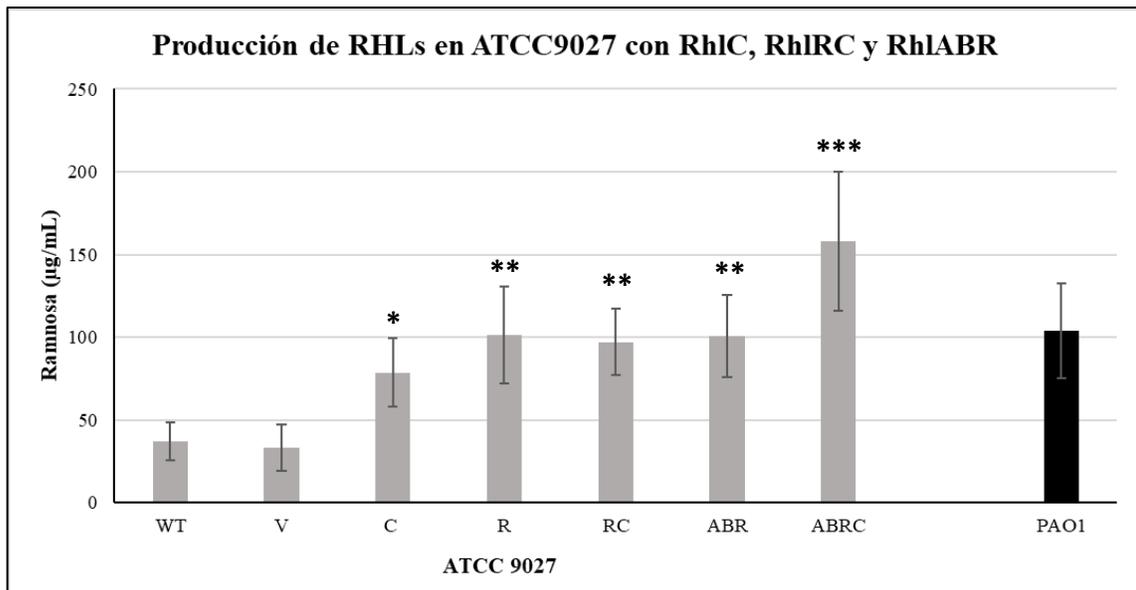
En cuanto a los niveles de síntesis de RHLs (**Gráfica 10**), la cepa ATCC 9027 con RhlABRC presenta la máxima concentración de ramnosa en RHLs ( $157.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) respecto a la cepa parental ( $36.86 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), la ATCC 9027 con RhlABR ( $100.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la PAO1 ( $103.67 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La expresión de RhlC nuevamente muestra un aumento en los niveles de RHLs, siendo esta la que menor incremento obtuvo ( $78.55 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

La ATCC 9027 con RhlABR y RhlR mostraron niveles similares de producción de monoRHLs,  $101.55 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $100.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Los niveles de ramnosa contenida en RHLs de la cepa ATCC 9027 expresando RhlRC ( $97.14 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fueron similares a los presentados con RhlR ( $100.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sin embargo, la cepa que expresa RhlR solamente sólo produjo monRHLs, mientras que cuando expresa RhlRC la proporción de diRHLs fué la más alta (respecto a las otras cepas), por lo que estos niveles representan en su mayoría a las moléculas de diRHLs.

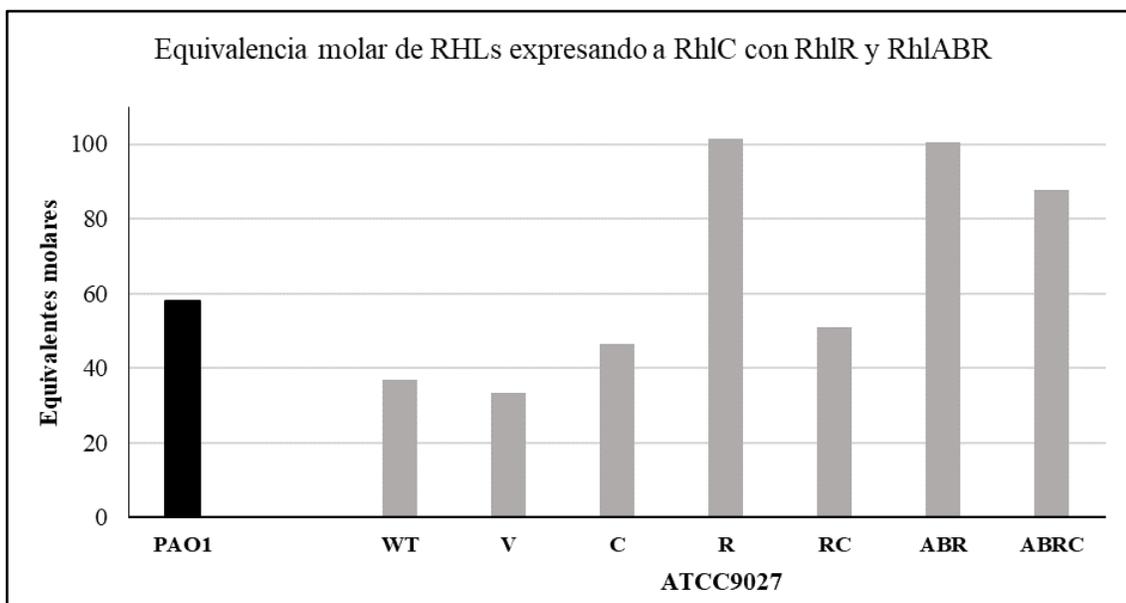
Dado lo anterior, de acuerdo a cómo se exprese *rhlC*, las proporciones entre mono y diRHL se modifican. Este efecto correlaciona con lo que Jin Du et al., (2017) obtuvo con cepas recombinantes de *E. coli*.

**Tabla 4. Valores usados para calcular los equivalentes de moléculas de ramnosa expresando a RhIC con RhIR y RhIABR.**

Cepa	Porcentaje de monoRHLs (A)	Porcentaje de diRHLs (B)	Factor de equi. A+B (C)	Concentración de ramnosa cuantificada (E)	Equivalente de moléculas de RHLs (C*E)	% de equivalentes de moléculas de RHLs con respecto a la PAO1
PAO1	0.12	0.44	0.56	103.6770063	58.05912355	100
ATCC9027	1		1	36.86606996	36.86606996	63.4974621
ATCC9027/p24	1		1	33.25934333	33.25934333	57.2853004
ATCC9027/p24-C	0.18	0.41	0.59	78.55885968	46.34972721	79.8319444
ATCC9027/prhIR	1		1	101.5392434	101.5392434	174.889384
ATCC9027/prhIRC	0.05	0.475	0.525	97.14657274	51.00195069	87.8448512
ATCC9027/prhIABR	1		1	100.5627309	100.5627309	173.207456
ATCC9027/prhIABRC	0.11	0.445	0.555	157.8792383	87.62297728	150.920255



**Gráfica 10. Producción de RHLs (medidos por la cantidad de ramnosa) en la cepa ATCC 9027 con plásmidos que permiten la expresión de RhIC, RhIRC y RhIABR.** (WT) cepa silvestre, (V) con pUCP24, (C) p24-C, (R) pJMG1-*rhlR*, (RC) p-RC, (ABR) pJMG-*rhlAB-R* y (ABRC) p-ABRC y de la cepa PAO1. Los asteriscos representan diferencias significativas, tomando como referencia las cepas WT, al realizar un ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ).

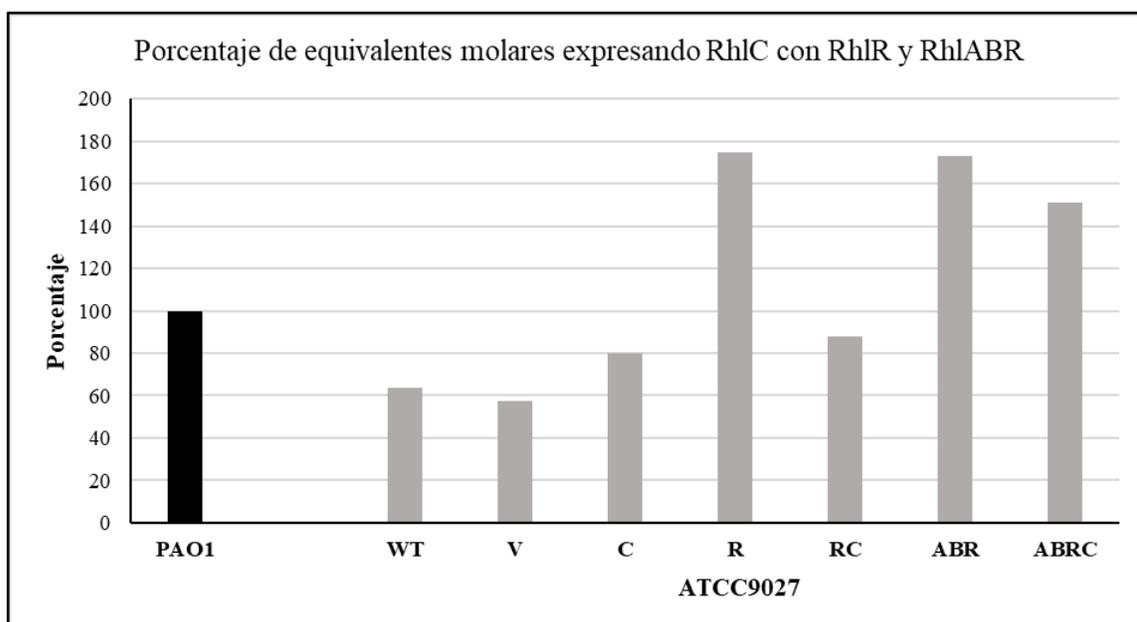


**Gráfica 11. Equivalentes molares de RHLs en ATCC 9027 con RhlC, RhlRC y RhlABRC.** (WT) cepa silvestre, (V) con pUCP24, (C) p24-C, (R) pJMG1-*rhlR*, (RC) p-RC, (ABR) pJMG-*rhlAB-R* y (ABRC) p-ABRC y de la cepa PAO1, para obtener los RHLs equivalentes se dividió el promedio total de RHLs entre el factor de equivalencia molar de cada cepa.

En la **gráfica 11**, se muestra la proporción de moléculas de RHLs entre la cepa PAO1 y las cepas de la ATCC 9027, el factor equivalencia molar para obtener estos datos se muestran en la Tabla 4. En este ensayo la cantidad de moléculas de las cepas parentales PAO1 y la ATCC 9027 fué diferente a la obtenida de la **gráfica 7**. Esto se debe al error técnico dentro de la cuantificación por método de orcinol, en donde los niveles de la ATCC 9027 (WT) y de la PAO1 (WT) son más altos en el primer experimento (**Gráfica 5**) que en este experimento (**Gráfica 10**).

La relación de equivalentes molares de RHLs entre la cepa PAO1 y ATCC 9027 (**Gráfica 11**) presenta que las moléculas en la ATCC 9027 son más bajas. Los datos para obtener las equivalencias molares y el porcentaje de equivalencia molar de RHLs se muestra en la **Tabla 4**.

La ATCC 9027 con RhlC no mostró un aumento en la cantidad de moléculas y este resultado no correlaciona con lo anteriormente visto (**Tabla 3**). Sin embargo, tanto para la ATCC 9027 con RhlR, RhlABR y RhlABRC se vió un gran incremento en la cantidad de moléculas producidas respecto de la PAO1. Por otra parte, la cepa con RhlABRC exhibió una disminución de equivalentes molares comparándolo con la que lleva RhlABR. Si esto fuera significativo, podría relacionarse con que en estas condiciones hay una limitante de precursores.



**Gráfica 12. Porcentaje de moléculas de RHLs de ATCC9027 con RhlC, RhlRC y RhlABRC.** (WT) cepa silvestre, (V) con pUCP24, (C) p24-C, (R) pJMG1-*rhlR*, (RC) p-RC, (ABR) pJMG-*rhlAB-R* y (ABRC) p-ABRC y de la cepa PAO1.

Posteriormente, para conocer el porcentaje de moléculas producidas por cada cepa, los valores de equivalentes molares de RHLs se correlacionaron con los equivalentes de la PAO1, tomando los valores de la cepa PAO1 WT como el 100% (**Tabla 4** y **Gráfica 12**).

Al expresar *rhIR* y *rhLABR* se observó un crecimiento de equivalentes molares respecto a la cepa PAO1. La síntesis de RHLs con RhLABRC aumenta hasta el 150.92% (contra la PAO1) aunque respecto a la RhLABR disminuye.

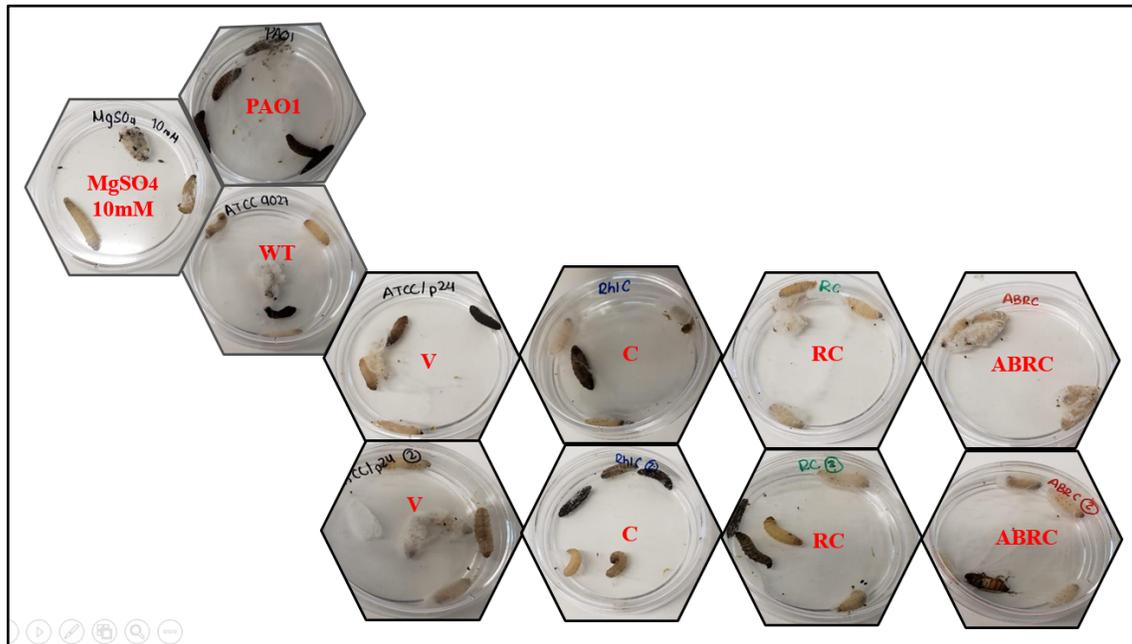
También existe una disminución del porcentaje de equivalentes de la ATCC 9027 con RC (87.84%) respecto a la PAO1 y a la ATCC 9027 con R (174.88% con respecto a la PAO1), pero la mayoría de las moléculas producidas corresponden más a diRHL y hay muy poco monoRHL, esto puede indicar que al expresar a *rhIC* bajo el promotor de *rhIR*, se expresa mejor. En esta condición particular, no parece que exista una limitante por ramnosa debido a que no se alcanzan los niveles de las cepas sobreproductoras (RhIR, RhLABR, RhLABRC). Sin embargo, al sintetizar mayoritariamente diRHLs estos podrían inhibir por producto a RhIC o bien, el diRHL podría comprometer la estabilidad de la membrana celular en esta condición en particular. Esto es diferente a cuando se expresa *rhLABR* que presenta una mayor proporción de monoRHLs respecto a la que expresa *rhIRC*, (95% vs 80%) (Al-Tahhan et al., 2000; Zeng, 2011; Liu et al., 2012).

#### **7.4 Ensayos de virulencia en larvas de *Galleria mellonella*.**

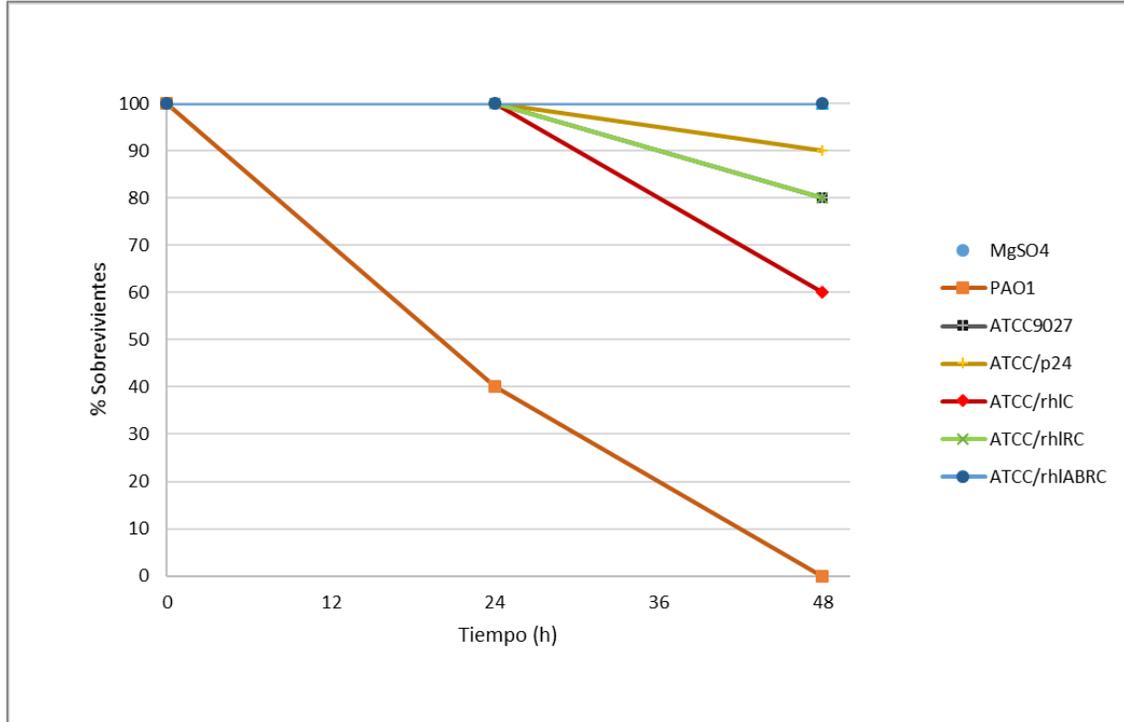
La utilización de larvas de *G. mellonella* para ensayos de virulencia, representa un modelo de infección válido, debido a que los resultados obtenidos de esta metodología correlacionan con aquellos ensayos en donde se usan otros modelos biológicos (Miyata et al., 2003). Además, dentro del laboratorio de la Dra. Gloria Soberón del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, se han realizados ensayos en estas larvas que posteriormente se validaron en el modelo de ratón (Grosso-Becerra et al., 2016). Se realizó un ensayo de virulencia con larvas de *G. mellonella* (n=10) con las cepas que se construyeron en este trabajo.

Como la cepa ATCC 9027 por sí misma representa un control de infección negativo (Soto-Aceves et al., 2019), decidimos establecer estos ensayos para conocer si el aumento de los RHLs, y el diRHL por si mismo, ayuda a la infección del hospedero (**Imagen 1**).

Los resultados obtenidos (**Imagen 1, Gráfica 13**) no son concluyentes debido a que en no todas las cepas correlacionaron con datos obtenidos previamente para la cepa ATCC9027 (Grosso-Becerra et al., 2016; Gutiérrez-Gómez et al., 2019; Soto-Aceves et al., 2019). Además, en estos ensayos, no se dilucidó si los diRHLs producidos representan por sí mismos un factor determinante en la infección al hospedero, por lo que las cepas deben someterse a otros ensayos de virulencia para aprobar su utilización en la producción de biosurfactantes a escala industrial



**Imagen 1. Infección de larvas de *G. mellonella*.** En la parte superior se muestra a las larvas infectadas por la PAO1 (control positivo), a la izquierda inyectadas con MgSO<sub>4</sub> 10 mM (control negativo), a partir del MgSO<sub>4</sub> hacia la derecha: ATCC9027 (WT), pUCP24 (V), p24-C (C), pRC (RC) y pABRC (ABRC).



**Gráfica 13. Porcentaje de larvas muertas.** Como control negativo se utilizó el diluyente MgSO<sub>4</sub> y la cepa ATCC 9027. La PAO 1 se utilizó como control positivo de infección.

Condición	UFC/mL
MgSO <sub>4</sub>	0
PAO1	26x10 <sup>6</sup>
ATCC9027	36x10 <sup>6</sup>
ATCC/p24	23x10 <sup>6</sup>
ATCC/rhIC	36x10 <sup>6</sup>
ATCC/rhIRC	26x10 <sup>6</sup>
ATCC/rhABRC	22x10 <sup>6</sup>

**Tabla 5. Conteo de UFCs de cada condición.** Se presentan las UFCs por mL obtenidas de cada condición: MgSO<sub>4</sub> 10 mM, PAO 1, ATCC 9027: (WT), pUCP24 (V), p24-C (C), pRC (RC) y pABRC (ABRC).

## 8. CONCLUSIONES

\*En medio PPGAS la producción máxima de RHLs y PHAs se da en fase estacionaria de crecimiento, alrededor de las 20 horas de cultivo de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y ATCC 9027.

\*La expresión de RhIC y la formación de diRHL se ven afectados por el promotor de expresión utilizado.

\*En la cepa ATCC 9027, la expresión constitutiva de RhIC en *trans*, redirige el flujo de ácidos grasos a favor de la síntesis de RHLs (catalizando la producción de diRHLs), al incrementar las moléculas totales de RHLs y disminuir los PHAs.

\*La expresión de RhIC en la PAO1 no modifica en gran medida la síntesis de RHLs y PHAs, respectivamente. Indicando que puede existir una limitante del precursor ramnosa.

\*La coexpresión de RhIC con RhIR y RhLABR promueve la síntesis de diferentes niveles de diRHL,

\*Los niveles más altos de RHLs ( $157.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) cuantificados por método de orcinol se obtuvieron en la cepa ATCC 9027 expresando los genes *rhlABRC*. Sin embargo, respecto a las sobreproductoras de monoRHLs (ATCC con RhIR y RhLABR) no incrementa los equivalentes molares de RHLs (Tabla 4).

\*Se obtuvo una cepa productora de una alta proporción de diRHL con respecto a los monoRHLs al expresar *rhlRC* con un título de  $97.14 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 9. PERSPECTIVAS

- \*Caracterizar los congéneros de RHLs producidos por las cepas recombinantes de la ATCC 9027.
- \*Evaluar el efecto que tienen los RHLs, principalmente el diRHL, sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de la membrana celular de las cepas productoras.
- \*Estudiar la regulación enzimática de RhlC, para producir mayores niveles de diRHL.
- \*Dilucidar el poco incremento de RHLs en la cepa PAO1 al expresar *rhlC*.
- \*Expresar las construcciones de RhlC en diversos fondos genéticos para encontrar nuevas candidatas de cepas sobreproductoras.
- \*Evaluar la capacidad de infección de cada una de las cepas construídas en este trabajo, en modelo de ratón.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- \*Alves L, do Nascimento D, Angelo L, Torres R, da Silva M. 2016. **Systemic infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a dog.** Acta Scientiae Veterinae, 44(Supl. 1): 164. <<http://www.redalyc.org/pdf/2890/289043698063.pdf>>
- \*Anderson A, and Dawes, E. 1990. **Ocurrence, Metabolism, Metabolic role, and Industrial uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates.** Microbial Reviews. 54:450-472. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372789/>>
- \* Albus A, Pesci E, Runyen-Janecky E, West S, Iglewski B. 1997. **Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*.** Journal of Bacteriology 179 (12): 3928-3935 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179201/>>
- \*Arino S, Marchal R, Vandecasteele J. 1996. **Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas* species.** Appl Microbiol Biotec, 45: 162-168. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s002530050665>>
- \*Basso P, Ragno M, Elsen S, Reboud E, Golovkine G, Bouillot S, Huber P, Lory S, Faudry E, Attrée I. 2017. ***Pseudomonas aeruginosa* poreforming exolysin and type IV pili cooperate to induce host cell lysis.** mBio 8: e02250-16. <<https://doi.org/10.1128/mBio.02250-16>>
- \*Berger E, Ramsay J, Ramsay C, Chavarie C. 1989. **PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB Biomass.** Biotechnol Technol, 3: 227-232. <<https://dx.doi.org/10.1007%2FBF01876053>>
- \*Bhattacharjee S, Basnet M, Tufenkji N, Ghoshal S. 2016. **Effects of Rhamnolipid and Carboxymethylcellulose Coatings on Reactivity of Palladium-Doped Nanoscale Zerovalent Iron Particles.** Environ. Sci. Tech., 50: 1812-1820. <[10.1021/acs.est.5b05074](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05074)>
- \*Bharali P, Saikia J, Paul S, Konwar B. 2013. **Colloidal silver nanoparticle/rhamnolipid (SNPRL) composite as novel chemotactic antibacterial agent.** Inter. J. Biolog. Macromol., 61: 238-242.<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.006>>
- \*Boukerb A, Marti R, Cournoyer B. 2015. **Genome Sequence of Three Strains of the *Pseudomonas aeruginosa* PA7 Clade.** Genome Announc 3(6):e01366-15. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4653800/>>
- \*Caiazza N, Shanks R, O'Toole G. 2005. **Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*.** J Bacteriol, 187(21): 7351-7361. <<https://jlb.asm.org/content/187/21/7351.long>>

- \*Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme L. 2001. **A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism.** Proc Natl Acad Sci USA, 98(5): 14613-14618. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724939>>
- \*Chemani C, Imberty A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, P.Guery B, Faure K. 2009. **Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands.** Infection and Immunity Apr, 77(5): 2065-2075 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19237519>>
- \*Chrzanowski L, 2009 a. Rhamnolipids reduce toxicity of phenols: The authors compilation. Society for Applied Microbiology. Lett Appl Microbiol, 48: 756-762. En: Chrzanowski L, Lawniczak L, Czaczyk K. 2012. **Why do microorganisms produce rhamnolipids?.** World Microbiol Biotechnol, 28(2): 401-419. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270259/>>
- \*Chrzanowski L, Lawniczak L, Czaczyk K. 2012. **Why do microorganisms produce rhamnolipids?.** World Microbiol Biotechnol, 28(2): 401-419. <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270259/>](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270259/)
- \*Clarke K, Ballot F, Reid S. 2010. **Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation.** World J Microbiol Biotechnol, 26: 2179-2184 <[https://www.researchgate.net/publication/225319573\\_Enhanced\\_rhamnolipid\\_production\\_by\\_Pseudomonas\\_aeruginosa\\_under\\_phosphate\\_limitation](https://www.researchgate.net/publication/225319573_Enhanced_rhamnolipid_production_by_Pseudomonas_aeruginosa_under_phosphate_limitation)>
- \*Cooper D. 1984. En: Ratledge C, Dawson P, Ra J. **Unusual aspects of biosurfactant production.** Biotechnology for oils and fat industry. American Oil Chemists Society, Illinois, 281-287. En: Chrzanowski L, Lawniczak L, Czaczyk K. 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids?. World J Microbiol Biotechnol, 28(2): 401-419. <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270259/>](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270259/)
- \*Costa S, Nitschke M, Lepine F, Deziel E, Contiero J. 2010. **Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater.** Proc Bioch, 45: 1511-1516. <<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.procbio.2010.05.033>>
- \*Déziel E, Gopalan S, Tampakaki A, Lepine F, Padfield K, Saucier M, Xiao G, Rahme L. 2005. **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, 5(4): 998-1014. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04448.x>>

- \*Dézziel E. 2009. **Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors.** Microbiol Sgm. 155:712–23. 23. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246742>>
- \*Dobler L, Vilela L, Almeida R, Neves B. 2016. **Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting.** N Biotechnol, 33(1): 123-135. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26409933>>
- \*Du J, Zhang A, Hao J, Wang J. 2017. **Biosynthesis of di-rhamnolipids and variations of congeners composition in genetically engineered *Escherichia coli*.** Biotechnol Lett, 39: 1041-1048. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28374071>>
- \*Dubeau D, Déziel E, Woods D, Lépine F. 2009. ***Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids.** BMC Microbiol, <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-263>>
- \*Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P, Dubois Y, Timsit J-F, Maurin M, Attrée I. 2014. **A Type III Secretion Negative Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Employs a Two-Partner Secreted Exolysin to Induce Hemorrhagic Pneumonia.** Cell & Host Microbe 15(2): 164-176 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>>
- \*Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Dupont M-J, Laroche J, Larose S, Maaroufi H, Fothergill J, Moore M, Winsor G, Aaron S, Barbeau J, Bell S, Burns J, Camara M, Cantin A, Charette S, Dewar K, Déziel É, Grimwood K, Hancock R, Harrison J, Heeb S, Jelsbak L, Jia B, Kenna D, Kidd T, Klockgether J, Lam J, Lamont I, Lewenza S, Loman N, Malouin F, Manos J, McArthur A, McKeown J, Milot J, Maghra H, Nguyen D, Pereira S, Perron G, Pirnay J-P, Rainey P, Rousseau S, Santos P, Stephenson A, Taylor V, Turton J, Waglechner N, Williams P, Thrane S, Wrigth G, Brinkman F, Tucker N, Tümmler B, Winstaley C & Levesque R. 2015. **Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium.** Frontiers in Microbiol, 6:1036. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483767>>
- \*Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikovich A, Wiehlmann L, Schomburg D. 2010. **How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach.** Environ. Microbiol. 12(6), 1734–1747. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553553>>
- \*Guo Y, Hu Y, Gu R, Lin H. 2009. **Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146.** J. Colloid and Interf. Sci., 331(2): 356-363. < <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.039>>

- \*Hauser AR. 2009. **The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection.** Nat Rev Microbiol 7: 654–665. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680249>>
- \*Holloway B. 1955. **Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*.** J Gen Microbiol, 13: 572-581. <<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/13/3/mic-13-3-572.pdf?expires=1561676120&id=id&accname=guest&checksum=BFC03B6F63CDF57B70AB3710FB86568A>>
- \*Gai I, Song K. 2010. **Ratio and content of rhamnolipid determined using sugar development process.** Biotech, 20(2); 33-37. En: Shao B, Liu Z, Zhong H, Zeng G, Liu G, Yu M, Liu Y, Yan X, Li Z, Fang, Z, Zhang J, Zhao C. 2017. **Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and application in composting: A review.** Microbiol Res, 200: 33-44. < <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.005>>
- \*García-Ulloa II M, Ponce-Soto G-Y, González-Valdez A, González-Pedrajo B, Díaz-Guerrero M, Souza V, Soberón-Chávez G. 2019. **Two *Pseudomonas aeruginosa* clonal groups belongin to the PA14 clade are indigenous to the Churince system in Cuatro Ciénegas Coahuila, México.** Environ Microbio. < <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14692>>
- \*Girard G, Bloemberg G. 2008. **Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*.** Future Microbiol, 3(1): 97-106. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230038>>
- \*Grosso-Becerra V, González-Valdez A, Granados-Martínez M, Morales E, Servín-González L, Méndez J, Delgado G, Morales-Espinosa R, Ponce-Soto G, Cocotl-Yáñez M, Soberón-Chávez G. 2016. ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production.** Appl Microbiol Biotechnol, 100(23): 9995-10004. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566690>>
- \*Guerra-Santos L, Kappeli O, Fiechter A. ***Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continouos culture with glucosa as a carbon source.** Appl Microbiol Biotech, 48; 301-305. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6435520>>
- \*Gunter N, Nuñez A, Fett W, Solaiman D. 2005. **Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium.** Appl Environ Microbiol, 48: 301-305. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15870313>>
- \*Gunther N, Nuñez A, Fortis L, Solaiman D. 2006. **Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761.** J Ind Microbiol Biotech, 33: 914-920.

< <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10295-006-0169-1>  
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10295-006-0169-1>>

\*Gutiérrez-Gómez U, Soto-Aceves M, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2018. **Overproduction of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 by redirection of the carbon flux from polyhydroxyalkanoate synthesis and overexpression of the rhlAB-R operon.** *Biotecnol Lett*, 40(11-12): 1561-1566. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30264296>>

\*Gutiérrez-Gómez U, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2019. **Role of  $\beta$ -oxidation and de novo fatty acid synthesis in the production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(9): 3753-3760. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30919102>>

\*Harrison E, Carter M, Luck S, Ou H, He X, et al. 2010. **Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14.** *Infect Immun* 78: 1437–1446. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123716>>

\*He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, et al. 2004. **The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2530–2535. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14983043>>

\*Khalid H, Tehseen B, Sarwar Y, Hussain S, Khan W, Raza Z, Bajwa S, Kanaras A, Hussain I, Rehman A. 2019. **Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties.** *J. Hazardous Mat.*, 364: 441-448.< <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.049>>

\*de Kievit TR, and Iglewski BH. 2000. **Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships.** *Infect. Immun.* 68:4839–4849. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10948095>>

\*Köhler T, Kocjancic L, Barja F, van Delden C, Pechère J. 2000. **Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is depend on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili.** *J Bacteriol*, 182(21): 5990-5996. < <https://jlb.asm.org/content/182/21/5990.long>>

\*Law J, Slepecky R. 1961. **Assay of poly-B-hydroxybutyric acid.** *J Bacteriol*, 82(1): 33-36. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC279110/>>

- \*Lee VT, Smith RS, Tummler B, Lory S. 2005. **Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection.** *Infect Immun* 73(3): 1695–1705. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731070>>
- \*Lequette Y, Greenberg E. 2005. **Timing and localization of rhamnolipids synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.** *J Bacteriol*, 187(1): 37-44 < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601686>>
- \*Liu Z, Zeng Z, Zeng G, Li J, Zhong H, Yuan X, Liu Y, Zhang J, Chen M, Liu Y, Xie G. 2012. **Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on adsorption of phenol by *Penicillium simplicissimum*.** *Biores Tech*, 110: 468-473. < <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.092>>
- \*Liu Y, Zhang H, Liu Z, Jiang Y, Tan F, Zeng G, Lai M, He Y. 2014a. **Purification and characterization of the biosurfactant rhamnolipid.** *Se Pu*, 32(3): 248-255. En: Shao B, Liu Z, Zhong H, Zeng G, Liu G, Yu M, Liu Y, Yang X, Li Z, Fang Z, Zhang J, Zhao C. 2017. **Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review.** *Microbiol Res*, 200: 33-44. < <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.005>>
- \*Liu Y, Ma X, Zeng G, Zhong H, Liu Z, Jiang Y, Yuan X, He X, Lai M, He Y. 2014 b. **Role of low-concentration monorhamnolipid in cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas aeruginosa*: adsorption or lipopolysaccharide content variation.** *Appl Biotech*, 98(4): 10231-10241. En: Shao B, Liu Z, Zhong H, Zeng G, Liu G, Yu M, Liu Y, Yang X, Li Z, Fang Z, Zhang J, Zhao C. 2017. **Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review.** *Microbiol Res*, 200: 33-44. < <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.005>>
- \*Liu G, Zhong H, Yang X, Liu Y, Shao B, Liu Z. 2017. **Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review.** *Biotechnology and bioengineering*, 115: 796-814. < <https://doi.org/10.1002/bit.26517>>
- \*Luengo J, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera R. 2003. **Bioplastics from microorganisms.** *Curr Opin Microbiol*. 6(3) :251-260. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12831901>>
- \*Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2002. **Lung infections associated with cystic fibrosis.** *Clin Microbiol Rev* 15: 194–222. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932230>>
- \*Magalhaes L, Nitschke M. 2013. **Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin.** *Food Control*, 29: 138-142. < <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.foodcont.2012.06.009>>

- \*Mai-Prochnow A, Bradbury M, Ostrikov K, Murphy A. 2015. ***Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox active molecule phenazine.** PLoS One 10(6) :e0130373. < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130373>>
- \*Maier R, Soberón-Chávez G. 2000. ***Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications.** App Microbiol Biotech, 54(5): 625-633. < <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530000443>>
- \*Martínez-Toledo A, Ríos-Leal E, Vázquez-Duhalt R, González-Chávez M, Esparza-García J, Rodríguez-Vázquez R. 2006. **Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media.** Environ Technol, 27: 137-142. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506509>>
- \*Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, et al. (2008). **Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 3100–3105. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287045>>
- \*Medina G, Juárez K, Soberón-Chávez G. **The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone.** J Bacteriol. 2003;185:377–80. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486077>>
- \*Medina G, Juárez K, Valderrama B, Soberón-Chávez G. 2003. **Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhIR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter.** J Bacteriol.185:5976–5983. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14526008> >
- \*Mehdi S, Dondapati J, Rahman P. 2011. **Influence of nitrogen and phosphotous on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 using glycerol as a carbon source.** Biotech, 10(2); 183-189. < <https://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2011.183.189>>
- \*Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A. 2011. **The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in *ladS*.** PLoS ONE 6(12): e29113. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029113>>
- \*Miyata S, Casey M, Frank D, Ausubel F, Drenkard E. 2003. **Use of the *Galleria mellonella* caterpillars as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis.** Infect Immun, 71(5): 2404-2413. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704110>>

- \*Moradali M, Ghods S, Rehm, B. 2017. ***Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for Adaption, Survival and Persistence.** *Frot Cell Infect Microbiol*, 7: 39 <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5310132/pdf/fcimb-07-00039.pdf>>
- \*Nitschke M, Costa S, Contiero J, 2011. **Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest.** *Process Biochemistry*, 46(3); 621-630. <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511310004757?via%3Dihub>>
- \*Oberhofer T. 1979. **Growth of nonfermentative bacteria at 42 degrees.** *C. J Clin Microbiol*, 10(6): 800-804. <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC273274/>>
- \*Oliveira F, Vázquez L, Campos N, Franca F. 2009. **Production of rhamnolipid by a *Pseudomonas alcaligenes* strain.** *Process Biochem*, 44: 383-389. <  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.11.014>>
- \*Olvera C, Goldberg J, Soberón-Chávez G. 1999. **The *Pseudomonas aeruginosa* AlgC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis.** *FEMS Microbiol Lett*, 179(1): 85-90. <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10481091>>
- \*Onbasli D, Aslim B. 2009. Biosurfactant production in sugar beet molases by some *Pseudomonas* ssp. *J Environ Biol*, 30: 161-163 <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112880>>
- \*Pajarron A, Dekoster C, Heerma W, Schmidt M, Haverkamp J. 1993. **Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast-atom-bombardment tandem mass-spectrometry.** *Glycoconj J*, 10: 219-226. <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257850>>
- \*Pamp S, Tolker-Nielsen T. 2007. **Multiple roles of biosurfactants in strucyural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol*, 189(6): 2531-2519. <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220224>>
- \*Parry A, Parry N, Peilow C, Stevenson P. 2013. **Combinations of rhamnolipids and enzymes for improved cleaning.** Patent no. EP 2596087. <  
[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Combinations+of+Rhamnolipids+and+Enzymes+for+Improved+Cleaning&author=A.+J.+Parry&author=N.+J.+Parry&author=C.+Peilow&author=P.+S.+Stevenson&publication\\_year=2013&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Combinations+of+Rhamnolipids+and+Enzymes+for+Improved+Cleaning&author=A.+J.+Parry&author=N.+J.+Parry&author=C.+Peilow&author=P.+S.+Stevenson&publication_year=2013&)>
- \*Piljac T, Piljac G. 2007. **Use of rhamnolipids as Cosmetics.** Patent no. EP 1056462 B1. <  
<https://patents.google.com/patent/EP1056462B1/en>>

- \*Qiu D, Heath Damron F, Mima T, Schweizer H, Yo H. 2008. **P<sub>BAD</sub>-Based Shuttled Vectors for Functional Analysis of Toxic and Highly Regulated Genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. And Other Bacteria.** Applied and Environ Microbio, 74(23): 7422-7426 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2592904/>>
- \*Usher LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, et al. 2002. **Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection.** J Immunol 168: 1861–1868. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823520>>
- \*Valot B, Guyeux C, Rolland JY, Mazouzi K, Bertrand X, Hocquet D. 2015. **What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated.** PLoS One 10:e0126468. <[http:// dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126468](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126468)>
- \*Van Gennip M, Christensen L, Alhede M, Phipps R, Jensen P, Christophersen L, Pamp S, Moser C, Mikkelsen P, Koh A, Tolker-Nielsen T, Pier G, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. 2009. **Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes.** APMIS, 117(7): 537-546. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594494>>
- \*Verstraeten N, Braeken K, Dabkurami B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, Michiels J. 2008. **Living on a surface: swarming and biofilm formation.** Trends Microbiol, 16: 496-506. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.004>>
- \*Rahim R, Ochsner U, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam J, Soberón-Chávez G. **Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis.** Mol Microbiol, 40: 708-718.
- \*Rahman K, Rahman T, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat I. 2003. **Enhanced biorremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients.** Bioresource Tech. 90: 159-168. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12895559>>
- \*Read RC. 1992. **Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating.** J Appl Physiol 72:2271–2277. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629083>>
- \*Reboud E, Elsen S, Bouillot S, Golovkine G, Basso P, Jeannot K, Attrée I, Huber P. 2016. **Phenotype and toxicity of the recently discovered *exlA*-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide.** Environ Microbio, 18(10): 3425-3439 pp. <<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13262>>

- \*Rehman A, Raza Z, ur-Rehman S, Khalid Z, Subramani C, Rotello V, Hussain I. 2010. **Synthesis and use of self-assembled rhamnolipid microtubules as templates for gold nanoparticles assembly to form gold microstructures.** J. Colloid and Int. Sci., 347: 332-335. < doi:10.1016/j.jcis.2010.04.015>
- \*Rendell N, Taylor G, Somerville M, Todd H, Wilson R, Cole P. 1990. **Characterization of *Pseudomonas* Rhamnolipids.** Biochim Biophys Acta, 1045: 189-193. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2116178>
- \*Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, Dodson R, Harkins D, Shay R, Watkins K, Mahamoud Y, Paulsen IT. 2010. **Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7.** PLoS One 5:e8842. < http://dx.doi.org/10.1371/ journal.pone.0008842>
- \*Sachdev D, Cameotra, S. 2013. **Biosurfactants in agriculture.** Appl Microbiol Biotech. 97(3): 1005-1016. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23280539>
- \*Shao B, Liu Z, Zhong H, Zeng G, Liu G, Yu M, Liu Y, Yang X, Li Z, Zhendong F, Zhang J, Zhao C. 2017. **Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review.** Microbiolog Resear, 200; 33-44. < http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.005>
- \*Sharma M, Anand S. 2002. **Swarming: Acoordinated bacterial activity.** Current Scien, 83(6): 707-712. < https://www.jstor.org/stable/24106146>
- \*Stanghellini M, Miller, R. 1997. **Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens.** Plant Dis, 87: 4-12. < https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.1.4>
- \*Starkey M, Rahme L. 2009. Modeling ***Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts.** Nat Protoc, 4(2): 117-124 < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180083>
- \*Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey, MJ, et al. (2000). **Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen.** Nature 406, 959–964. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984043>
- \*Syed A, Rudden M, Smyth T, Dooley J, Marchant R, Banat I. 2019. **Natural quorum sensing inhibitors downregulated gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors.** App Microbio and Biotech, 103(8): 3521-3535 < https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-09618-0>
- \*Tremblay J, Richardson A, Lépine F, Déziel E. 2007. **Self-produced extracelular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behauiour.** Environ Microbiol, 9(10): 2622-2630. < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2007.01396.x>

- \*West S, Schweizer H, Dall C, Sample A, Runyen-Janeck L. 1994. **Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequenced of the región required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*.** Gene 148: 81-86. <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926843>>
- \*Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, et al. 2007. **Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*.** Proc Natl Acad Sci U S A 104: 8101–8106. <  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0609213104>>
- \*Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger K. 2007. **The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolip production, cell motility, and biofilm formation.** J Bacteriol, 189(18): 6695-6703. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631636>>
- \*Williams P. 2007. **Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacteria world.** Microbiol, 153(12): 3923-3938. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048907>>
- \*Wittgens A, Tiso T, Arndt T, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Sylatak C, Rosenau F, Blank L. 2011. Growth independent rhamnolipid production from glucosa using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. Microb Cell Factories, 10: 80. < <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80>>
- \*Wittgens A, Kovacic F, Müller M, Gerlitzki M, Santiago-Schübel B, Hofmann D, Tiso T, Blank L, Henkel M, Hausmann R, Sylatak C, Wilhelm S, Rosenau F. 2017. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. Appl Microbiol Biotechnol, 101: 2865-2878. <  
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80>>
- \*Zeng G, Liu Z, Zhong H, Li J, Yuan X, Fu H, Ding Y, Wang J, Zhou M. 2011. **Effect of monorhamnolipid on the degradation of *n*-hexadecane by *Candida tropicalis* and the association with cell surface properties.** Appl Microbiol Biotechnol, 90(3): 1155-1161. <  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3125-6>>
- \*Zhang L, Pemberton J, Maier R. 2014. **Effect of fatty acid substrate chain length on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 monorhamnolipid yield and congener distribution.** Process Biochem, 49: 989-995 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.003>>
- \*Zhang Y, Miller R. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl Environ Microbiol, 60: 2101-2106. <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8031099>>

- \*Zhang Y, Miller R. 1995. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2247-2251. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535047>>
- \*Zhao Z, Selvam A, Wong W. 2011. **Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene.** *Bioresource Tech*, 102:3999-4007. <<http://europepmc.org/abstract/med/21208798>>
- \*Zhong H, Zeng G, Yuan X, Fu H, Huang G, Ren F. 2007. **Adsorption of dirhamnolipid on four microorganism and the effect on cell surface hydrophobicity.** *App Microbiol and Biotech*, 77(2); 447-455. <[https://www.researchgate.net/publication/5945787\\_Adsorption\\_of\\_dirhamnolipid\\_on\\_four\\_microorganisms\\_and\\_the\\_effect\\_on\\_cell\\_surface\\_hydrophobicity](https://www.researchgate.net/publication/5945787_Adsorption_of_dirhamnolipid_on_four_microorganisms_and_the_effect_on_cell_surface_hydrophobicity)>
- \*Zhong H, Zeng G, Liu J, Xu X, Yuan X, Fu H, Ding Y. 2008. **Adsorption of monorhamnolipid and dirhamnolipid on two *Pseudomonas aeruginosa* strains and the effect on cell surface hydrophobicity.** *App Microbiol and Biotech*, 79(4); 671-677. <[https://www.researchgate.net/publication/5408184\\_Adsorption\\_of\\_monorhamnolipid\\_and\\_dirhamnolipid\\_on\\_two\\_Pseudomonas\\_aeruginosa\\_strains\\_and\\_the\\_effect\\_on\\_cell\\_surface\\_hydrophobicity](https://www.researchgate.net/publication/5408184_Adsorption_of_monorhamnolipid_and_dirhamnolipid_on_two_Pseudomonas_aeruginosa_strains_and_the_effect_on_cell_surface_hydrophobicity)>
- \*Zhong H, Jiang Y, Zeng G, Liu L, Liu Y, He Y. 2015. **Effect of low-concentration rhamnolipid on adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 on hydrophilic and hydrophobic surfaces.** *Jour Hazardous Materials*, 285; 383-388. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25528238>>
- \*Zhong H, Liu G, Jiang Y, Brusseau M, Liu Z, Liu Y, Zeng G. 2016. **Effect of low-concentration rhamnolipid on transport of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 in an ideal porous medium with hydrophilic or hydrophobic surfaces.** *Colloids and Surfaces B*, 139; 244-248. <<https://europepmc.org/abstract/med/26722821>>
- \*Zulianello L, Canard C, Köhler T, Caille D, Lacroix J, Meda P. 2006. **Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Infect Immun*, 74(6): 3134-3147. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16714541>>
- \*Zhu L, Yang X, Xue C, Chen Y, Qu L, Lu W. 2012. **Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process.** *Bioresource Tech*, 117(4): 208-213. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.091>>



